

ГОМОЛОГИ ГЛОБАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *bldD* У
ACTINOPLANES: АНАЛІЗ *IN SILICO*

Н. Забуранний¹, Б. Осташ¹, Л. Горбаль¹, А. Лужецький², С. Шулга³, В. Федоренко¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bohdanostash@gmail.com

²Гельмгольц-інститут фармацевтичних досліджень,
Кампус Саарландського Університету
Будинок С2.3, 66123 Саарбрюкен, Німеччина

³Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України
вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

Продуктом глікопептидного антибіотика тейкопланіну, який використовують як “останню лінію оборони” проти мультирезистентних коків, є бактерія *Actinoplanes teichomyceticus*. Кластер генів біосинтезу цього антибіотика (*tcp*) клоновано вісім років тому. Тим не менше, на даний момент немає даних про регуляцію біосинтезу цієї сполуки і загалом про геномну організацію, оскільки до недавнього часу не проводилися генетичні маніпуляції зі штамами *A. teichomyceticus*. У актиноміцетів глобальні регуляторні *bld*-гени координують як морфогенез, так і синтез антибіотиків. У *Streptomyces coelicolor* ідентифіковано більше 10 *bld*-локусів, і вони формують так званий каскад *bld*-генів, який дає змогу стрептоміцетам адаптуватися до мінливих умов середовища. Ген *bldD* кодує білок, розміщений у кінці сигнального каскаду. Його продукт – ключовий репресор генів морфологічної диференціації та антибіотикоутворення протягом вегетативного розвитку. У статті ми опишемо аналіз геному *A. teichomyceticus* на присутність компонентів *bld*-каскаду та детальніший аналіз причетності BldD до регуляції біосинтезу тейкопланіну. У роботі використано раніше описані в геномах стрептоміцетів консенсусні послідовності операторів, з якими взаємодіє білок BldD. Декілька ймовірних операторів BldD знайдено у межах *tcp*-кластера, що свідчить про його регуляцію за допомогою BldD. Використовуючи підходи порівняльної геноміки, ми виявили усі гени BldD-каскаду в частково секвеннованому геномі *A. teichomyceticus*. Загалом, наші дані вказують на те, що BldD-залежна регуляція присутня не лише у видах роду *Streptomyces*, але й у представників роду *Actinoplanes*.

Ключові слова: *Actinoplanes*, тейкопланін, BldD, аналіз геному.

Використання антибіотиків неминуче призводить до появи стійких до них штамів мікроорганізмів [1]. Тому, поряд із раціональним використанням відомих медпрепаратів, великого значення набуває дослідження усіх аспектів відкриття і продукції нових антибіотиків у актинобактерій – класу бактерій, із яких виділено найбільшу кількість медично важливих антибіотичних сполук [2, 3]. Вивчення генетичних механізмів регуляції їхнього утворення посідає чільне місце. Розуміння генетичних факторів, що впливають на синтез антибіотика, дає змогу розробити раціональні підходи до його надпродукції, а відтак – і економічно виправданого виробництва [3]. Однак, незважаючи на докладені зусилля, сучасне розуміння генетичних механізмів регуляції біосинтезу більшості класів антибіотиків дуже фрагментарне. Вивчення регуляції експресії генів продуцента тейкопланінів *Actinoplanes teichomyceticus* [4, 5] дасть змогу використати ці знання

для конструювання покращених продуцентів цього важливого класу глікопептидних антибіотиків. У цій роботі ми наводимо біоінформатичні докази існування каскаду регуляторних *bld*-генів у геномі *A. teichomyceticus*, що ймовірно задіяні і в контролі біосинтезу тейкопланінів.

Матеріали та методи

Геном *A. teichomyceticus* NRRL-B16726 секвеновано, використовуючи методику Illumina [6] у фірмі Seq-IT (Німеччина). Деталі секвенування геному *A. teichomyceticus* NRRL-B16726 буде опубліковано окремо. Амінокислотні послідовності білків BldD та продуктів інших генів, а також нуклеотидні послідовності генів отримано із www.streptomyces.org.uk та бази даних NCBI. Програми blast2seq та CLUSTALW для попарного та множинного порівняння використовували на веб-сайтах NCBI та www.ebi.ac.uk, відповідно. Вагові матриці для операторної послідовності BldD побудовано за допомогою програм MEME [7] і TFBS [8] та зображено за допомогою WebLogo [9]. Ортологію білків визначали на основі результатів реципрокних пошуків BLAST. PSIPRED використано для аналізу вторинної структури білка (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

Результати і їхнє обговорення

На даний час немає опублікованої послідовності геному *A. teichomyceticus*, тому ми його секвенували, використовуючи метод зворотної термінації (Illumina) із покриттям $\times 570$. У такому стані невідомою залишається послідовність 5% геному продуцента. Проте якість секвенування достатня для початкового аналізу та скринінгу ортологів *bld*-генів. Використовуючи послідовності *bld*-генів із модельного об'єкта генетики актиноміцетів *S. coelicolor*, ми змогли ідентифікувати ортологи всіх цих генів у штамі *A. teichomyceticus*. Результати представлено у таблиці.

