

УДК 541.123:546.21'831'832

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА MFS-ТРАНСПОРТЕРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ CefT В *Acremonium chrysogenum* И *Saccharomyces cerevisiae*

© 2013 г. М. В. Думина\*, А. А. Жгун\*, И. В. Керпичников\*, А. Г. Домрачева\*, М. И. Новак\*,  
А. Я. Валиахметов\*\*, Д. А. Кнорре\*\*\*, Ф. Ф. Северин\*\*\*, М. А. Эльдаров\*, Ю. Э. Бартошевич\*

\*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312;  
e-mail: DuminaMaria@gmail.com

\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Пущино

\*\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119899

Поступила в редакцию 26.12.2012 г.

Созданы вектора для экспрессии MFS транспортера CefT в *Acremonium chrysogenum*, продуценте бета-лактамного антибиотика цефалоспорина C, в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в виде гибридного белка, слитого с синим флуоресцентным белком CFP. Исследован характер субклеточной локализации CefT-CFP гибрида в клетках дрожжей. Показано, что гибридный белок CefT-CFP способен комплементировать функции генов *qdr3*, *tro1*, *tro3*, кодирующих ортологичные MFS-транспортеры сахаромицетов, обеспечивая устойчивость соответствующих штаммов к спермидину, бромистому этидию, гигромицину В. Методом агробактериального переноса получены трансформанты высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, экспрессирующие ген *cefT-efp*. Показано, что конститутивная экспрессия CefT в *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D приводит к изменению профиля биосинтеза цефалоспорина C и его предшественников: снижению содержания конечного продукта в культуральной жидкости на 25–35% при одновременном росте содержания его интермедиатов.

DOI: 10.7868/S0555109913040041

Цефалоспорины – обширный класс антибиотиков с мощным бактерицидным действием, низкой токсичностью, широким терапевтическим диапазоном [1]. Исходным субстратом для получения более 50 наименований полусинтетических цефалоспоринов 5 поколений является природный бета-лактамный антибиотик цефалоспорин C (цефС), продуцируемый аскомицетом *A. chrysogenum* [2].

На протяжении последних тридцати лет был достигнут значительный прогресс в селекции промышленных штаммов *A. chrysogenum* – суперпродуцентов цефС, изучении биохимических путей биосинтеза пенициллинов и цефалоспоринов у *Penicillium chrysogenum* и *A. chrysogenum*, соответственно, идентификации генов, контролирующих биосинтез этих бета-лактамов и характера их регуляции [3].

В то же время, несмотря на многолетние исследования *A. chrysogenum*, биохимические, физиологические и молекулярно-генетические отличия промышленных штаммов *A. chrysogenum*, приводящие к усилению продукции цефС, остаются во многом неизученными.

Известно, что на внутриклеточном уровне биосинтез цефС строго компартиментализован [4].

Эффективность процессов транспорта интермедиатов биосинтеза цефС между этими компартаментами и экспорта собственно цефС наружу из клетки вносит существенный вклад в общий уровень продукции цефС, соотношение выхода конечного продукта и промежуточных форм в процессе ферментации [3].

В результате последних исследований были идентифицированы гены *cefT*, *cefM* *cefP* *A. chrysogenum*, кодирующие мембранные транспортеры, отвечающие за внутриклеточный транспорт цефС, его интермедиатов и экспорт цефС из клетки в среду культивирования [5, 6].

Таким образом, данные гены являются перспективными мишенями для создания рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* с улучшенными производственными характеристиками. Одним из таких генов является *cefT* *A. chrysogenum*, кодирующий белок, относящийся к обширному семейству MFS транспортеров. В работе, посвященной открытию этого белка и выяснению его роли в регуляции продукции цефС [5], было показано, что дополнительная экспрессия двух-четырёх копий гена приводит к 100% повышению уровня биосинтеза цефС либо смеси β-лактамов (цефалоспорины, изопенициллин N (IPN), пенициллин N (PenN)) в штамме *A. chrysogenum* C10.

**Таблица 1.** Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
<i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550	штамм дикого типа, продуцент цефалоспорины С	АТСС, США, [10]
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D	штамм-суперпродуцент цефалоспорины С	Лабораторная коллекция, [11]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL0	ЕНА101 рTiBo542ΔТ-region Mop <sup>+</sup>	[12]
<i>S. cerevisiae</i> YPH857	МАТ $\alpha$ , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>cyh2R</i>	[13]
<i>S. cerevisiae</i> AD1-8u <sup>-</sup>	МАТa <i>pdr1-3 his1 ura3 Δyor1::hisG Δsnq2::hisG Δpdr5::hisG Δpdr10::hisG Δpdr11::hisG Δycf1::hisG Δpdr3::hisG Δpdr15::hisG</i>	[14]
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δybr043c	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YBR043c::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y03180
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δypr156c	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YPR156c::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y05571
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δyil028w	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YLL028w::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y01516

Но при этом инактивация гена не оказывает значительного влияния на уровень антибиотикообразования в анализируемом штамме *A. chrysogenum*, указывая на существование альтернативных транспортеров β-лактамов соединений [7]. В более поздних исследованиях, выполненных на штамме *A. chrysogenum* 84-3-87, было показано, что повышение экспрессии *cefT* оказывает незначительный либо слабый отрицательный эффект на выход цефС [8]. В работе, посвященной характеристике нового гена-регулятора *cefR* [9] показано, что *cefR* регулирует транскрипцию *cefT*, снижение уровня экспрессии *cefT* сопровождается повышением секреции цефС в культуральную жидкость.

Таким образом, данные о функциональной активности CefT и роли белка в биосинтезе цефС в *A. chrysogenum* на настоящий момент остаются во многом неясными и противоречивыми.

Проблема изучения внутриклеточной компартиментализации и функционирования таких белков, как CefT, непосредственно на клетках *A. chrysogenum* осложняется рядом методических проблем (гетерогенность мицелия, сложность получения мембранных фракций и т.д.) и неизученностью самого генома *A. chrysogenum*. Перспективной альтернативой в этом плане является использование дрожжей-сахаромицетов как гетерологичного модельного объекта. Дрожжи-сахаромицеты – один из наиболее изученных и популярных объектов современной молекулярной генетики, генетической инженерии и биотехнологии. Дрожжи являются низшими эукариотами и их клеточная организация во многом сходна с клеточной организацией других представителей аскомицетов, к которым принадле-

жит и *A. chrysogenum*. Сахаромицеты широко используются для отработки современных постгеномных подходов к анализу основных процессов, протекающих в эукариотической клетке, в том числе для структурно-функционального анализа мембранных белков и транспортных систем других организмов.

Цель исследования – разработка модельной системы на основе *S. cerevisiae* для более подробного изучения функций CefT, а также изучение эффекта повышенной экспрессии *cefT* на уровень продукции цефС и интермедиатов его синтеза в трансформантах высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, конститутивно экспрессирующего ген *cefT-cfp* гибрида.

