

ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *SNORA STREPTOMYCES NOGALATER* В КЛІТИНАХ АКТИНОМІЦЕТІВ — ПРОДУЦЕНТАХ АНТРАЦИКЛІНОВИХ АНТИБІОТИКІВ

Д. О. Климишин

Інститут біології тварин НААН

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Досліджено вплив введення додаткових копій гена транскрипційного активатора структурних генів біосинтезу ногаламіцину на характер біосинтезу доксорубіцину та аранціаміцину в клітинах *S. peucetius* subsp. *caecius* та *S. echinatus* DSM40730 відповідно. Введення додаткових копій цього гена у складі кон'югаційного вектора *pKCEA* приводить до зростання рівня синтезу доксорубіцину, в той час як його експресія не впливає на синтез аранціаміцину в *S. echinatus* DSM40730.

Ключові слова: *STREPTOMYCES NOGALATER*, НОГАЛАМІЦИН, ПРОТИПУХЛИННІ АНТИБІОТИКИ

Одним із найважливіших напрямів досліджень вторинного метаболізму стрептоміцетів є вивчення генетичного контролю біосинтезу ними антибіотиків [1–4]. Ці експерименти відкривають широкі можливості спрямованого пошуку та створення штамів-надпродуцентів цих сполук [4, 7]. Без знання регуляторних процесів неможливі дослідження гетерологічної експресії генів біосинтезу антибіотиків, оскільки для їхньої ефективної транскрипції та трансляції необхідними є як певні умови в клітинах штама-господаря, так і наявність регуляторів, що активують транскрипцію досліджуваних генів [1, 3, 4]. Розуміння цих процесів дозволить розробити підходи щодо конструювання штамів із високим рівнем біосинтезу антибіотиків за рахунок маніпуляцій з окремими регуляторними генами.

Streptomyces nogalater IMET43360 є продуцентом протипухлинного антибіотика ногаламіцину, що належить до групи антрациклінових полікетидів. Він складається з полікетидного аглікону, глікозильованого цукровими залишками ногалози та ногаламіну. Ногаламіцин є активним щодо грам-позитивних бактерій, а також низки пухлинних ліній [5]. Окремі гени біосинтезу цього антибіотика ефективно використовуються у комбінаторному біосинтезі полікетидів [6, 7]. У хромосомі *S. nogalater* ідентифіковано ген *snorA* [7, 8]. Функція цього гена попередньо встановлена нами на основі результатів аналізу амінокислотної послідовності його продукту та спрямованої інактивації у хромосомі *S. nogalater* IMET43360 [8]. Ампліфікація генів, продукти яких позитивно регулюють біосинтез антибіотиків, в штаммах — продуцентах антибіотиків, як правило, підсилює рівень синтезу цих метаболітів [1, 3, 8]. Звичайні способи отримання надпродуцентів антибіотиків, такі як фізичний або хімічний мутагенез, не завжди можуть бути застосовані щодо рекомбінантних штамів через високу ймовірність втрати їх характеристик при обробці мутагенами. Тому надекспресія генів-регуляторів є зручним методом для створення надпродуцентів антибіотиків, отриманих методами генетичної інженерії.

Метою роботи було дослідження впливу введення додаткових копій гена *snorA* в клітини *S. peucetius* subsp. *caecius* та *S. echinatus* DSM40730, що є продуцентами доксорубіцину та аранціаміцину, відповідно. Очікується, що в результаті експресії буде отримано штам з підвищеним рівнем біосинтезу цих антрациклінових антибіотиків.

Матеріали і методи

У роботі використали штам дикого типу *S. nogalater* IMET43360 (продуцент ногаламіцину), *S. peucetius* subsp. *caecius* (продуцент доксорубіцину), *S. echinatus* DSM40730 (продуцент аранціаміцину), їхні похідні, а також штам *Escherichia coli*: *E. coli* DH5α (F⁺φ80d Δ(*lacZ*)M15 *recA1 endA1gyrA96thi1deoR(lacZYA-argF)* U169), *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9(Cm^r) dcm-6 hsdM*), що містить кон'югативну плазмиду *pUB307* (похідна плазмиди *RK2*). Штами актиноміцетів та їхні похідні, а також *E. coli*, *Bacillus subtilis* VKM428 та *Sarcina lutea* KA37 зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів — продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка.

S. nogalater та його похідні вирощували на вівсяному та кукурудзяному середовищах [9] та в рідких середовищах TSB, SG [10] за температури 28 °C; а *E. coli*, *B. subtilis* та *S. lutea* — на LA та LB за температури 37 °C [9].

Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК проводили за [14].

