

УДК: 575.224+577.21

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ГЕНА *SNUGL* У БІОСИНТЕЗІ НОГАЛАМІЦИНУ
У *STREPTOMYCES NOGALATER*

Д. Климишин^{*, **}, Т. Грень^{*}, В. Федоренко^{*}

^{*}Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: dedima@rambler.ru

^{**}Інститут біології тварин УААН

вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна

З кластера генів біосинтезу ноґаламіцину клоновано 2,4 т.п.н.-фрагмент хромосоми *Streptomyces nogalater* ІМЕТ43360, що містить ген *snogL*. Для дослідження ролі цього гена у біосинтезі ноґаламіцину створено конструкцію для його спрямованої інактивації в хромосомі *S. nogalater*. Цю конструкцію перенесено в клітини штаму-продуцента ноґаламіцину шляхом кон'югації з *Escherichia coli*. У результаті спрямованої інактивації гена *snogL* отримано штам *S. nogalater* L1. Показано, що спрямована інактивація гена *snogL* не призводить до зміни антибіотичної активності штаму *S. nogalater* L1 порівняно з диким типом.

Ключові слова: *Streptomyces nogalater*, ноґаламіцин, метилтрансферази, кон'югація.

Виявлення та вивчення генів метилтрансфераз, які модифікують цукрові залишки антрациклінових антибіотиків, становить значний теоретичний і практичний інтерес. Увага до цих генів зумовлена тим, що активність метилтрансфераз у формуванні функціональних груп є важливою для визначення біологічної активності різних антибіотиків. За гетерологічних умов такі білки часто виявляють субстратну "гнучкість", у результаті чого різні цукрові залишки в молекулах антибіотиків можуть сприйматися цими ферментами як субстрати. Одержання мутацій у генах О-метилтрансфераз дає змогу отримувати штами, що є продуцентами нових антибіотиків зі зміненими хімічними та біологічними властивостями [7].

Штам *S. nogalater* ІМЕТ43360 є продуцентом антибіотика антрациклінової групи ноґаламіцину, активного щодо багатьох грампозитивних бактерій, а також деяких видів пухлин [2–4]. Завдяки високій протипухлинній активності, а також низькій токсичності для організму людини, його похідні знайшли застосування у хімотерапії раку [5, 6]. Потреба у нових антибіотиках стимулює дослідження штамів-продуцентів і всіх аспектів синтезу цих сполук. Саме тому надзвичайно перспективним є дослідження генів біосинтезу ноґаламіцину. Це дасть змогу глибше дослідити генетичний контроль його продукції та отримати нові похідні цього антибіотика.

Метою цієї роботи було вивчення гена *snogL*, що кодує імовірну О-метилтрансферазу, яка може бути задіяна у біосинтезі ноґалоци – цукрового залишку в молекулі ноґаламіцину у *S. nogalater* ІМЕТ43360. Детальні функції продукту цього гена у біосинтезі антибіотика є нез'ясованими [8]. Порівняння амінокислотних послідовностей продукту гена *snogL* із послідовностями білків у базі даних BLAST виявило, що його найближчим гомологом є TylF (273 а.к.з.), що каталізує реакцію 3-О-метилування тилозину у *S. fradiae* [8].

Очікується, що аналіз штамів *S. nogalater*, які несуть зруйнований алель гена *snogL*, дасть змогу з'ясувати, який етап біосинтезу ногаламіцину він контролює (рис. 1), а також оцінити можливість спрямованої інактивації цього гена для отримання нових антрациклінових антибіотиків.

У роботі використали штам дикого типу *S. nogalater* IMET43360 (продуцент ногаламіцину), а також штами *Escherichia coli*: *E. coli* DH5 α (F ϕ 80d Δ (*lacZ*) M15 *resA1 endA1 gyrA96 thi1 deoR* (*lacZYA-argF*) U169), *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9(Cm^r) dcm-6 hsdM*), що містить кон'югативну плазмиду рUB307 (похідна плазмиди RK2). Штам *S. nogalater* і його похідні, а також *E. coli* та *Sarcina lutea* зберігаються у Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка. Для клонування фрагментів кластера біосинтезу ногаламіцину в роботі використано плазмиди рBluescript II KS/SK (+) [3] та рKC1139 [4].

S. nogalater IMET43360 та його похідні вирощували на вівсяному середовищі [3] та в рідких середовищах TSB, SG [4] при температурі 28°C; а *E. coli* та *S. lutea* – на LA та LB при температурі 37°C [3].

Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК проводили за [4]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили, як вказано у [3, 4] з використанням ПЛР-робота MiniCycler (“MJ Research”, США).