Попарне порівняння *bld*-генів *A. teichomyceticus* та *S. coelicolor*

<i>bld</i> -гени із <i>A. teichomyceticus</i>	<i>bld</i> -гени із <i>S. coelicolor</i>	Ідентичність послідовності, %	e-значення	Синтенія
<i>bldA</i> 83 п.н.	<i>bldA</i> 87 п.н.	76	$4e^{-14}$	–
<i>bldB</i> 228 п.н.	<i>bldB</i> 297п.н.	42	$2e^{-13}$	–
<i>bldD</i> 492п.н.	<i>bldD</i> 504п.н.	67	$5e^{-71}$	+
<i>bldC</i> 213п.н.	<i>bldC</i> 207п.н.	83	$4e^{-38}$	+
<i>bldG</i> 360п.н.	<i>bldG</i> 360п.н.	64	$3e^{-49}$	+
<i>bldKA</i> 1011п.н.	<i>bldKA</i> 1032п.н.	42	$8e^{-88}$	+
<i>bldM</i> 852п.н.	<i>bldM</i> 612п.н.	82	$5e^{-32}$	+
<i>bldN</i> 948п.н.	<i>bldN</i> 795п.н.	68	$6e^{-93}$	–

З цього можна зробити висновок, що регуляторний каскад, у якому задіяні *bld*-гени, представлений не лише у стрептоміцетів, а й серед інших актинобактерій, таких як актиноплани. У подальшому ми зосередилися на аналізі гена *bldD*, оскільки він є глобальним негативним регулятором морфологічної диференціації стрептоміцетів, і показали його репресорну роль у біосинтезі антибіотиків [10]. Гомологи *bldD* виявлено в геномах інших актиноміцетів [11, 12, 13]. Наприклад, у *Saccharopolyspora erythraea* BldD регулює біосинтез еритроміцину, взаємодіючи з промоторами генів *ery*-кластера [13]. Отже, геном *A. teichomyceticus* містить ген, ймовірним продуктом якого є BldD-подібний білок, що на 67% ідентичний до ортолога з *S. coelicolor* (рис. 1), і ці гени перебувають у синтенічних ділянках геномів *A. teichomyceticus* та *S. coelicolor*. Цей регулятор є висококонсервативним серед актинобактерій. Як показав аналіз вторинної структури амінокислотних послідовностей за допомогою PsiPred, він містить ДНК-зв'язувальний мотив «спіраль-поворот-спіраль».



Рис. 1. Множинне порівняння ДНК-зв'язувального домену BldD із актинобактерій *Sacch. erythraea*, *Kitasatospora setae*, *A. teichomyceticus*, *A. missouriensis* і *Actinoplanes sp.* SE50/110. Прямокутником позначено α -спіралі, а стрілкою – β -структури.

Відомі операторні послідовності, що можуть розпізнаватися білком BldD (BldD-бокси) для *Actinoplanes* отримано із наявних джерел [10] для побудови вагових матриць (рис. 2, а). Вагову матрицю у вигляді WebLogo представлено на рис. 2, б.

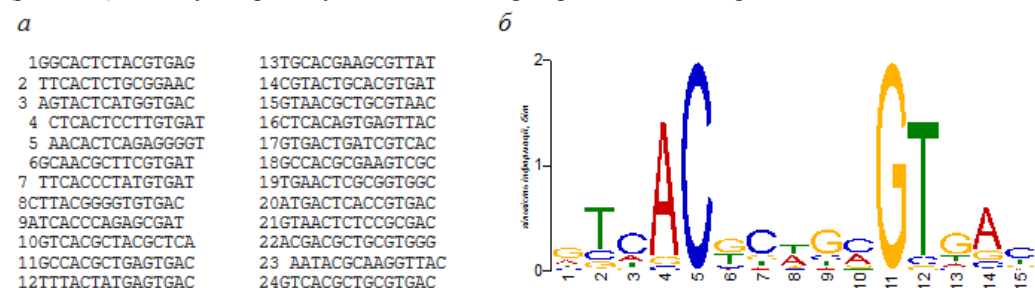


Рис. 2. BldD-бокси, що виявлені у доступних геномах *Actinoplanes* (а), та їхня вагова матриця у вигляді WebLogo (б). Вісь абсцис – позиція BldD-бокса, ординат – частота трапляння (у бітах).

