

УДК 575.224+577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Streptomyces nogalater* LV65 С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ СИНТЕЗА НОГАЛАМИЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ

© 2011 г. Д. А. Климишин**, М. В. Рабык*, Т. П. Грень*, О. Я. Нимець*, М. А. Гончар**, А. Н. Громыко*, В. А. Федоренко*

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов 79005, Украина
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

**Институт биологии животных Национальной академии аграрных наук, Львов 79034, Украина
Поступила в редакцию 10.03.2011 г.

Исследовано влияние клонированных регуляторных генов на биосинтез ногаламицина у *Streptomyces nogalater* LV65. Ген *snorA* из генома *S. nogalater* был клонирован в составе мультикопийной репликативной плазмиды pSOKA и интегративной – pR3A. Введение этих плазмид в клетки штамма дикого типа *S. nogalater* LV65 приводило к увеличению синтеза ногаламицина. Подобный эффект наблюдался при гетерологической экспрессии гена *ppGpp*-синтетазы *relA*, клонированного из *S. coelicolor* A3(2). В то же время гетерологическая экспрессия генов *absA2* из *S. ghanaensis* ATCC14672 и *IndYR* из генома *S. globisporus* 1912 снижала уровень синтеза антибиотика. Полученный результат указывает на наличие в хромосоме *S. nogalater* гомологов этих генов и их возможное участие в регуляции биосинтеза ногаламицина, а также открывает возможности генетического конструирования штаммов с повышенным уровнем синтеза этого антибиотика.

Биосинтез антибиотиков у актиномицетов строго координирован с ростом культуры и морфологической дифференциацией, а также контролируется регуляторными элементами разных уровней [1]. Изучение механизмов регуляции биосинтеза антибиотиков и манипуляции с отдельными генами или элементами регуляторных систем является одним из важнейших направлений исследований, которое открывает возможности направленного поиска и создания штаммов с повышенным уровнем биосинтеза антибиотиков [1–4].

Streptomyces nogalater LV65 (=IMET43360) синтезирует антрациклиновый противоопухолевый антибиотик ногаламицин (рис. 1). Он состоит из поликетидного агликона, гликозилированного остатками ногалозы и ногаламина. Ногаламицин угнетает рост грамположительных бактерий, а также ряд клеток опухолевых линий [5]. Отдельные гены биосинтеза этого антибиотика эффективно используются в комбинаторном биосинтезе поликетидов [6–8]. Ранее в хромосоме *S. nogalater* идентифицирован ген *snorA*, который кодирует транскрипционный активатор экспрессии структурных генов биосинтеза ногаламицина и имеет высокую степень гомологии с регуляторными белками SARP-семейства (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein), контролирующими биосинтез антибиотиков у ряда стрептомицетов [8, 9]. Однако эксперименты по целенаправленному использованию гена *snorA* для получения продуцентов с повышенным уровнем синтеза антибиотика не проводились, а от-

сутствуют также данные о роли генов глобальной регуляции в биосинтезе ногаламицина.

Цель работы – изучение влияния гена *snorA*, клонированного в составе мультикопийной и интегративной плазмиды, а также гетерологической экспрессии глобальных регуляторов вторичного метаболизма у актиномицетов на уровень синтеза ногаламицина штаммом *S. nogalater* LV65.

МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы дикого типа *S. nogalater* LV65 (продуцент ногаламицина), его производные, *S. ghanaensis* ATCC14672 (продуцент

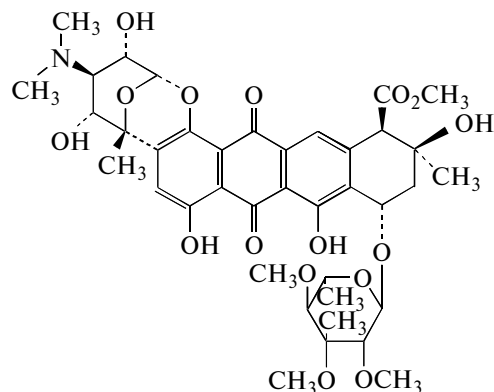


Рис. 1. Структурная формула ногаламицина.