Трансформацію *E. coli* проводили згідно зі стандартною “кальцієвою” методикою [3]. Кон'югацію *E. coli* – *S. nogalater* проводили як описано [1, 2].

Антибіотичну активність штамів *S. nogalater* вивчали методом дифузії в агар з використанням тест-культури *S. lutea*. Антибіотик екстрагували з рідкого середовища SG хлороформом, розчиняли у метанолі й переносили на паперові диски. Диски накладали на середовище з тест-культурою. Індекс продуктивності (ІП) визначали як відношення діаметра зони пригнічення росту тест-культури до діаметра диска з антибіотиком. Тонкошарову хроматографію (ТШХ) екстрактів антибіотиків проводили на селікагелевих пластинках Silufol, у системі розчинників хлороформ:метанол:етанол:дистильована вода (120:25:6:4,5). Детекцію антибіотиків проводили у видимому й ультрафіолетовому (λ 254 нм) світлі.

Аналіз нуклеотидних послідовностей та визначення сайтів упізнання для ендонуклеаз рестрикції проводили за допомогою програм DNA-Star та VECTOR NTI.

У кластері генів біосинтезу ногаламіцину між генами *snogM* і *snoT* раніше було ідентифіковано відкриту рамку зчитування, позначену як *snogL*, що кодує білок розміром 273 а.к.з [6, 8]. Ми порівняли ймовірний продукт трансляції *snogL* з амінокислотними послідовностями, наявними в електронних базах даних GenBank. Ре-

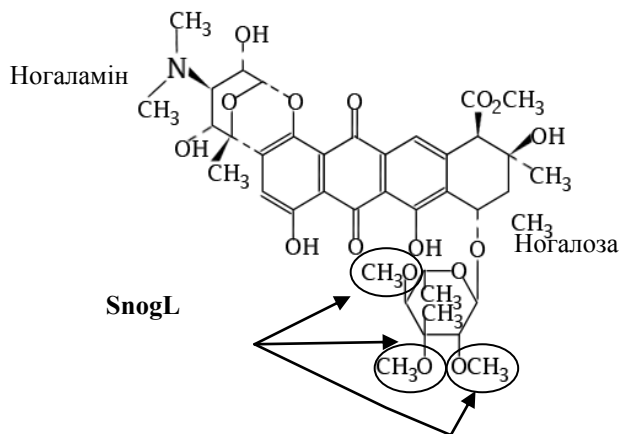


Рис. 1. Будова молекули ногаламіцину. *SnogL* – O-метилтрансфераза ногаламіцину. Стрілками вказано ймовірні позиції метилування ногалози.

зультати цих порівнянь показують високу подібність білка SnogL до О-метилтрансфераз, ідентифікованих у кластерах генів біосинтезу інших антибіотиків. Результати порівняння цих білків вказують на те, що ген *snogL* може кодувати S-аденозинзалежну О-метилтрансферазу (рис. 2). Однак комп'ютерний аналіз і порівняння нуклеотидних послідовностей є методом визначення ймовірних функцій генів, які слід підтвердити або спростувати шляхом більш детальних генетичних експериментів. Найбільш інформативним методом вивчення функцій гена є його спрямована інактивація у хромосомі та проведення подальшого біологічного аналізу. Таким чином, з'являється можливість встановити безпосередній зв'язок між геном і його функцією. З цією метою ми клонували ген *snogL* з хромосоми *S. nogalater*. Для ампліфікації ділянки хромосоми *S. nogalater*, що включає імовірний ген О-метилтрансферази *snogL*

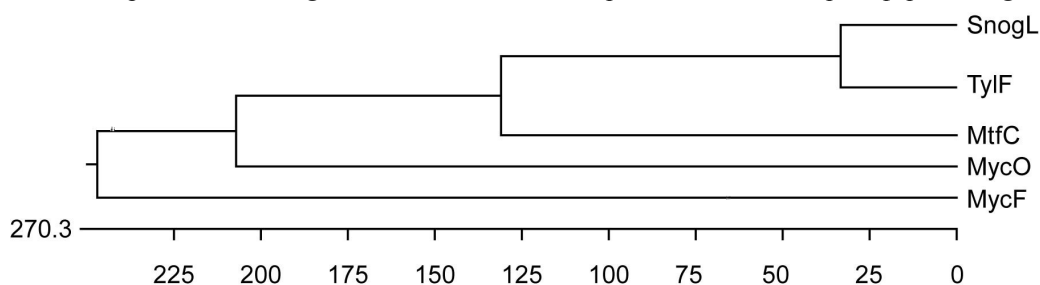


Рис. 2. Філогенетичне дерево, побудоване на основі порівняння SnogL з амінокислотними послідовностями білків, задіяних у біосинтезі антибіотиків: SnogL – імовірна О-метилтрансфераза, виявлена у *S. nogalater*, TylF – О-метилтрансфераза *S. fradiae*, MysO – О-метилтрансфераза *Micromonospora griseorubida*, MtfC – О-метилтрансфераза *Mycobacterium avium*, MysF – О-метилтрансфераза *S. mycarofaciens*.