Трансформацію *E. coli* проводили згідно стандартної “кальцієвої” методики [10]. Кон'югацію *E. coli* — *S. nogalater* IMET43360 проводили як описано [11]. Кон'югацію *E. coli* — *S. nogalater* SRN73 проводили з використанням у схрещуваннях міцелію рекомбінантного штаму. Для цього культуру *S. nogalater* SRN73 вирощували в рідкому середовищі TSB 48 годин за температури 30 °C і заморожували за температури 20 °C.

Перед схрещуванням міцелій розморожували, 2 мл культури висівали в колбу з 18 мл середовища TSB і вирощували 16 годин за температури 30 °С. Потім 1 мл культури переносили в колбу з середовищем TSB і підросували ще 16 годин за тої ж самої температури. Вирощений за таких умов міцелій, використовували для проведення схрещувань.

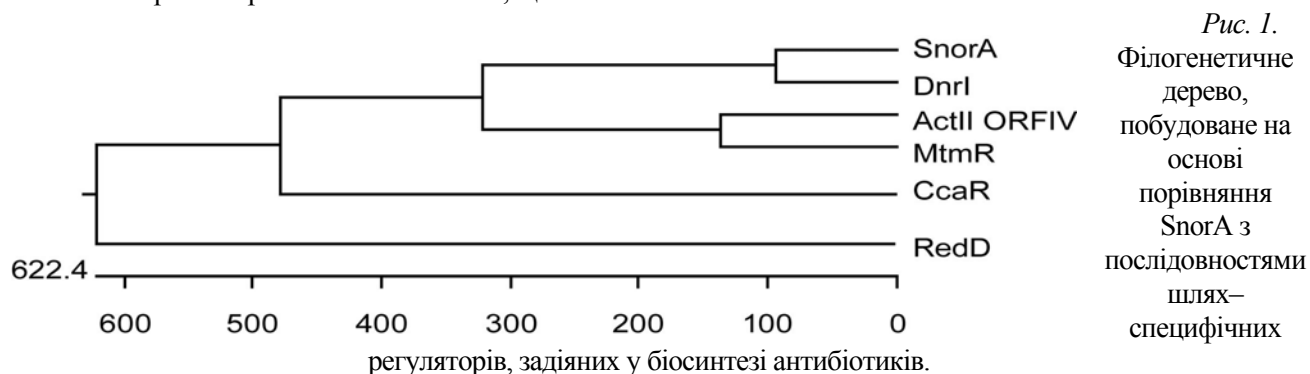
Антибіотичну активність штамів *S. nogalater* та *S. echinatus* вивчали методом дифузії в агар з використанням тест-культури *Sarcina lutea*, а *S. peucetius* з використанням *B. subtilis*. Штами стрептоміцетів вирощували в рідкому середовищі SG та екстрагували ногаламіцин та аранціаміцин з культурального середовища хлороформом (1:1), а доксорубіцин — згідно з [12]. Екстракти сушили за температури 37 °С, сухий залишок розчиняли в метанолі, та накладали на середовище LA з 0,7%-им агаром, що містив клітини тест-культур (10^9 к.у.о.). Чашки інкубували за температури 28 °С на протязі 12 и 72 г. Продуктивність штамів (ПІ) оцінювали як відношення діаметра зони пригнічення росту тест-культури до сухої ваги міцелію, з якого екстрагували антибіотики.

Первинний аналіз нуклеотидних послідовностей та визначення сайтів впізнавання для ендонуклеаз рестрикції проводили за допомогою програм DNA-Star та VECTOR NTI.

Результати й обговорення

Продукт гена *snorA* має високий ступінь гомології з регуляторними білками SARP-родини (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein), що контролюють біосинтез антибіотиків у низки стрептоміцетів [1, 3, 4]. Найближчим гомологом виявився регулятор біосинтезу доксорубіцину DnrI у *S. peucetius* subsp *caesius* (63 % ідентичності, 72 % гомології) (Рис. 1) [13]. Цей білок є транскрипційним фактором, що взаємодіє з короткими ділянками ДНК та з РНК-полімеразою, активуючи експресію низки структурних генів біосинтезу доксорубіцину. Вторинна та третинна структура DnrI добре вивчена, відомі домени, задіяні у розпізнаванні та зв'язуванні з ДНК і РНК-полімеразою [13].

З огляду на високу гомологію між продуктом гена *snorA* та позитивними регуляторами родини SARP, ідентифікованих в геномах *S. peucetius* subsp *caesius*, а також *S. echinatus* DSM40730, було вирішено здійснити його гетерологічну експресію у цих штамів. Для цього використали плазмиду рKCEA [8], у якій ген *snorA* клоновано під контролем конститутивного промотора гена резистентності до еритроміцину *Sacch. erythraea*. Плазмиду рKCEA перенесено у клітини досліджуваних актиноміцетів за допомогою кон'югації з *E. coli* ET12567 та отримано рекомбінантні штамів, що містять копії гена *snorA*.