Характеристика плазмидных ДНК, использованных в работе

Плазида	Характеристика	Источник получения
pRT801 5.2 т.п.н.	Конъюгационная интегративная плазида, содержащая ген устойчивости к апрамицину <i>apm^r</i> , систему интеграции фага φBT1	Р. Тил, Ноттингемский ун-т, Великобритания
pSOK101, 7.1 т.п.н.	Конъюгационная челночная плазида, содержащая гены устойчивости к апрамицину <i>apm^r</i> и тиостриптону <i>tsr^r</i> ; репликон плазмиды pIJ101	С. Зотчев, ун-т г. Тронхейм, Норвегия
pKC1139, 6.5 т.п.н.	<i>lacZ α ori^{pUC19} ori^{T^{RP4}} ori^{pSG5} aac(3)IV</i>	[11]
pBluesnorA, 5.4 т.п.н.	pBluescript II KS/SK (+), с клонированным фрагментом хромосомы <i>S. nogalater</i> размером 2.5 т.п.н., содержащим ген <i>snorA</i>	[9]
pR3A, 8.1 т.п.н.	pRT801, несущая 2.9 т.п.н. PvuII-фрагмент плазмиды pBluesnorA	создана в работе
pSOCA, 9.5 т.п.н.	pSOK101, несущая 2.5 т.п.н. EcoRI–HindIII-фрагмент pKCEA	то же
pKCEA, 8.4 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>snorA</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	[9]
pKCabsA2, 9.5 т.п.н.	pKC1139, несущая фрагмент хромосомы <i>S. ghanaensis</i> размером 3.0 т.п.н., содержащий ген <i>absA2</i>	создана в работе
pIJ8647, 5.5 т.п.н.	pOJ260, несущая N-терминальный 0.8 т.п.н. фрагмент гена <i>absA2</i> под контролем промотора <i>tipAp</i>	М. Бибб, Джон Иннес центр, Норвич, Великобритания
pKCEafsS, 8.9 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>afsS</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>S. erythraea</i>	Л. Горбаль, ЛНУ им. И. Франко, Украина
pKC1218EIndY2-2, 7.1 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>IndYR</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>S. erythraea</i>	[16]

моеномицина А), а также штаммы *Escherichia coli*: *E. coli* DH5α (F-φ80d Δ(*lacZ*)M15 *recA1 endA1gyrA96thi1deoR(lacZYA-argF) U169*) и *E. coli* ET12567 (*dam–13::Tn9(Cm^r) dcm–6 hsdM*), содержащий конъюгативную плазмиду pUB307 (производную плазмиды RK2). Штаммы актиномицетов, а также *E. coli* и *Sarcina lutea* КА37 хранятся в Коллекции культур микроорганизмов – продуцентов антибиотиков Львовского национального университета имени Ивана Франко. И использованные в работе плазмидные ДНК представлены в таблице.

Штаммы стрептомицетов культивировали на овсяной, кукурузной [10] и в жидких средах TSB, SG [11] при температуре 28°C, а *E. coli*, и *S. lutea* – на LA и LB при температуре 37°C [11].

Трансформацию *E. coli* проводили согласно стандартной “кальциевой” методики [10]. Конъюгацию *E. coli* – *S. nogalater* LV65 осуществляли, как описано в работе [12]. Апрамицин (50 мкг/мл) использовали для селекции трансконоггантов, налидиксовую кислоту (100 мкг/мл) – для удаления штамма-донора. В контроле определяли частоту появления спонтанных апрамицин-устойчивых мутантов *S. nogalater*. Стабильность наследования

плазмид клонами трансконоггантов определяли, как отношение числа колоний, сохранивших устойчивость к антибиотику, детерминированную маркерным геном плазмид, после пяти пассажей в неселективных условиях к общему числу колоний.

Антибиотическую активность штаммов *S. nogalater* изучали методом диффузии в агар с использованием тест-культуры *Sarcina lutea*. Штаммы стрептомицетов выращивали в жидкой среде SG, ногаламицин экстрагировали из культуральной среды хлороформом в соотношении культурная жидкость–хлороформ 1 : 1. Экстракты сушили при температуре 37°C, сухой остаток растворяли в метаноле, наносили на диски из фильтровальной бумаги одинакового диаметра и накладывали на среду LA с 0.7%-ным агаром, содержащим клетки тест-культуры (10⁹ КОЕ). Чашки инкубировали при температуре 28°C в течение 12 и 72 ч. Индекс продуктивности определяли по методике, описанной в работе [10].