#### МЕТОДИКА

**Штаммы, используемые в работе.** Использовали *A. chrysogenum* ATCC 11550 (дикий тип) и полученный мутагенезом и селекцией высокоактивный штамм ВКМ F-4081D; штаммы *S. cerevisiae* YPH857, AD1-8u<sup>-</sup>, BY4741 Δybr043c (ΔQdr3), BY4741 Δypr156c (ΔTro3), BY4741 Δyil028w (ΔTro1) – модельный реципиент для проверки работы экспрессионных каскадов, характеристики функциональной активности CefT-CFP; *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 – донор для переноса экспрессионных каскадов в клетки *A. chrysogenum*. Генотип штаммов, использованных в работе, приведен в табл. 1.

**Создание каскадов экспрессии CefT-CFP.** Данные о последовательности *cefT* использовали из Genbank AJ487683. Для выделения кодирующей последовательности *cefT* (два экзона, разделенных интроном размером 61 п.н.) проводили ПЦР-амплификацию с праймерами CEFTEX1F/CEFTX2R (табл. 2),

**Таблица 2.** Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Олигонуклеотид	Последовательность (5' → 3')
CEFTEx1F	GATCGAATTCATGGCGAACAATTCTGGAACAACA
CEFTEx2R	GATCAGATCTGCAGGGTTGCTCACGTAGCTGATAGC
Hyg1	GTTACATGTAGATCTGATATTGAAGGAGCATTTTTTGGGCTTGGC
Hyg2	CTGATTAATACTAG TTAAGTGGTTCCCGGTTCGGCATCTAC
TDH_F_SAL	GTTTCGTGCACCTATTTTCGAGGACCTTGTCACCTT
TDH_R_R1	GGTGAATTCGTTTGTATTATGTGTGTTTATTC
gpdA_F	CCCGGTGTATGAAACCGGAA
AcrCefTEx1R	GGAAGAGACATACTAGATGATCCTGCGC
GKR1_N	GCAACATCCTGGGCCACAAG
GKF1_N	CGGTACAGCTCGTCCATGCCGT
Npt3F	GCTTAGCCGAATTGGC
Npt3R	TCCCAATCAGGCTTGA
Vir1	GGCTACATCGAAGATCGTATGAATG
Vir2	GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC
cefTq3	TGTTGTTCGGATTCGGTGTTCGG
cefTq4	TTCCACATATCGGCAAGGGTGC
cefTq5	GACGACCTCAGGAGGGCTATCA
cefTq6	GATCTCCAGCTTGCCGTAGTCCG
actq1	CCGGTTTTCGCCGGTGATGATGCT
actq2	TGCTCAATGGGGTAGCGCAG

на матрице геномных ДНК *A. chrysogenum* (ATCC 11550 и ВКМ F-4081D). Полученный 1747 п.н. фрагмент гидролизовали по сайтам *EcoRI/BglII*, клонировали в *EcoRI/BamHI* вектор pZEN14, являющийся производным конструкции pTagCFP-N. Полученную плазмиду обозначили pZEN31. Кассету экспрессии *cefT* из pZEN31 в виде *SpeI*-фрагмента клонировали в *XbaI*-вектор pCambia1300. Результирующий вектор pZEN33 получили путем замены 35S-промотора промежуточной конструкции pZEN32 на *trpC*-промотор, амплифицированный с матрицы pZEN14 с праймерами Hyg1/Hyg2 (табл. 2) и клонированный по сайтам *BglII/RsrII*.

Для *S. cerevisiae*: кассету экспрессии со сплайсированной формой *cefT* *cefT*spl-*cfp*-PGKterm получали путем последовательного клонирования фрагментов *cefTEx1*, *cefTEx2*-CFP-PGKterm, амплифицированных с матрицы pZEN31, по сайтам *KpnI/HindIII*, *KpnI/SacI*. В результирующем векторе pZEN35 гибридный *cefT*-*cfp* экспрессировался под контролем индуцибельного 2HSE промотора из *S. cerevisiae*. Аналогичные векторы были получены на основе плазмид: 1) pRS423 (*his3*), pRS424 (*trp1*), где *cefT*spl-*cfp*-PGKterm был поставлен под контроль конститутивного *gpdA* промотора (pZEN37a, pZEN37b); 2) pRS425 (*leu2*), pRS426 (*ura3*) – *cefT*spl-*cfp*-PGKterm под контролем термоиндуцибельного 2HSE промотора (pZEN35c, pZEN35d); а также pZEN35e, где

2HSE в pZEN35d заменен на конститутивный TDH3 промотор. Последовательность промотора была получена методом ПЦР на матрице геномной ДНК *S. cerevisiae* BY4741 с праймерами TDH\_F\_SAL/TDH\_R\_R1 (табл. 2). Полученный 1000 п.н. фрагмент гидролизовали и встраивали в *SalI/EcoRI* вектор pZEN35d.

**Флуоресцентная микроскопия.** Микрофотографии клеток *S. cerevisiae*\_CefT-CFP и *S. cerevisiae* PMA1-YFP были получены с помощью микроскопа Olympus BX2 (“Olympus”, Япония). В работе мы использовали наборы флуоресцентных фильтров U-N31044v2 (возбуждение 416–456 нм; дихроическое зеркало 455 нм, эмиссия 440–520 нм) и U-MN1BA3 (возбуждение 470–495 нм; дихроическое зеркало 505 нм, эмиссия 510–550 нм). Цветные фотографии получали путем искусственного наложения черно-белых изображений одного и того же участка, сфотографированного с разными наборами флуоресцентных фильтров в соответствующий цветовой канал: зеленый для CefT-CFP и красный для PMA1-YFP. Клетки для анализа выращивали на среде YNB до оптической плотности 0.8–1.0  $D_{600}$ .

**Анализ функциональной активности CefT-CFP.** Чувствительность клеток *S. cerevisiae*\_CefT-CFP к цитотоксичным агентам была проверена “спот-анализом” [20, 21]. Штаммы высевали на селек-

тивную YNB среду без урацила. Диапазон тестируемых концентраций соединений: циклогексимид D – 2–500 нг/мл, канамицин – 300 нМ, этидий бромистый – 5 мкг/мл, спермидин – 0.4 мМ, гигромицин В – 100 мкг/мл, этопозид – 100 мкг/мл, доксорубин – 20–100 мкМ.

**Трансформация *A. chrysogenum* методом агробактериального переноса.** Трансформацию *A. tumefaciens* AGL0 бинарным вектором pZEN33, кокультивирование *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D и *A. tumefaciens* AGL0\_pZEN33 проводили в соответствии с протоколами [15, 16] с небольшими модификациями. Трансформационную смесь высевали на нитроцеллюлозные фильтры Hybond N на СМ-чашки, инкубировали 2 сут при 25°C в темноте. Селекцию проводили путем переноса фильтров на ПЦ-среду (г/л): бакто-пептон – 10, мальт-экстракт – 24, мальтоза – 40, агар – 25, рН 7.2), содержащую гигромицин В – 100 мкг/мл, цефатоксин – 200 мкг/мл, карбенициллин – 200 мкг/мл.