Цю матрицю використано для пошуку операторних ділянок BldD у *tcp*-кластері за допомогою програми FIMO [14]. Так виявлено 3 потенційні BldD-бокси у промоторних ділянках генів *tcp9*, *tcp28* та *tcp29* (рис. 3). Перший є геном нерибосомної пептидсинтази, тоді як два останні – шлях-специфічними регуляторами біосинтезу тейкопланіну [15]. У промоторі гена *tcp28* знайдено мотив, розташований у ділянці між сайтами зв'язування білка-регулятора AdpA [16] та ймовірною точкою ініціації транскрипції гена. Цей факт вказує, що ген *bldD* може відігравати репресорну роль у синтезі тейкопланіну, як це показано для продуцента еритроміцину *Sacch. erythraea* [13].

Відомо, що BldD є білком, здатним до авторепресії [17]. Наш аналіз виявив сайти BldD-бокси у промоторі власного гена, що підтверджує припущення про таку авторегуляцію у досліджуваному штамі *A. teichomyceticus* (рис. 4).

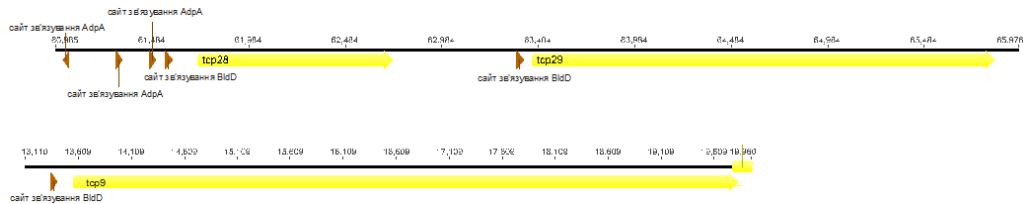


Рис. 3. Розташування BldD-боксів і операторної послідовності AdpA у *tcp*-кластері. Мотиви показані як стрілки. Масштабні лінійки вказано у парах нуклеотидів.

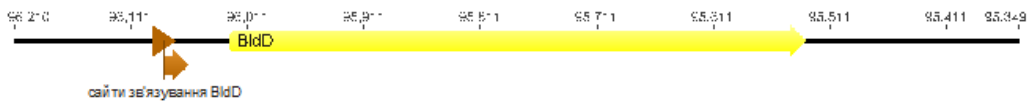


Рис. 4. Розташування BldD-боксів у промоторній ділянці гена *bldD*. Мотиви показані як стрілки. Масштабні лінійки вказані у парах нуклеотидів.

Отже, в результаті цієї роботи у геномі *A. teichomyceticus* ідентифіковано ортологи усіх *bld*-генів *S. coelicolor*. Наведено біоінформатичні докази того, що в *A. teichomyceticus* ортолог BldD *S. coelicolor* може бути задіяний у регуляції продукції тейкопланіну.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Butler M. S., Cooper M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011 // J. Antibiot. 2011. Vol. 64. P. 413–425.
2. Hopwood D. A. Therapeutic treasures from the deep // Nat. Chem. Biol. 2007. Vol. 3. P. 457–458.
3. van Wezel G. P., McKenzie N. L., Nodwell J. R. Chapter 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics // Methods Enzymol. 2009. Vol. 458. P. 117–141.
4. Jung H.-M., Jeva M., Kim S.-Y. et al. Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 82. P. 57–69.
5. Somma S., Gastaldo L., Corti A. Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. // Antimicrob. Agents Chemother. 1984. Vol. 26. P. 917–923.
6. Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P. et al. Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry // Nature. 2008. Vol. 456. P. 53–59.
7. Bailey T. L., Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers // Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 1994. Vol. 2. P. 28–36.
8. Lenhard B., Wasserman W. W. TFBS: Computational framework for transcription factor binding site analysis // Bioinformatics. 2002. Vol. 18. P. 1135–1136.
9. Crooks G. E., Hon G., Chandonia J. M., Brenner S. E. WebLogo: a sequence logo generator // Genome Res. 2004. Vol. 14. P. 1188–1190.
10. denHengst C. D., Tran N. T., Bibb M. J. et al. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth // Mol. Microbiol. 2010. Vol. 78. P. 361–379.
11. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // J. Bacteriol. 2008. Vol. 190. P. 4050–4060.
12. Omura S., Ikeda H., Ishikawa J. et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 12215–12220.

13. Chng C., Lum A. M., Vroom J. A., Kao C. M. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 1346–1351.
14. Grant C. E., Bailey T. L., Noble W. S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif // Bioinformatics. 2011. Vol. 27. P. 1017–1018.
15. Sosio M., Kloosterman H., Bianchi A. et al. Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus* // Microbiol. 2004. Vol. 150. P. 95–102.
16. Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J. Y. et al. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor **regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolis-**min *Streptomyces griseus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. Vol 69. P. 431–439.
17. Elliot M. A., Locke T. R., Galibois C. M., Leskiw B. K. BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer // FEMS Microbiol Lett. 2003. Vol. 8. P. 35–40.