Тонкослойную хроматографию экстрактов антибиотиков проводили на силикагелевых пластинках Silufol UV254 (Чехия), в системе растворителей хлороформ–метанол–этанол–дистиллированная вода

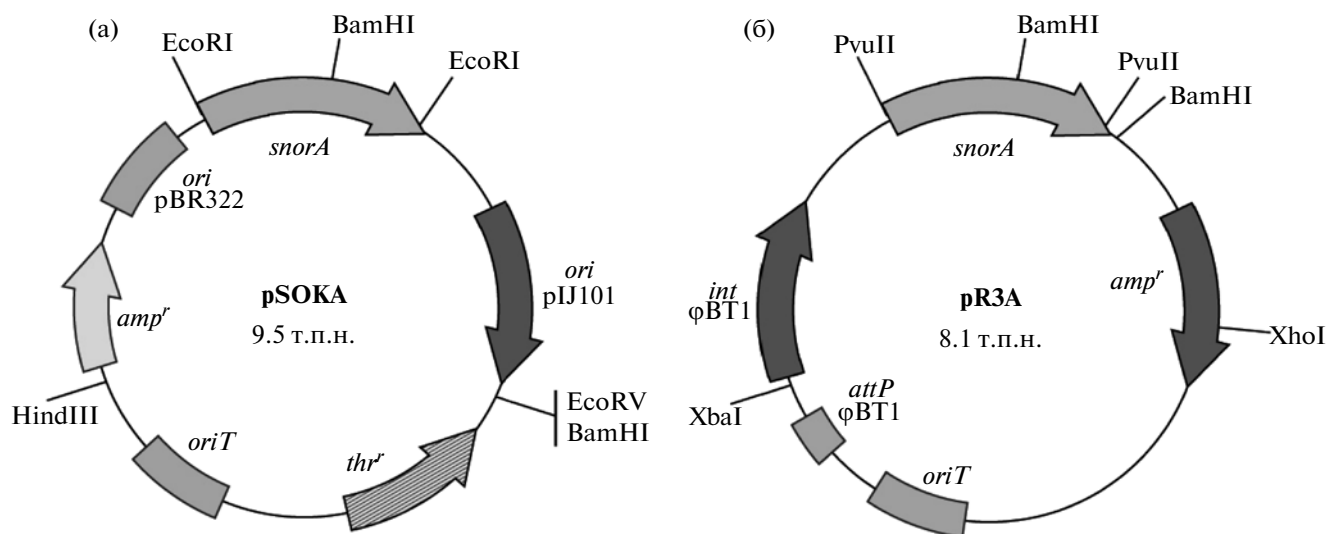


Рис. 2. Схема плазмид рSOKA (а) и рR3A (б): *amp^r* – ген устойчивости к апрамицину, *ori* pBR322 – репликон плазмиды pBR322, *ori* T – участок инициации конъюгационного переноса, *int* (фВТ1) – ген фага фВТ1, обеспечивающий интеграцию плазмиды рR3A в хромосому. Указаны сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, которые использовались в этой работе.

(120 : 25 : 6 : 4.5). Определение антибиотиков проводили при 254 нм.

Все молекулярно-биологические процедуры выполняли по стандартным протоколам [11]. EcoRI-фрагмент плазмиды рKCEA (таблица) размером 2.5 т.п.н. клонировали в вектор рSOK101. В результате получена плазмида рSOKA размером 9.5 т.п.н (рис. 2а). Для конструирования рR3A плазмиду рBlues*snorA* (таблица) обработали эндонуклеазой рестрикции PvuII и элюировали фрагмент размером 2.9 т.п.н, содержащий ген *snorA*. Этот фрагмент клонировали в уникальный EcoRV-сайт плазмиды рRT801. В итоге получена плазмида рR3A (рис. 2б). Строение этих плазмид подтверждено рестрикционным анализом. Пару праймеров 5'-AAAGGATCCGCCCGAGATCGATCTTG-CAG-3' и 5'-TTTAAGCTTCGCTGTTCAGC-CTCTCCTAC-3 (в которые введены сайты BamHI и HindIII соответственно) использовали для амплификации из генома *S. ghanaensis* ATCC14672 фрагмента, несущего ген *absA2*. Ампликон размером 3.0 т.п.н. перенесли в рKC1139 как BamHI/HindIII-фрагмент. В результате получена плазмида рKC*absA2*.