**Молекулярный анализ клонов.** ПЦР-скрининг колоний *A. chrysogenum*, выросших на селективной среде, проводили на наличие кассеты экспрессии с праймерами Hyg1/Hyg2, gpdA\_F/AcrCefTEx1R, GKR1\_N/GKF1\_N, отсутствие плазмидной Npt3F/Npt3R и агробактериальной Vir1/Vir2 контаминации (последовательности праймеров приведены в табл. 2). Выделение геномной ДНК осуществляли в соответствии с протоколом <http://www.fgsc.net/Aspergillus/protocols/LgScaleDNAprep.pdf>, рестицировали AgeI и переносили на мембрану Amersham Hybond-XL (“GE Healthcare”, США) методом щелочного переноса с предварительной обработкой HCl [17]. В качестве зондов использовали меченый альфа-P<sup>32</sup>dATP с помощью набора DecaLabel DNA Labeling Kit (“Fermentas”, Литва) ПЦР-фрагмент, соответствующий TagCFP и амплифицированный с праймерами GKR1\_N/GKF1\_N (табл. 2). Визуализацию осуществляли с применением системы фосфоимиджер – Typhoon Trio+ (“PerkinElmer”, США), параметры: фильтр 390 BP, лазер 633 нм.

**Ферментация *A. chrysogenum*.** Отобранные клоны выращивали в пробирках со скошенной агаровой LPE средой в течение 14 сут при 28°C, переносили в 250 мл колбы Эрленмейера с 25 мл посевной среды (г/л): дрожжевой экстракт – 28.0, пептон – 10.0, мальт-экстракт – 9.2, мел – 4.0, соевое масло – 2.0, рН 7.3. 10% 48-часовой посевной культуры вносили в ферментационную среду (г/л): кукурузный экстракт – 100.0, декстрин 90%-ный раств. белый – 60.0, кукурузный крахмал – 25.0, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 5.0, глюкоза – 5.0, MgSO<sub>4</sub> – 3.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 14.0, мел – 10.0, соевое масло – 20.0, микроэлементы (мг/л): CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 18, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 150, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 30, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 70, рН 6.2–6.4. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера при 240 об/мин 120 ч, температура ферментации в первые 24 ч – 28°C, далее до кон-

ца процесса – 24°C. Образцы мицелия отбирали в начале ферментации 0, 48, 120 ч, фильтровали, промывали PBS, лиофилизировали и хранили при –70°C.

**ВЭЖХ-анализ.** Содержание цефС и его интермедиатов в культуральной жидкости определяли в подвижной фазе СТАВ–ацетонитрил–ортофосфорная кислота–вода на хроматографической колонке YMC-Pack ODS-A с диаметром частиц 5 мкм при расходе подвижной фазы 1.0 мл/мин, детекция при 254 нм.

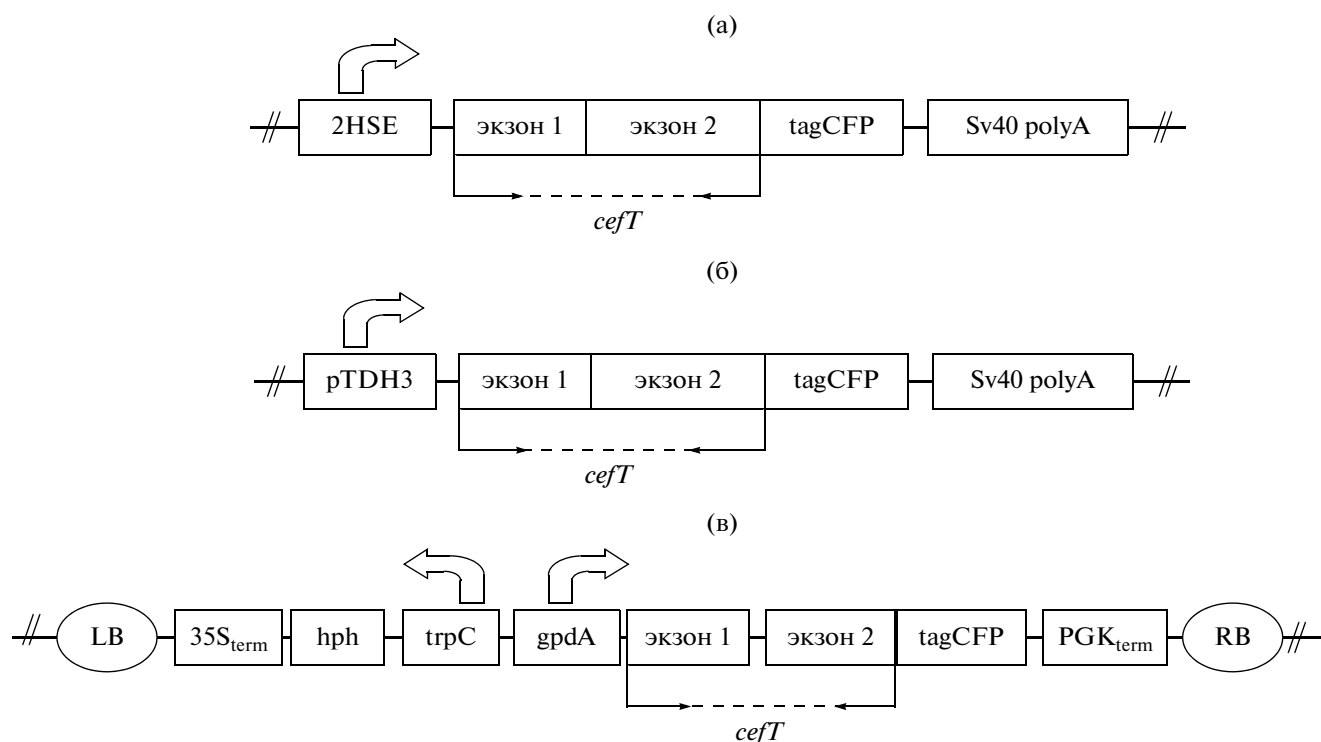
**Получение препаратов мРНК, кДНК.** Тотальную РНК получали в соответствии с протоколом [18], образцы обрабатывали ДНКазой I (“Promega”, США). мРНК выделяли с использованием олиго (dT)30 магнитных частиц (“Силекс”, Россия). Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы вируса лейкоза мышшей Монони (“Силекс”, Россия) с олиго (dT)15 праймерами.

**ПЦР-анализ в реальном времени.** Праймеры для анализа экспрессии рассчитывали в среде Vector NTI 6 software [19]: cefTq3/cefTq4, cefTq5/cefTq6 (табл. 2), результаты нормализовали на ген “домашнего хозяйства” гамма-актин [20] (Actq1/Actq2 (табл. 2)). РТ-ПЦР реакции проводили с использованием SYBR Green I реакционной смеси (“Синтол”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя на приборе CFX96 (“Bio-Rad”, США) при последовательном выполнении циклов: 1) 95°C 3 мин, 2) 95°C 10 с, 3) 60°C 50 с, 4) 40 циклов, 5) кривая плавления от 65.0 до 95.0°C, шаг 0.5°C 5 с. Результаты обрабатывали в среде Bio-Rad CFX Manager (“Bio-Rad”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Гетерологичная экспрессия гибридного белка CefT-CFP в модельной системе *S. cerevisiae*.** Для изучения возможности экспрессии в дрожжевой клетке функционально-активного гибрида CefT, слитого с флуоресцентным белком CFP, исследования характера его субклеточной локализации в клетке сахаромикетов была сконструирована панель эписомных и центромерных челночных векторов *S. cerevisiae*, несущих сплайсированную кДНК копию гена *cefT-cfp* под контролем термоиндуцибельного 2HSE или конститутивного промотора гена TDH3 (“Методика”, рис. 1).