(рис. 3, А), нами було використано метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Як матрицю у ПЛР використали сумарну ДНК, виділену з клітин *S. nogalater* IMET43360. Отриманий у ПЛР-реакції фрагмент хромосоми *S. nogalater* розміром 2,4 т.п.н. клонувано у вектор pBluescript KS/SK (+). Так було отримано плазмиду pBluesnogL. Для подальшого конструювання ми обробили плазмиду pBluesnogL ендонуклеазами рестрикції EcoRI та HindIII з подальшим елююванням фрагмента, що містить ген *snogL*. Елюювану ділянку клонувано як EcoRI-HindIII фрагмент у човниковий вектор pKC1139 з термочутливим репліконом pSG5. Мутантний алель гена *snogL* отримано клонуванням у його кодуєчу послідовність вставки генної касети стійкості до спектиноміцину (*aadA*) з плазмиди pHP45Ω [3]. Отримана плазміда, в кодуєчій послідовності гена *snogL*, містить унікальний сайт впізнавання для ендонуклеази рестрикції BamHI. Цю плазмиду розщеплено BamHI та лігровано з BamHI-фрагментом, що містить ген стійкості до спектиноміцину *aadA* (2,0 т.п.н). У результаті ми отримали плазмиду pKL::*aadA* розміром 10,9 т.п.н. (рис. 3, Б). Будову цієї плазмиди підтверджено рестрикційним аналізом.

Отриману плазмиду pKL::*aadA* перенесено у штам *S. nogalater* IMET43360 за допомогою кон'югації з *E. coli*. Частота отримання апраміцин-резистентних транскон'югантів *S. nogalater* IMET43360 становила $3,0 \times 10^{-7}$. Для відбору мутантного штаму *S. nogalater snogL::aadA* зі зруйнованим геном О-метилтрансферази, транскон'юганти *S. nogalater* IMET43360, що містили плазмиду pKL::*aadA*, вирощували в рідкому середовищі TSB протягом трьох діб при температурі 39°C. Ця температура є непермісивною для реплікації цієї плазмиди, сконструйованої на основі вектора pKC1139 з термочутли-

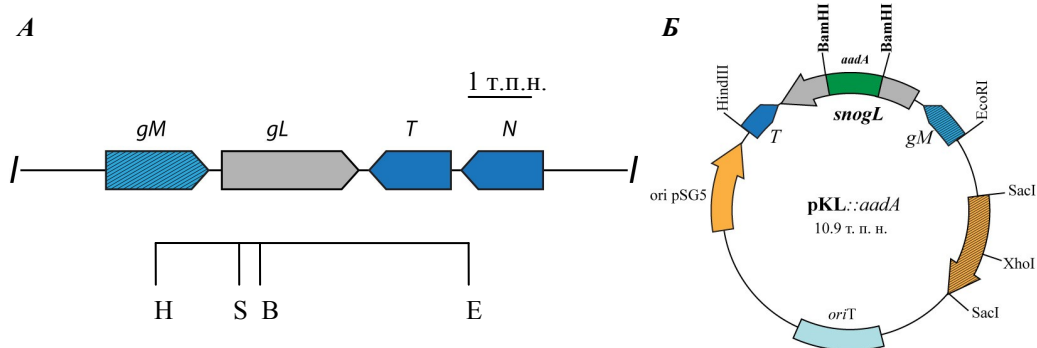


Рис. 3. А. Фрагмент кластера генів біосинтезу ногаламіцину, який включає ген *snogL*. На рисунку вказано лише сайти впізнання ендонуклеазами рестрикції, що використані у роботі: E – *EcoRI*, S – *SacI*, B – *BamHI*; H – *HindIII*; *gM* – *snoM*, *gL* – *snogL*, *T* – *snoT*, *N* – *snoN*; Б. Будова плазмиди *pKL::aadA oriT* – ділянка, що забезпечує кон'югаційне перенесення плазмиди в клітині актиноміцетів, *ori pSG5* – ділянка початку реплікації плазмиди в клітинах актиноміцетів.