Ми дослідили антибіотичну активність одержаних штамів. Отримані результати вказують на зростання рівня синтезу доксорубіцину у штамі *S. peucetius* рKCEA⁺ (рис. 2. А), в той час як наявність гена *snorA* у клітинах *S. echinatus* не впливала на рівень біосинтезу аранціаміцину (рис. 2. Б).

Зростання рівня синтезу доксорубіцину при введенні додаткових копій *snorA* можна пояснити високою гомологією DnrI та SnorA, а отже і здатністю останнього активувати транскрипцію структурних генів біосинтезу антибіотика.

Введення додаткових копій гена *snorA* у складі кон'югаційних векторів приводить до зростання рівня синтезу ногаламіцину у клітинах штама дикого типу *S. nogalater* IMET43360 [8]. Ми дослідити вплив цього гена на рівень синтезу ногаламіцину штамом *S. nogalater* SRN73. Цей штам є УФ-індукованим похідним *S. nogalater* IMET43360 та характеризується підвищеним рівнем синтезу антибіотика порівняно із диким типом. Виходячи з цього припустили, що при перенесенні плазмиди рKCEA [8] у клітини *S. nogalater* SRN73 буде можливим отримати штам із ще вищим рівнем синтезу ногаламіцину.

Проте у низці експериментів із перенесення рекомбінантної плазмиди рKCEA у клітини *S. nogalater* SRN73 нам не вдалося отримати транскон'югантів із цієї плазмидою. Слід зазначити, що перенесення екзогенних молекул ДНК з *E. coli* ET12567 у низку штамів актиноміцетів (*S. lividans*, *S. globisporus* 1912, *S. kanamyceticus* 1) проводиться із використанням для схрещування спор реципієнтних штамів [9]. Штам *S. nogalater* SRN73 не спорює на жодному з випробуваних нами середовищ (вівсяне, кукурудзяне, мінімальне середовище Хопвуда, НА), що, можливо, є причиною того, що нам не вдалося отримати

транскон'юганти з плазмідною рКСЕА, а також з нативним вектором рКC1218E, що, зазвичай, переноситься у клітини дикого типу *S. nogalater* IMET43360 з частотою $2,8 \times 10^{-5}$.

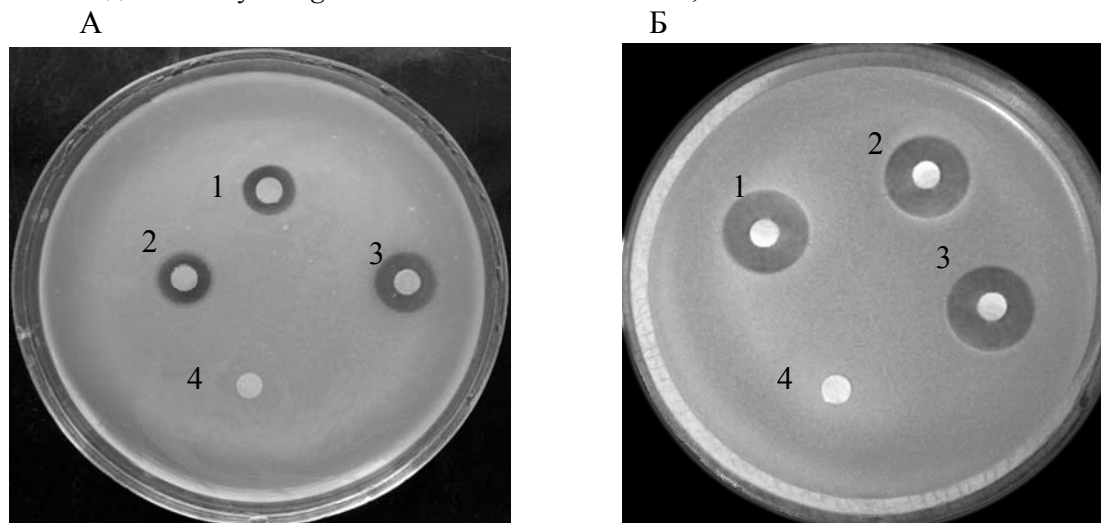


Рис. 2. Пригнічення росту тест-культури екстрактами штамів: (А) *S. peucetius* subsp *caesius* (1), *S. peucetius* pKC1218E⁺ (2) та *S. peucetius* pKCEA⁺ (3); (Б) *S. echinatus* DSM40730 (1), *S. echinatus* pKC1218E⁺ (2) та *S. echinatus* pKCEA⁺ (3); диск на який нанесено розчинник (4).

Використавши міцелій для проведення схрещування в системі *E. coli* ET12567 — *Streptomyces*, А.М. Лужецьким та співавторами розроблено методику перенесення рекомбінантних молекул ДНК у клітини *S. cyanogenus* S136, для якого також не описано факту спороутворення на вищезгаданих середовищах. Проте і ця модифікація методу не дала позитивних результатів із SRN73. Очевидно, що наявність спор реципієнтного штаму *S. nogalater* є необхідною умовою ефективного проходження процесу кон'югаційного перенесення екзогенних молекул ДНК у його клітини.