В трансформантах штамма *S. cerevisiae* YPH857, полученных с помощью центромерного вектора pZEN35, содержащего ген *cefT-cfp* под контролем термоиндуцибельного промотора, по данным флуоресцентной микроскопии, присутствовал сигнал CFP, локализованный в плазматической мембране. Мембранная локализация исследуемого белка была подтверждена и в опытах по коэкспрессии CefT-CFP и гибридного белка PMA1-YFP, пред-



**Рис. 1.** Схемы кассет экспрессии гена *cefT-сfp*.  
а – pZEN35, pZEN35d; б – pZEN35e; в – pZEN33.

ставляющего собой гибрид  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы дрожжевой клетки, слитый с последовательно желтого флуоресцентного белка YFP. Полученные данные (рис. 2а–2е) наглядно демонстрируют колокализацию двух белков в мембранных областях (200–1000 нм), по размерам значительно превышающим рафты “типа Р” (40–70 нм), характерные для локализации PMA1 в *S. cerevisiae* (рис. 2). В отличие от CefT-CFP, значительная часть PMA1-YFP также локализована и в рафтах “типа Р”.

По данным литературы, одной из функций CefT является также участие в детоксикации за счет транспорта изовалериановой и фенилуксусной кислот (ФУК) из клеток *A. chrysogenum* [5]. Но анализ степени устойчивости штамма *S. cerevisiae* YPH857\_CefT-CFP к ФУК не выявил существенных отличий в параметрах роста относительно контрольного штамма *S. cerevisiae* YPH857, трансформированного “пустым вектором”, в широком диапазоне концентраций (300–1000 мкг/мл). Наблюдаемый эффект может быть объяснен низким уровнем экспрессии CefT в клетках *S. cerevisiae* либо относительно высоким базальным уровнем устойчивости контрольного штамма за счет функционирования эндогенных белков множественной лекарственной устойчивости дрожжевой клетки.

Для повышения чувствительности разрабатываемой модельной системы использовали два

подхода: 1) повышение уровня биосинтеза CefT-CFP за счет замены термоиндуцибельного 2HSE на сильный конститутивный TDH3 промотор в векторах экспрессии; 2) использование реципиентных штаммов дрожжей, дефектных по генам белков-транспортеров системы множественной лекарственной устойчивости (MDR), принадлежащих к классу ABC или MFS-белков.

Геном *S. cerevisiae* содержит 28 генов MFS белков [21], наиболее высокой степенью гомологии (50–56%) с CefT *A. chrysogenum* обладают белки TPO1, 2, 3, QDR2, 3. Штаммы, мутантные по этим генам, отличаются повышенной чувствительностью к ряду токсичных соединений [22–24]. Соответственно, для изучения возможного эффекта комплементации CefT в дальнейшей работе мы использовали полученные из коллекции European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis нокаутные штаммы *S. cerevisiae* BY4741 Dyrb043c, Dyrp156c, Dyll028w (“Методика”, табл. 1), а также штамм AD1-8u<sup>-</sup>, несущий делеции по 8 PDR-генам, которые трансформировали векторами конститутивной или регулируемой экспрессии гибридного CefT-CFP.

Для анализа функциональной активности CefT-CFP в штамме *S. cerevisiae* AD1-8u<sup>-</sup>\_pZen35d (2HSE промотор) применяли метод диффузии дисков в агар, которые обрабатывали бромистым этидием в концентрации 200–400 мкг/мл. Трансформанты

*S. cerevisiae* AD1-8u<sup>-</sup>\_pZen35d обладали повышенной чувствительностью к агенту по сравнению с контрольным штаммом, трансформированным вектором без целевой последовательности. Возможная причина такой сенсбилизации штамма за счет экспрессии *cefT-*cfp** может заключаться в формировании нерастворимых агрегатов данного белка при его сверхэкспрессии в клетках сахаромицетов, что в свою очередь может приводить к нарушению сборки и функционирования эндогенных MDR транспортеров дрожжей, снижая устойчивость трансформированных штаммов к анализируемому соединению. В пользу возможного формирования агрегатов CefT-CFP при его сверхэкспрессии свидетельствуют и данные анализа клеток дрожжей с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2ж).

При определении степени чувствительности трансформантов серии BY4741 к ряду предполагаемых субстратов MFS транспортеров была выявлена способность гетерологично-экспрессированного CefT-CFP к частичной комплементации функций генов Qdr3, Tro3 (рис. 3). Трансформанты, полученные с использованием конструкции pZEN35d (промотор 2HSE), проявляли устойчивость к повышенным концентрациям спермидина (0.4 мМ), бромистого этидия (5 мкг/мл) по сравнению с реципиентными штаммами. Необходимо отметить, что при этом экспрессия *cefT* с сильного конститутивного промотора TDH3 была токсична для клетки и не обеспечивала формирования фенотипа устойчивости, видимо, в силу проблем с фолдингом и транспортом *cefT-*cfp** гибрида.

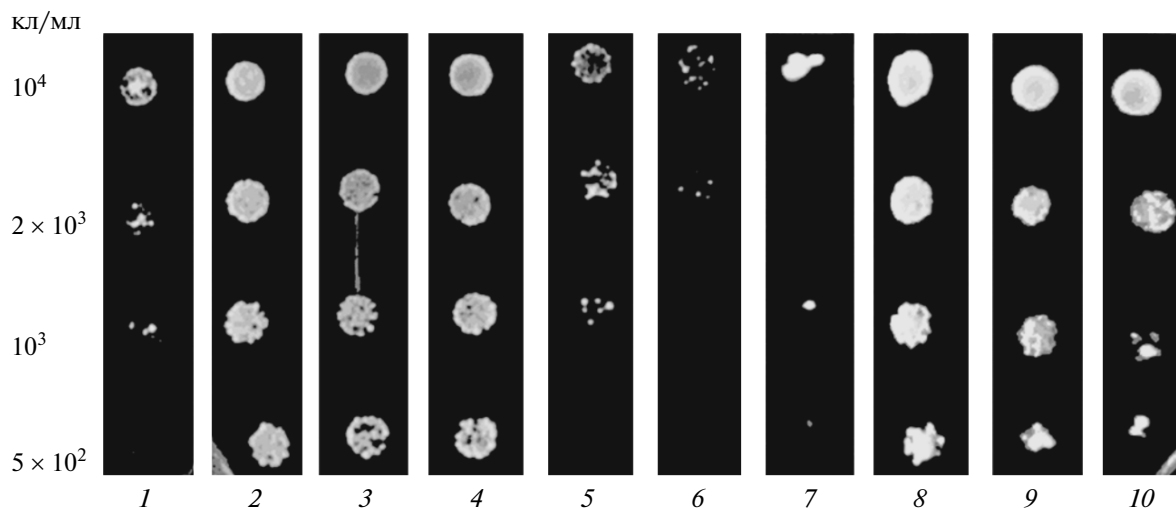
Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что сконструированный на-

ми гибридный белок CefT-CFP проявляет свойства MFS MDR транспортера в дрожжевой клетке и сохраняет специфическую мембранную локализацию при гетерологичной экспрессии в клетке дрожжей.