вим репліконом *pSG5* [3]. Аналіз отриманих клонів надав змогу розділити їх на два класи. Представники першого класу були спектиноміцин- і апраміцин-стійкими, що виникли як результат проходження одинарного кросинговеру між гомологічними ділянками в хромосомі *S. nogalater* та плазмиді *pKL::aadA*. Клони другого класу виявляли фенотип спектиноміцин-стійкості і апраміцин-чутливості, що виникли як результат подвійного кросинговеру. Один із клонів другого класу, позначений як L1 (рис. 4), із заміщеним геном *snogL* на *snogL::aadA*, був відібраний для подальшого аналізу.

Антибіотичну активність штаму L1 визначали за індексом продуктивності (ІП) – відношенням діаметра пригнічення росту тест-культури до діаметра паперового диска, на який наносили екстракт антибіотиків. Як тест культуру було використано *S. lutea*, а як контроль – екстракт антибіотиків, одержані зі штаму *S. nogalater* IMET43360. Як видно з рис. 5, А, середнє значення ІП для штамів *S. nogalater* IMET43360 та L1 суттєво не відрізняється і становить 2,3.

Для аналізу екстрактів антибіотиків, що продукуються штамми *S. nogalater* IMET43360 та L1, нами було використано метод ТШХ. Результати ТШХ зображено на рис. 5, Б. Аналіз штаму L1 за допомогою ТШХ довів,

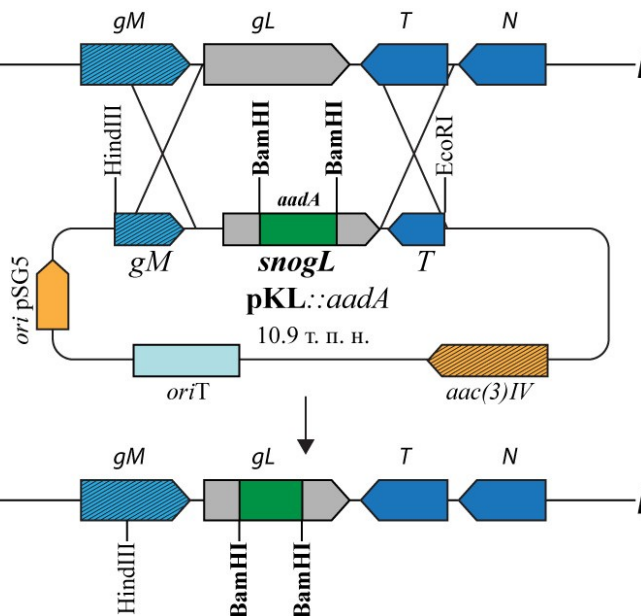


Рис. 4. Схема подвійного кросинговеру між хромосомою штаму *S. nogalater* IMET43360 та плазмидою *pKL::aadA*, що призвів до утворення штаму L1.

що заміщення гена *snogL* на зруйнований алель *snogL::aadA* не призвів до припинення синтезу ноґаламіцину штамом L1. Проте, використовуючи цей метод, не вдалося встановити, чи нокаут гена ймовірної O-метилтрансферази *snogL* приводить до продукції нових сполук.

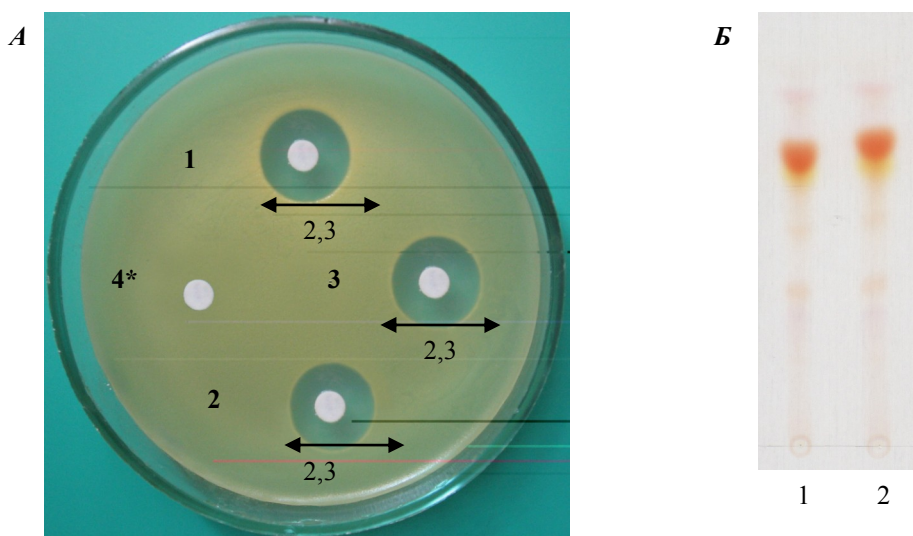


Рис. 5. А. Результати біотесту екстрактів антибіотиків штамів *S. nogalater* IMET43360 (1) *S. nogalater* pKC1139⁺ (2), *S. nogalater* L1 (3); Б. Результати ТШХ аналізу штамів *S. nogalater* pKC1139⁺ (1), *S. nogalater* L1 (2) антибіотична; * – контроль (диск + метанол).