Висновки

Здійснено гетерологічну експресію гена *snorA*, клонованого з хромосоми *S. nogalater* IMET43360, у клітинах *S. peucetius* subsp *caesius* та *S. echinatus* DSM40730, продуцентах протипухлинних антибіотиків доксорубіцину та аранціаміцину відповідно. Показано, що введення додаткових копій цього гена у складі кон'югаційного вектора рКСЕА приводить до зростання рівня синтезу доксорубіцину, в той час як його експресія не впливає на синтез аранціаміцину в *S. echinatus* DSM40730.

Перспективи подальших досліджень. Експресія генів шлях-специфічних регуляторів за гетерологічних умов відкриває широкі можливості для отримання штамів з підвищеним рівнем синтезу антрациклінових антибіотиків у клітинах стрептоміцетів.

D. O. Klymyshin

EXPRESSION OF THE SNORA GENE FROM *STREPTOMYCES NOGALATER* IN THE ACTINOMYCETES — PRODUCERS OF ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS

Summary

The effect of the introduction of additional copies of a transcriptional activator gene nogalamycin biosynthesis on the nature of doxorubicin synthesis and aranciamycin in cells *S. peucetius* subsp *caesius* and *S. echinatus* DSM40730, respectively was investigated. Introduction of additional copies of this gene within the vector pKCEA leads to increasing in the synthesis of doxorubicin, while its expression does not affect the synthesis of aranciamycin in *S. echinatus* DSM40730.

Д. А. Климишин

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *SNORA* *STREPTOMYCES NOGALATER* В КЛЕТКАХ АКТИНОМИЦЕТОВ — ПРОДУЦЕНТАХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Аннотация

Исследовано влияние введения дополнительных копий гена транскрипционного активатора структурных генов биосинтеза ногаламицину на характер биосинтеза доксорубицина и аранциамицину в клетках *S. peucetius* subsp *caesius* и *S. echinatus* DSM40730 соответственно. Введение дополнительных копий этого гена в составе конъюгационного вектора рКСЕА приводит к повышению уровня синтеза доксорубицина, в то время как его экспрессия не влияет на синтез аранциамицину у *S. echinatus* DSM40730.

2. Bignell D. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG* / D. Bignell, K. Tahlan, K. R. Colvin et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. — 49. — P. 1529–1541.
3. Rebets Yu. DNA-binding activity of LndI protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 / Yu. Rebets, B. Ostash, A. Luzhetskyy et al. // Microbiology. — 2005. — 151. — P. 281–290.
4. Rebets Y. Function of *lanI* in regulation of landomycin A biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136 and cross-complementation studies with *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins encoding genes / Y. Rebets, L. Dutko, B. Ostash et al. // Arch. Microbiol. — 2008. — 189. — P. 111–120.
5. Li H. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives / H. Li, C. Krueger // Pharm. Ther. — 1991. — 51. — P. 239–255.
6. Torkkell S. The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of 20-kb DNA region and generation of hybrid structures / S. Torkkell, T. Kunnari, K. Palmu et al. // Mol. Gen. Genet. — 2001. — 266. — P. 276–288.
7. Ylihonko K. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway / K. Ylihonko, J. Tuikkanen, S. Jussila et al. // Mol. Gen. Genet. — 1996. — 251. — P. 113–120.
8. Klymyshin D. Role of the *snorA* gene in the nogalamycin biosynthesis by *Streptomyces nogalater* Lv65 / D. Klymyshin, T. Gren, V. Fedorenko // Microbiology. — 2011. — 80. № 4. — P. 496–501.
9. Федоренко В. О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. — Л. : Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 277с.
10. Kieser T. Practical *Streptomyces* genetics / T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood/ — Norwich: John Innes Found., 2000. — 634 p.
11. Климишин Д. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК в штам *Streptomyces nogalater* IMET 43360 / Д. Климишин, О. Громико, В. Федоренко // Цит. и генет. 2007. — 41. № 5. — С. 263–267.
12. Дубицька Л. П. Конструювання штамів *Streptomyces peucetius subsp. caesi* ATCC27952-2 з підвищеною здатністю перетворювати даунорубіцин в доксорубіцин / Л. П. Дубицька, В. О. Федоренко // Біополімери і клітина. — 2002. — 18. № 2. — С. 91–95.
13. Li T. Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius* / T. Li, A. Grimm, Z. Ying-Xin, C. R. Hutchinson // Mol. Microbiol. — 1996. — 22. — P. 801–813.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії живлення овець та вовноутворення, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Гавриляк В. В.