**Гомологичная экспрессия гибридного белка CefT-CFP в *A. chrysogenum*.** Для экспрессии CefT-CFP гибрида в клетках *A. chrysogenum* была сконструирована плаزمида pZen33, содержащая ген *cefT-*cfp** под контролем конститутивного *gpdA* промотора *Aspergillus nidulans* (рис. 1). Трансформацию штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D осуществляли методом агробактериального переноса (“Методика”), полученные гигромицин-устойчивые трансформанты анализировали с помощью ПЦР на наличие вставки переносимой кассеты экспрессии, отсутствие плазмидного гена *Npt*, агробактериальных *Vir*-генов. Хромосомная интеграция кассеты экспрессии для 6 из отобранных таким образом клонов была доказана методом Саузерн-гибридизации (рис. 4).

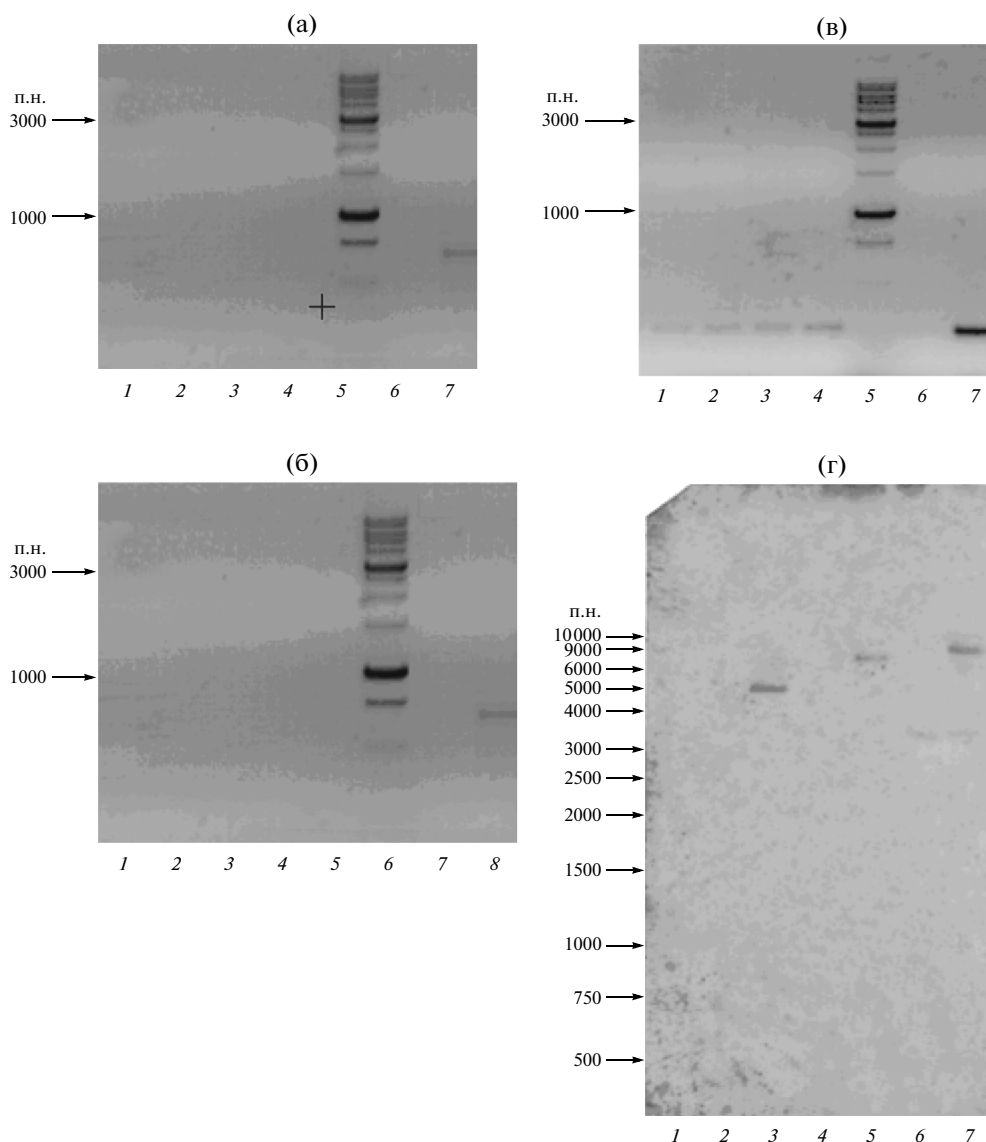
Для анализа экспрессии гена *cefT-*cfp** в полученных трансформантах использовали метод ПЦР в реальном времени.

В предварительных экспериментах был исследован профиль экспрессии гена *cefT* в 2 штаммах: штамме дикого типа *A. chrysogenum* ATCC 11550 и высокопродуктивном штамме ВКМ F-4081D. Образцы культур отбирали в трех временных точках, соответствующих стадии начала ферментации – нулевая точка (окончание подготовки посевной культуры), 48 и 120 ч ферментации. Динамика экспрессии *cefT* в двух штаммах оказалась весьма различной: в штамме ATCC 11550 она закономерно возрастала к концу культивирования,



**Рис. 3.** Анализ устойчивости штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих *cefT-*cfp**, к бромистому этидию.

1 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c\_pRS424 (К-); 2–4 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c\_2HSE-CefT-CFP (индуцибельный промотор); 5–6 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c\_TDH-CefT-CFP (конститутивный промотор); 7 – *S. cerevisiae* Δypr156c\_pRS424 (К-); 8–10 – *S. cerevisiae* Δypr156c\_2HSE-CefT-CFP (индуцибельный промотор).



**Рис. 4.** Молекулярный анализ рекомбинантных клонов *A. chrysogenum*.

а – ПЦР-анализ, исключающий контаминацию последовательностями *vir*-генов *A. tumefaciens*: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP, 5 – Mr (1 kb DNA ladder), 6 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 7 – *A. tumefaciens* AGL0.

б – ПЦР-анализ, исключающий контаминацию последовательностями *npt*-гена вектора pZen33: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP, 5 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 6 – Mr (1 kb DNA ladder), 7 – *A. tumefaciens* AGL0, 8 – pZEN33.

в – ПЦР-анализ, подтверждающий присутствие последовательности гена *cfp*: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP, 5 – Mr (1 kb DNA ladder), 6 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 7 – pZEN33.