Первичный анализ последовательностей нуклеотидов и определение сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции проводили с помощью программ DNA-Star и VECTOR NTI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для введения в штамм *S. nogalater* LV65 дополнительных копий гена *snorA* использовали мультикопийную плазмиду рSOKA и интегративную – рR3A (таблица). Плазмида рR3A, полученная на

основе интегративного вектора рRT801, который интегрируется в два сайта хромосомы *S. nogalater*, не утрачивается трансконъюгантами при выращивании в неселективных условиях, не влияет на уровень продукции ногаламицина и морфологические признаки бактерий [13], что делает ее использование удобным инструментом для генно-инженерных манипуляций в клетках *S. nogalater*. Плазмида рSOKA создана на основе мультикопийного вектора рSOK101. Эффективность использования этого вектора для введения дополнительных копий регуляторных генов продемонстрирована для ряда стрептомицетов, в частности продуцента ландомицина E – *S. globisporus* 1912 [14].

Плазмиды рSOKA и рR3A перенесены в клетки штамма дикого типа *S. nogalater* LV65 при помощи конъюгационных скрещиваний с *E. coli* ET12567. Частота образования трансконъюгантов рR3A⁺ и рSOKA⁺ в среднем составляла 4.0×10^{-6} и 1.7×10^{-7} соответственно. Фенотип апрамицин-устойчивости наследовался трансконъюгантами с частотой 100% рR3A⁺ после пяти пересевов в жидкой среде TSB при отсутствии селективного давления. В тех же условиях трансконъюганты *S. nogalater*, несущие автономную плазмиду, полностью теряли рSOKA. Однако она стабильно наследовалась при выращивании штаммов в присутствии апрамицина в конечной концентрации 50 мкг/мл. Для последующих исследований отобрано по одному независимому трансконъюганту, содержащему плазмиды рR3A и рSOKA.

При анализе экстрактов, полученных из мицелия антибиотиков штаммов *S. nogalater* рR3A⁺ и *S. nogalater* рSOKA⁺, было показано увеличение

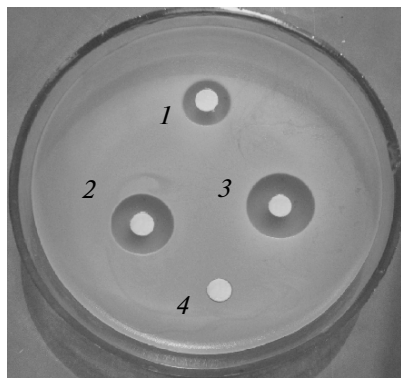


Рис. 3. Зоны угнетения роста тест-культуры экстрактами антибиотиков штаммов: 1 – *S. nogalater* LV65, 2 – *S. nogalater* pR3A⁺, 3 – *S. nogalater* pSOKA⁺, 4 – негативный контроль (метанол, использованный как растворитель ногамицина). Тест-культура – *Sarcina lutea*. В эксперименте антибиотики экстрагировали из одинакового количества биомассы.

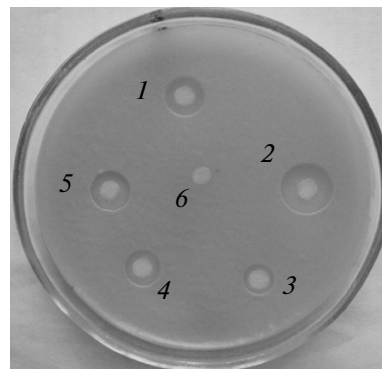


Рис. 4. Зоны угнетения роста тест-культуры экстрактами антибиотиков штаммов: 1 – *S. nogalater* LV65, 2 – *S. nogalater* *relA*⁺, 3 – *S. nogalater* *IndYR*⁺, 4 – *S. nogalater* *absA2*⁺, 5 – *S. nogalater* *afsS*⁺, 6 – негативный контроль (метанол, использованный как растворитель ногамицина). Тест-культура – *S. lutea*. В эксперименте антибиотики экстрагировали из одинакового количества биомассы.

уровня синтеза ногамицина в случае обоих штаммов (рис. 3). Это свидетельствовало об эффективности примененного подхода клонирования дополнительных копий гена *snorA* для создания штаммов *S. nogalater* с повышенным уровнем синтеза ногамицина. Использование плазмиды pR3A для конструирования таких штаммов было более эффективным, поскольку она интегрировалась в хромосому и стабильно поддерживалась в геноме в неселективных условиях.