Стаття: надійшла до редакції 20.12.12

доопрацьована 14.02.13

прийнята до друку 20.02.13

HOMOLOGUES OF GLOBAL REGULATORY GENE *bldD* IN *ACTINOPLANES*: ANALYSIS *IN SILICO*

N. Zaburannyi¹, B. Ostash¹, L. Horbal¹, A. Luzhetskyy², S. Shulga³, V. Fedorenko¹

¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bohdanostash@gmail.com

²Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research, Saarl and Campus
Building C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany

³Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine
2a, Osypovskiyi St., Kyiv 04123, Ukraine

Actinoplanes teichomyceticus is the producer of glycopeptide antibiotic teicoplanin, which is used as a **“last line of defence” against multiresistant cocci. Gene cluster for biosynthesis of this compound (*tcp*)** was cloned eight years ago. Still, currently there are no data about **the regulation of biosynthesis of this antibiotic and about the overall genome organisation**, as until recently there were no report on successful genetic manipulations of *A. teichomyceticus*. In actinomycetes, global regulatory *bld*-genes coordinate the morphogenesis, but also antibiotic biosynthesis. There are more than 10 *bld* loci identified in model strain *S. coelicolor*, and they form so-called *bld* cascade, which permits Streptomycetes to adapt to variable environmental conditions. The *bldD*-encoded protein, is situated at the bottom of the **cascade. It’s product is a key repressor of the genes responsible for morphological differentiation and antibiotic biosynthesis during the vegetative growth.** In this paper, we describe the analysis of the *A. teichomyceticus* genome for presence of *bld* cascade components and more detailed analysis of the putative involvement of BldD in the teicoplanin biosynthesis regulation. Known operator consensus sequences for BldD were used, that were previously described for *Streptomyces* genomes. Several probable operator sequences for BldD were found in *tcp* cluster, which may point to the control of BldD over this biosynthetic pathway.

Using comparative genomics approaches, we were able to identify all genes of *bld* cascade in partially sequenced *A. teichomyceticus* genome. In all, our data suggest that BldD-dependent regulation is present not only in of *Streptomyces*, but also in the *Actinoplanes*.

Keywords: *Actinoplanes*, teicoplanin, BldD, genomeanalysis.

ГОМОЛОГИ ГЛОБАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *bldD* У *ACTINOPLANES*: АНАЛИЗ *IN SILICO*

Н. Забуранний¹, Б. Осташ¹, Л. Горбаль¹, А. Лужецкий², С. Шульга³, В. Федоренко¹

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: bohdanostash@gmail.com

²Гельмгольц-институт фармацевтических исследований Саарланда,
Саарланд-кампус, д.С2.3, 66123 Саарбрюкен, Германия

³Институт пищевой биотехнологии и геномики НАНУ
ул. Осиповского, 2а, Киев 04123, Украина

Продуцентом гликопептидного антибиотика тейкопланина, использующегося как «последняя линия обороны» против мультирезистентных кокков, является бактерия *Actinoplanes teichomyceticus*. Кластер генов биосинтеза этого антибиотика (*tcp*) клонирован восемь лет назад. Однако в настоящее время отсутствуют данные не только о регуляции биосинтеза этого соединения, но и об организации генома *A. teichomyceticus*, поскольку до недавнего времени не проводились генетические манипуляции с этим видом. Глобальные регуляторные *bld*-гены координируют как морфогенез, так и синтез антибиотиков у актиномицетов. У модельного штамма *S. coelicolor* идентифицировано более 10 *bld*-локусов, которые формируют каскад *bld*-генов, играющий важную роль в его адаптации к изменчивым условиям среды. Ген *bldD* кодирует белок, расположенный в конце сигнального каскада. Его белковый продукт – ключевой репрессор генов морфологической дифференциации и антибиотикообразования в ходе вегетативного развития. В статье проведены биоинформатический анализ генома *A. teichomyceticus* с целью обнаружения компонентов *bld*-каскада и оценка возможного участия BldD в регуляции биосинтеза тейкопланина. В анализе использованы консенсусные последовательности операторов, с которыми взаимодействует белок BldD, обнаруженные ранее в геномах стрептомицетов. Несколько вероятных операторов-мишеней BldD найдены нами в кластере *tcp*, что указывает на участие транскрипционного фактора BldD в регуляции его экспрессии. Используя подходы сравнительной геномики, в частично секвенированном геноме *A. teichomyceticus* мы обнаружили все гены BldD-каскада. В целом, наши данные указывают на то, что BldD-зависимая регуляция существует не только в видах рода *Streptomyces*, но и в роде *Actinoplanes*.

Ключевые слова: *Actinoplanes*, тейкопланин, BldD, геномный анализ.