г – Саузерн-блот анализ клонов *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP: 1 – 1 kb DNA ladder, 2–7 рестрикция ДНК – *Age*I: 2 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D; 3 – pZEN33; 4 – *A. chrysogenum* 11550, 5–7 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP.

в то время как для штамма VKM F-4081D наблюдалось ее снижение (рис. 5).

В отобранных клонах *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_pZen33 уровень экспрессии *cefT* был повышен в 2–9 раз по сравнению с контрольным штаммом VKM F-4081D (рис. 5).

ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости полученных штаммов показал, что уро-

вень синтеза целевого метаболита цефС в рекомбинантных штаммах снижен на 25–35% по сравнению с исходным штаммом при одновременном увеличении выхода его предшественников – дезацетил- (ДАС), дезацетоксицефалоспорина С (ДАОС, рис. 6, табл. 3).

Полученные данные соответствуют современным моделям регуляции биосинтеза и транспорта

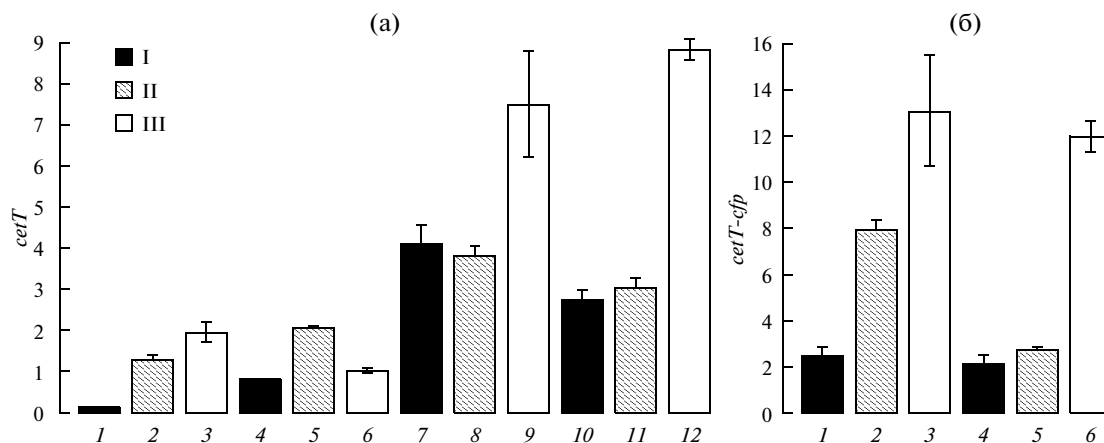


Рис. 5. Экспрессия *ceiT*, *ceiT-cfp* в штаммах *A. chrysogenum*.

а – нормализованная экспрессия *ceiT* в *A. chrysogenum* 0 (I), 48 (II), 120 ч (III): 1–3 – ATCC 11550, 4–6 – VKM F-4081D, 7–9 – VKM F-4081D\_CefT-CFP(6T2), 10–12 – VKM F-4081D\_CefT-CFP(6T1).

б – нормализованная экспрессия *ceiT-cfp* в *A. chrysogenum* 0 (I), 48 (II), 120 ч (III): 1–3 – VKM F-4081D\_CefT-CFP(6T2); 4–6 – VKM F-4081D\_CefT-CFP(6T1).

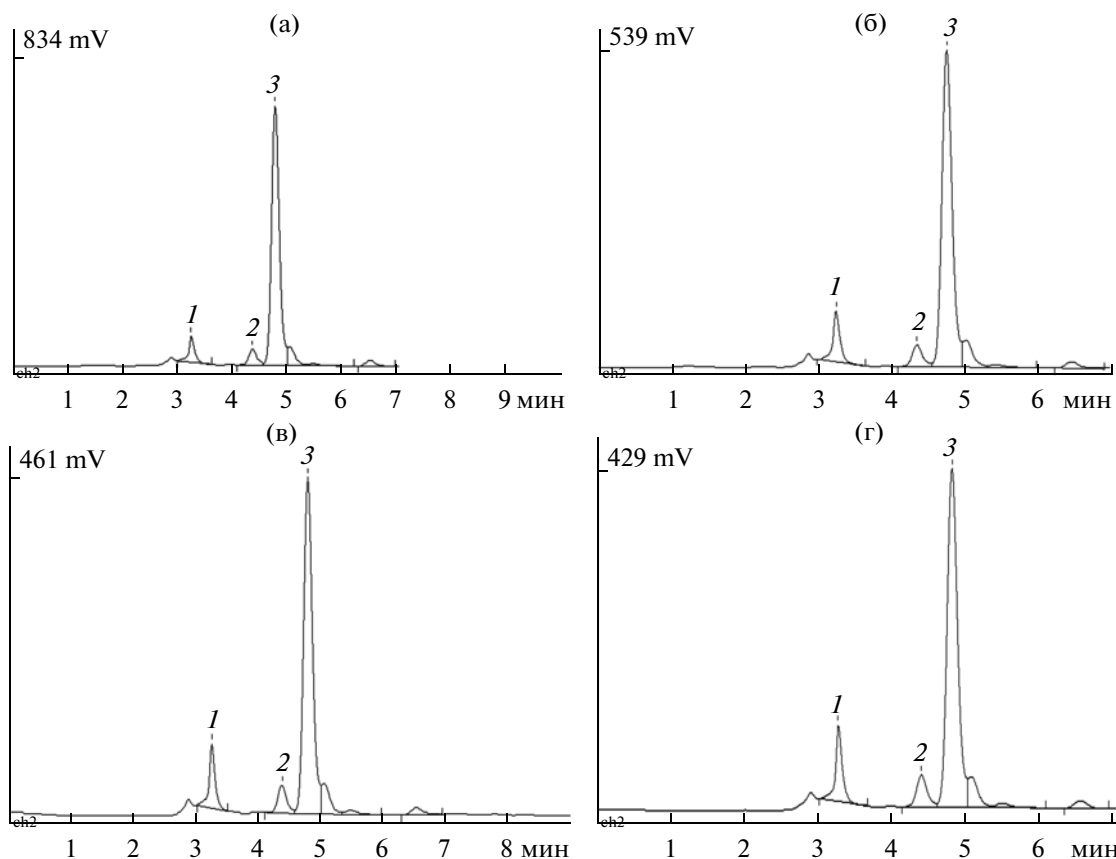


Рис. 6. ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *A. chrysogenum* VKM F-4081D\_CefT-CFP. 1 – дезацетилцефалоспориин С, 2 – дезацетоксцефалоспориин С, 3 – цефалоспориин С. *A. chrysogenum*: а – VKM F-4081D, б–г – D – VKM F-4081D\_CefT-CFP.