Можно предположить, что увеличение уровня экспрессии гена *snorA* за счет увеличения его копийности приводило к увеличению пула соответствующего регуляторного белка–активатора транскрипции структурных генов биосинтеза ногамицина у *S. nogalater* в клетке, которое обеспечивало повышенную экспрессию регулируемых им генов. Похожий эффект клонирования регуляторов–активаторов транскрипции структурных генов показан для ряда актиномицетов [1, 2, 4].

В связи с отсутствием информации относительно глобальной регуляции вторичного метаболизма у *S. nogalater* необходимо было изучить влияние гетерологической экспрессии этих генов в клетках продуцента ногамицина. С этой целью использовали гены: *absA2* [15], клонированный из генома *S. ghanaensis* ATCC14672, *IndYR* [16] – из генома *S. globisporus* 1912, *relA* [17, 18] и *afsS* [19] – из генома *S. coelicolor* A3(2), продукты которых хорошо изучены у этих актиномицетов. В условиях гетерологической экспрессии глобальных регуляторов можно ожидать как увеличения уровня биосинтеза ногамицина, так и ингибирования процессов антибиотикообразования у *S. nogalater* LV65.

Изучение влияния гена *relA* на характер синтеза ногамицина у *S. nogalater* показало, что введение этого регулятора в составе плазмиды pIJ8647 повы-

шало уровень синтеза ногамицина (рис. 4). Возможно, это объясняется взаимосвязью между скоростью роста бактерий и биосинтезом их вторичных метаболитов [17, 18]. В частности, у *S. coelicolor* важную роль в этих процессах играет полифосфорилированный нуклеотид – *ppGpp* [17]. Он образуется при участии связанной с рибосомами *ppGpp*-синтетазы, которая кодируется геном *relA*. Возможно, что результатом накопления *ppGpp* и является значительное изменение экспрессии отдельных регуляторных генов у *S. nogalater*, что объясняет увеличение уровня синтеза ногамицина.

В результате введения дополнительных копий глобальных регуляторов *absA2* в плазмиде pKC*absA2* и *IndYR* в составе pKC1218E*IndY2-2* мы обнаружили, что экспрессия этих генов приводила к снижению уровня синтеза ногамицина (рис. 4). Подобный эффект ингибирования процессов антибиотикообразования продуктами этих генов также описан для ряда актиномицетов [15, 16]. Можно предположить, что этот результат свидетельствовал о наличии гомологов *absA2* и *IndYR* в геноме *S. nogalater*. Идентификация таких ингибиторов с целью их направленной инактивации является важным механизмом получения генетически стабильных штаммов с повышенным уровнем биосинтеза антибиотиков.

Введение гена *afsS* в клетки *S. nogalater* LV65 не повлияло на синтез ногамицина (рис. 4). Возможно, его гомологи отсутствуют у *S. nogalater* либо для их активации необходимы дополнительные факторы, например определенные источники питания или регуляторные механизмы [19].

Таким образом, введение дополнительных копий гена *snorA* в клетки *S. nogalater* LV65 в состав автономной мультикопийной pSOKA и интегративной – pRT801 плазмид приводит к повышению уровня синтеза антибиотика. Похожий эффект на-

блюдался также в результате гетерологической экспрессии гена *relA*, клонированного из хромосомы *S. ghanaensis*. Экспрессия этих генов не влияла на морфологические характеристики *S. nogalater*. Следовательно, используя эти регуляторные гены, можно получать генетически стабильные штаммы с повышенным уровнем синтеза ногаламицина. Подавление процессов антибиотикообразования у *S. nogalater* LV65 наблюдается вследствие гетерологической экспрессии *absA2* и *IndYR*. Очевидно, что гомологи *absA2* и *IndYR* в хромосоме *S. nogalater* LV65 ингибируют синтез ногаламицина, а их идентификация и направленная инактивация будет способствовать увеличению уровня биосинтеза антибиотика. Генетические манипуляции с отдельными регуляторными элементами в клетках *S. nogalater*, путем введения их дополнительных копий либо инактивации дает возможность конструировать штаммы с повышенной способностью к синтезу важного противоопухолевого антибиотика ногаламицина.