Таким чином, інактивація гена ймовірної O-метилтрансферази *snogL* у штамі L1 не впливає на активність синтезованих ним сполук. Отриманий результат свідчить про те, що реакція метилування ноґалози ноґаламіцину не є ключовою у визначенні його біологічної активності. Ці дані збігаються з даними літератури, зокрема, з дослідженням метилування молекули антибіотика елораміцину у *Streptomyces olivaceus* [7]. За допомогою ТШХ показано, що спрямована інактивація гена *snogL* у хромосомі *S. nogalater* також не змінює спектр синтезованих одержаним штамом полікетидів. Очікується, що подальший детальний аналіз сполук, очищених зі штаму L1, дасть змогу з'ясувати їхню хімічну природу та спектр біологічних активностей.

1. Климишин Д., Громико О., Федоренко В. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК в штам *Streptomyces nogalater* IMET 43360 // Цитологія і генетика. 2007. Т. 41. С. 263–267.
2. Луґеєцький А. Н., Остап Б. Е., Федоренко В. А. Межродовая конъюгация *Escherichia coli* – *Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 и ее производных // Генетика. 2001. Т. 37. С. 1340–1347.
3. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.
4. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
5. Li H. Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // Pharm. Ther. 1991. Vol. 51. P. 239–255.

6. *Torkkell S., Kunnari T., Palmu K. et al.* The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of 20-kb DNA region and generation of hybrid structures // *Mol. Gen. Genet.* 2001. Vol. 266. P. 276–288.
7. *Patallo E. P., Blanco G., Fischer C. et al.* Deoxysugar methylation during Biosynthesis of the antitumor polyketide elloramycin by *Streptomyces olivaceus* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 18765–18774.
8. *Ylihonko K., Tuikkanen J., Jussila S. et al.* A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway // *Mol. Gen. Genet.* 1996. Vol. 251. P. 113–120.

INVESTIGATION OF *SNOGL* GENE, INVOLVED IN NOGALAMYCIN BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES NOGALATER* IMET43360

D. Klymyshin***, T. Gren*, V. Fedorenko*

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
**Institute of Animal Biology
38, Stoos St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: dedima@rambler.ru

A 2,4 kb fragment, containing *snogL* gene was cloned from the *Streptomyces nogalater* IMET43360 chromosome. For *snogL* gene inactivation pKL::*aadA* plasmid was constructed. This plasmid was transferred into *Streptomyces nogalater* IMET43360 strain using conjugation from *E. coli*. As a result of the directed inactivation of *snogL* gene, *S. nogalater* L1 strain was constructed. It was shown that knockout of *snogL* do not occur on the antibiotic activity of *S. nogalater* L1.

Key words: *Streptomyces nogalater*, nogalamycin, methyltransferases, conjugation.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНА *SNORL* В БИОСИНТЕЗЕ НОГАЛАМИЦИНА У *STREPTOMYCES NOGALATER* IMET43360

Д. Климишин*, **, Т. Грень*, В. Федоренко*

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
**Институт биологии животных УААН
ул. Стуса, 38, Львов, Украина
e-mail: dedima@rambler.ru

Клонирован 2,4 т.п.н.- фрагмент хромосомы *Streptomyces nogalater* IMET43360, который содержит ген *snogL*. Для исследования роли этого гена в биосинтезе ногаламицина создана конструкция для его направленной инактивации в хромосоме *S. nogalater*. Эта конструкция перенесена в клетки штамма-продуцента ногаламицина методом конъюгации из *Escherichia coli*. В результате “нокаута” гена *snogL* получен рекомбинантный штамм *S. nogalater* L1. Показано, что направленная инактивация гена *snogL* не изменяет антибиотическую активность штамма *S. nogalater* L1 по сравнению со штаммом дикого типа.

Ключевые слова: *Streptomyces nogalater*, ногаламицин, метилтрансферазы, конъюгация.

Стаття надійшла до редколегії 29.09.09

Прийнята до друку 17.12.09