цефС с участием недавно открытого фактора CefR [9]. Согласно этой модели, снижение экспрессии *ceiT* к концу культивирования штаммов

*A. chrysogenum* должно коррелировать с низким содержанием промежуточных форм биосинтеза цефС, что подтверждается сравнением ВЭЖХ



**Таблица 3.** ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D\_CefT-CFP

Образец	Активность в пробе, мкг/мл	Среднее содержание цеф С, мкг/мл; (отношение к контролю, %)	(DAC+DAOC)/цефС, %
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D	8811	9015.25 (100.0%)	13.5
	8755		
	9117		
	9378		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_6	7106	6756.50 (–25.1%)	18.7
	6789		
	6580		
	6551		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_9	6153	5980.67 (–33.7%)	21.3
	6136		
	5653		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_20	6016	6538.00 (–27.5%)	28.4
	6491		
	7107		

профилей супернатантов штаммов ATCC 11550 и ВКМ F-4081D. Повышение экспрессии *cefT* под контролем конститутивного промотора *gpdA* в трансформантах штамма ВКМ F-4081D должно приводить к обратному эффекту, что и демонстрируют данные ВЭЖХ-анализа (рис. 6, табл. 3).

Надежды на использование гена *cefT* как перспективной мишени генетических манипуляций для создания рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* с повышенным уровнем продукции цефС связаны с ранними работами по изучению функций этого гена, проведенными на штамме *A. chrysogenum* C10 – “умеренном продуценте” с уровнем биосинтеза цефС порядка 1–2 мг/мл [5]. Способность CefT к транспорту производных цефС была показана и в исследованиях по метаболической инженерии *P. chrysogenum*, посвященных созданию рекомбинантных штаммов–продуцентов *ad7-ACSSA* (адилоил-7-амино-3-карбамоилоксиметил-3-цефем-4-карбоновой кислоты) [7]. На основании результатов этих работ было высказано предположение, что CefT является специфическим транспортером цефС, недостаток функции CefT должен приводить к накоплению цефС внутри клеток *A. chrysogenum*, приводя также к ингибированию активности CefEF – одного из белков, осуществляющих “поздние” реакции биосинтеза цефС. Таким образом, усиление экспрессии *cefT* должно обладать двояким позитивным эффектом – повышением “пропускной” способности системы транспорта цефС и эффективности биосинтеза цефС [7].

Полученные нами данные для штамма ВКМ F-4081D противоречат этой гипотезе. Конститутивная экспрессия *cefT-cfp* приводила к накоплению в культуральной среде рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* смеси пенамов (пенициллин N, изопенициллин N) и цефемов (дезацетил-, дезацетоксицефалоспорин, цефалоспорин С) – интермеди-

атов биосинтеза цефС. При этом выход конечного продукта цефС был снижен. Сходные результаты по снижению уровня продукции цефС при попытке сверхэкспрессии *cefT* в высокопродуктивном штамме *A. chrysogenum* были получены и другими авторами [8].

Эти данные, а также результаты исследования активности CefT в гетерологичной системе дрожжей-сахаромицетов свидетельствуют в пользу широкой субстратной специфичности изучаемого белка, способного осуществлять экспорт структурно-родственных β-лактамов, а также полиаминов, бромистого этидия, гигромицина В и, видимо, целого ряда других соединений. Различия в эффектах повышенной экспрессии *cefT* на штаммах “дикого типа”, умеренных продуцентах и высокоактивных штаммах не противоречат этой гипотезе и соответствуют современным представлениям о характере регуляции процессов биосинтеза и транспорта цефС в ходе антибиотикообразования у *A. chrysogenum* [9].

Таким образом, вопрос о существовании специфического транспортера цефС остается открытым. Отметим, что попытки обнаружения белков-транспортеров пенициллинов у *P. chrysogenum* также пока не увенчались успехом [25].

Очевидно, что идентификация, клонирование, разработка систем гетерологичной экспрессии новых белков-транспортеров бета-лактамовых антибиотиков должна иметь весьма существенное фундаментальное и прикладное значение. Немаловажную роль в этих исследованиях могут сыграть модельные системы структурно-функционального анализа мембранных транспортеров с использованием клеток сахаромицетов, эксперименты по созданию рекомбинантных промышленных штаммов грибов-продуцентов бета-лактамов подобные описанным в настоящей работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Программа “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы, соглашение № 8778).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demain A.L., Elander R.P. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 1–2. P. 5–19.
2. Elander R.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. № 5–6. P. 385–392.
3. Martín J.F., Ullán R.V., García-Estrada C. // Microbial. Biotechnol. 2010. V. 3. № 3. P. 285–299.
4. Van de Kamp M., Driessen A.J., Konings W.N. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 1–2. P. 41–78.
5. Ullán R.V., Liu G., Casqueiro J., Gutierrez S., Banuelos O., Martín J.F. // Mol. Gen. Genomics. 2002. V. 267. № 5. P. 673–683.
6. Teijeira F., Ullán R.V., Guerra S.M., García-Estrada C., Vaca I., Martín J.F. // Biochem. J. 2009. V. 418. № 1. P. 113–124.
7. Nijland J.G., Kovalchuk A., van den Berg M.A., Bovenberg R.A.L., Driessen A.J. // Fungal Genet. Biol. 2008. V. 45. № 10. P. 1415–1421.
8. Liu Y., Gong G., Xie L., Yuan N., Zhu C., Zhu B., Hu Y. // Mol. Biotechnol. 2010. V. 44. № 2. P. 101–109.
9. Teijeira F., Ullán R.V., Fernández-Aguado M., Martín J.F. // Metab. Eng. 2011. V. 13. № 5. P. 532–543.
10. Newton G.G., Abraham E.P. // Biochem. J. 1956. V. 62. № 4. P. 651–658.
11. Патент РФ. 2011. № 2426793.
12. Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R.A. // Biotechnology (NY). 1991. V. 9. № 10. P. 963–967.
13. Spencer F., Hugerat Y., Simchen G., Hurko O., Connelly C., Hieter P. // Genomics. 1994. V. 22. № 1. P. 118–126.
14. Decottignies A., Grant A.M., Nichols J.W., de Wet H., McIntosh D.B., Goffeau A. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 20. P. 12612–12622.
15. Khang C.H., Park S.Y., Rho H.S., Lee Y.H., Kang S. // Methods Mol. Biol. 2006. V. 344. № 2. P. 403–420.
16. Жгун А.А., Иванова М.А., Домрачева А.Г., Новак М.И., Эльдаров М.А., Скрябин К.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 663–670.
17. Kouprina N., Eldarov M., Moyzis R. // Genomics. 1994. V. 21. № 1. P. 7–17.
18. Felipe M.S.S., Rogelin R., Azevedo M.O., Astolfi-Filho S. // Biotechnol. Techniq. 1993. V. 7. № 9. P. 639–644.
19. Lu G., Moriyama E.N. // Brief Bioinform. 2004. V. 5. № 4. P. 378–88.
20. Díez B., Velasco J., Marcos A.T., Rodríguez M., de la Fuente J.L., Barredo J.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 54. № 6. P. 786–791.
21. Nelissen B., De Wachter R., Goffeau A. // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 21. № 2. P. 113–134.
22. Tomitori H., Kashiwagi K., Asakawa T., Kakinuma Y., Michael A.J., Igarashi K. // Biochem. J. 2001. V. 353. № 3. P. 681–688.
23. Tenreiro S., Vargas R.C., Teixeira M.C., Magnani C., Sá-Correia I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 327. № 3. P. 952–959.
24. Uemura T., Tachihara K., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 10. P. 9646–9652.
25. Fernández-Aguado M., Teijeira F., Martín J.F., Ullán R.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 2. P. 795–808.