Авторы выражают благодарность М. Биббу, Р. Тилу и С. Зотчеву за любезно предоставленные плазмиды.

Работа частично финансировалась грантом Бг-33П Министерства образования и науки Украины (для В.А. Федоренко) и международным грантом WUBMRC (для Д.А. Климишина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bibb M.J. // Microbiology. 2005. V. 8. P. 208–215.
2. Bignell D., Tahlan K., Colvin K.R., Jensen S.E., Leskiw B.K. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. P. 1529–1541.
3. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Kushmir S., Fukuhara M., Bechthold A., Nashimoto M., Nakamura T., Fedorenko V. // Microbiology. 2005. V. 151. P. 281–290.
4. Rebets Y., Dutko L., Ostash B., Luzhetskyy A., Kulachkovskyy O., Yamaguchi T., Nakamura T., Bechthold A., Fedorenko V. // Arch. Microbiol. 2008. V. 189. P. 111–120.
5. Li H., Krueger C. // Pharm. Ther. 1991. V. 51. P. 239–255.
6. Torkkell S., Kunnari T., Palmu K., Mantsala P., Ylihonko K. // Mol. Gen. Genet. 2001. V. 266. P. 276–288.
7. Torkkell S., Ylihonko K., Hakala J., Mantsala P. // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 256. P. 203–209.
8. Ylihonko K., Tuikkanen J., Jussila S., Cong L., Mantsala P. // Mol. Gen. Genet. 1996. V. 251. P. 113–120.
9. Климишин Д., Грень Т., Федоренко В. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Т. 36. С. 3–10.
10. Федоренко В.А., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Практикум з генетики, генетичної інженерії і аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Вид. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.
11. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Found., 2000. 634 p.
12. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Gromyko O., Ostash B., Rebets Y., Bechthold A., Fedorenko V. // Rus. J. Genet. 2006. V. 42. № 5. С. 595–601.
13. Климишин Д., Громько О., Федоренко В. // Цитология и генетика. 2007. Т. 41. № 5. С. 263–267.
14. Патент України. 2003. № UA62200A.
15. McKenzie NL, Nodwell JR. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 5284–5292.
16. Ostash B., Rebets Y., Myronovskyy M., Tsypik O., Ostash I., Kulachkovskyy O., Datsuk Y., Nakamura T., Walker S., Fedorenko V. // Microbiology. 2011. V. 157. № 4. P. 1241–1250.
17. Hesketh A., Chen J., Ryding J., Chang S., Bibb M.J. // Genome Biology. 2007. V. 8. R 161 p.
18. Gomez-Escribano J.P., Martin J.F., Hesketh A., Bibb M.J., Liras, P. // Microbiology. 2008. V. 154. P. 744–755.
19. Santos B. F., Rodriguez G. A., Sola L. A., Martin J.F. // Mol. Microbiol. 2009. V. 72. P. 53–68.

Design of *Streptomyces nogalater* LV65 Strains with Higher Synthesis of Nogalamycin Using Regulatory Genes

D. A. Klimishin^b, M. V. Rabyk^a, T. P. Gren^a, O. Ya. Nimets^a, M. A. Gonchar^b,
A. N. Gromyko^a, and V. A. Fedorenko^a

^a Ivan Franko National University of L'vov, L'vov, 79005 Ukraine

e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

^b Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences, Lvov, 79034 Ukraine

Received March 10, 2011

Abstract—Influence of cloned regulatory genes on biosynthesis of nogalamycin by *Streptomyces nogalater* LV65 strains has been studied. Gene *snorA* from the *S. nogalater* genome was cloned in multicopy replicative plasmid pSOKA and integrative plasmid pR3A. Introduction of these plasmids into the cells of wild type strain of *S. nogalater* LV65 resulted in higher synthesis of nogalamycin. A similar effect was observed at heterologous expression of gene *ppGpp* of synthetase *relA* cloned in *S. coelicolor* A3(2). Heterologous expression of genes *absA2* from *S. ghanaensis* ATCC14672 and *IndYR* from genome *S. globisporus* 1912 decreased synthesis of antibiotic. The study results indicate the presence of homologs of these genes in chromosome of *S. nogalater*, their possible participation in regulation of nogalamycin biosynthesis, and provide us with a possibility for genetic design of the strains with higher synthesis of this antibiotic.