## Functional Characteristic of the CefT Transporter of the MFS Family Involved in the Transportation of beta-lactam Antibiotics in *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae*

M. V. Dumina<sup>a</sup>, A. A. Zhgun<sup>a</sup>, I. V. Kerpichnikov<sup>a</sup>, A. G. Domracheva<sup>a</sup>, M. I. Novak<sup>a</sup>, A. Ya. Valiachmetov<sup>b</sup>, D. A. Knorre<sup>c</sup>, F. F. Severin<sup>c</sup>, M. A. Eldarov<sup>a</sup>, and Yu. E. Bartoshevich<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

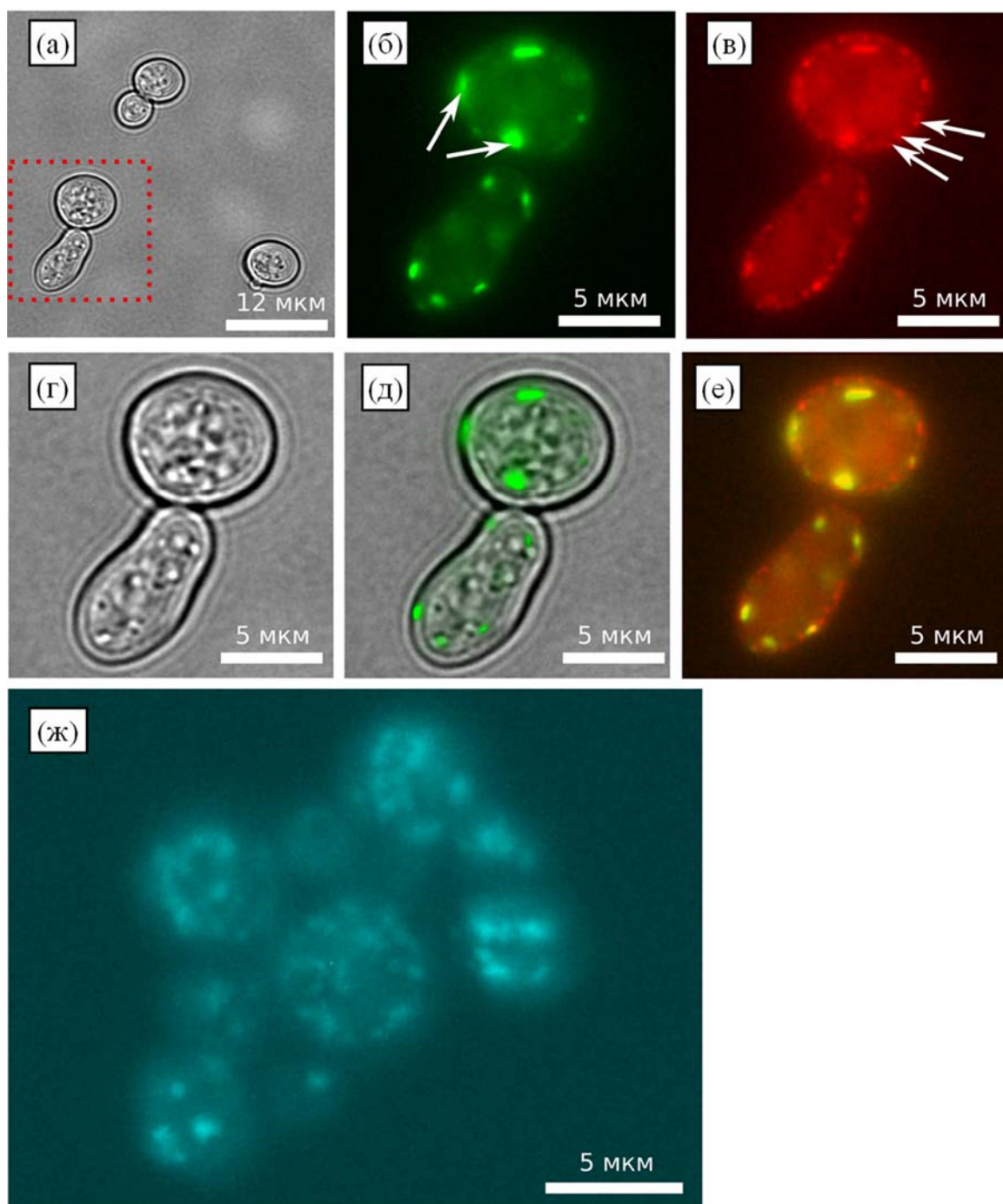
<sup>b</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

<sup>c</sup> Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

e-mail: DuminaMaria@gmail.com

Received December, 26, 2012

**Abstract**—Vectors for the expression of the CefT transporter of the MFS family in *Acremonium chrysogenum*—a producer of beta-lactam antibiotic cephalosporin C—and in *Saccharomyces cerevisiae* as a fusion with the cyan fluorescent protein (CFP) have been created. The subcellular localization of the CefT-CFP hybrid protein in yeast cells has been investigated. It was shown that the CefT-CFP hybrid protein is capable of complementation of the *qdr3*, *tpo1*, and *tpo3* genes encoding for orthologous MFS transporters of *Saccharomycetes*, making the corresponding strains resistant to spermidine, ethidium bromide, and hygromycin B. High-yield strain VKM F-4081D of *A. chrysogenum*, expressing the *cefT-cfp* fusion, was obtained by an agrobacteria conjugated transfer. It was also shown that the constitutive expression of *cefT* in *A. chrysogenum* VKM F-4081D led to a change in the biosynthetic profiles of cephalosporin C and its precursors. This resulted in a 25–35% decrease in the finite product accumulated in the cultural liquid with a simultaneous increase in the concentration of its intermediators.



**Рис. 2.** Флуоресцентный анализ образцов *S. cerevisiae* YPH857\_CefT-CFP/PMA1-YFP и AD1-8u<sup>+</sup>\_CefT-CFP. Набор фильтров U-N31044v2 и U-MNIBA3 (см. “Методика”):

а - е – коэкспрессия CefT-CFP (из *A. chrysogenum*) и PMA1-YFP (из *S. cerevisiae*) в *S. cerevisiae* YPH857. а – фотография в проходящем свете (выделена зона дальнейших исследований); б, в – флуоресцентный анализ *S. cerevisiae* YPH857\_CefT-CFP (зеленый) /PMA1-YFP (красный), стрелками указаны зоны свечения; г – фазовый контраст исследуемой области; д – наложение структуры клетки в проходящем свете (г) и флуоресценции CefT-CFP (б); е – наложение флуоресценций (оранжевый) CefT-CFP (б) и PMA1-YFP (в);

ж – флуоресценция CefT-CFP в клетках *S. cerevisiae* AD1-8u<sup>+</sup>\_pZEN35d.