

Генетика

УДК: 575.224+577.21

КЛОНУВАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ГЕНА *snorA*, ІМОВІРНОГО АКТИВАТОРА  
ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ БІОСИНТЕЗУ 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

Методом полімеразної ланцюгової реакції клоновано 2,4 т.п.н.-фрагмент кластера генів біосинтезу ногаламіцину, що включає ген *snorA*. Цей ген субклонувано у човниковому векторі рКС1218Е. Створену конструкцію перенесено в клітини штаму-продуцента ногаламіцину *Streptomyces nogalater* ІМЕТ43360 шляхом кон'югації з *Escherichia coli*. Показано, що введення додаткових копій гена *snorA* в клітини дикого типу приводить до зростання рівня синтезу ногаламіцину.

**Ключові слова:** *Streptomyces nogalater*, ногаламіцин, регуляція біосинтезу антибіотиків, кон'югація.

Міцеліальні бактерії роду *Streptomyces* є важливим об'єктом генетики та біотехнології, що пов'язано з їхньою здатністю синтезувати велику кількість вторинних метаболітів, провідне місце серед яких займають клінічно важливі антибіотики [6, 7, 10]. Вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків є надзвичайно актуальним завданням і потребує розуміння механізмів регуляції біосинтезу цих сполук.

Регуляція біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів – це складний ферментативний процес, для забезпечення якого необхідна узгоджена робота великої кількості генів, серед яких важливу роль відіграють регуляторні гени [6, 7, 10, 13]. Вирішальна роль в ініціації синтезу певного продукту вторинного метаболізму належить шлях-специфічним регуляторним білкам [6, 7, 10, 11, 13]. Сприймаючи сигнали від регуляторів вищих рівнів, ці білки запускають експресію структурних генів біосинтезу антибіотиків [6].

У кластерах генів біосинтезу антибіотиків виявлено декілька шлях-специфічних регуляторних генів: *actII-orfIV* у біосинтезі актинородину [7], *dnrI* у біосинтезі даунорубіцину [13], *mtmR* у біосинтезі мітраміцину [10], *lndI* та *lanI* у біосинтезі ландоміцинів Е та А [11, 12], відповідно та ін. Функціонування цих генів було встановлено в експериментах із їхньої спрямованої інактивації та гетерологічної експресії, а введення додаткових копій генів шлях-специфічних регуляторів дало змогу отримати штами з підвищеним рівнем біосинтезу важливих у лікуванні раку антибіотиків [7, 10].

Штам *Streptomyces nogalater* ІМЕТ43360 продукує антрацикліновий протипухлинний антибіотик ногаламіцин (рис. 1). 7-R-O-метилногарол, який отримують внаслідок хімічної деградації ногаламіцину, володіє високою активністю щодо низки пухлинних ліній, а також низькою токсичністю, і є одним із найважливіших препаратів у хіміотерапії раку [9, 14]. Значною перешкодою для широкого застосування цього препарату є низький рівень біосинтезу вихідного антибіотика штамом *S. nogalater*, а також складність його промислового одержання [9].

Кластер генів біосинтезу ногаламіцину було клоновано та секвеновано [13]. Встановлено, що він складається з 35 генів і охоплює 38 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) хромосоми *S. nogalater* [14]. Одним із генів, що міститься в *sno*-кластері, є *snorA* [15]. Конкретна функція цього гена у біосинтезі ногаламіцину остаточно не встановлена.

Метою нашої роботи було клонування гена *snorA* та введення його додаткових копій у клітини *S. nogalater* IMET43360. Очікується, що в результаті цього підходу буде можливим отримати штами *S. nogalater*, з підвищеним рівнем синтезу ногаламіцину, а також допоможе дослідженню

конкретних функцій білкового продукту гена *snorA* у біосинтезі цього антибіотика. Вивчення механізмів регуляції біосинтезу ногаламіцину сприятиме глибшому розумінню загальних аспектів генетичного контролю продукції антрациклінових антибіотиків.

У роботі використали штам дикого типу *S. nogalater* IMET43360 (продуцент ногаламіцину), а також штами *Escherichia coli*: *E. coli* DH5 $\alpha$  (F $\phi$ 80d  $\Delta$ (*lacZ*)M15 *recA1 endA1 gyrA96 thi1 deoR(lacZYA-argF)* U169), *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9(Cm')* *dcm-6 hsdM*), що містить кон'югативну плазмиду pUB307 (похідна плазмиди RK2). Штам *S. nogalater* та його похідні, а також *E. coli* та *Sarcina lutea* зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка. Для клонування фрагментів кластера біосинтезу ногаламіцину в роботі використано плазмиди pBluescript II KS/SK (+) [4] та pKC1218E [4, 8].

*S. nogalater* та його похідні вирощували на вівсяному та кукурудзяному середовищах [4] і в рідких середовищах TSB, SG [4] при температурі 28°C; а *E. coli* та *S. lutea* – на LA та LB при температурі 37°C [4, 8].

Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК проводили за [4, 8].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили як вказано у [4] з використанням ПЛР-робота MiniCycler ("MJ Research", США).

Трансформацію *E. coli* проводили згідно зі стандартною "кальцієвою" методикою [4, 8]. Кон'югацію *E. coli* – *S. nogalater* проводили, як описано [2, 3]. 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 та 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 диску з антибіотиком. Тонкошарову хроматографію 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 та ультрафіолетовому ( $\lambda$  254 нм) світлі. Первинний аналіз нуклеотидних послідовностей і визначення сайтів упізнання для ендонуклеаз рестрикції проводили за допомогою програм DNA-Star та VECTOR NTI.

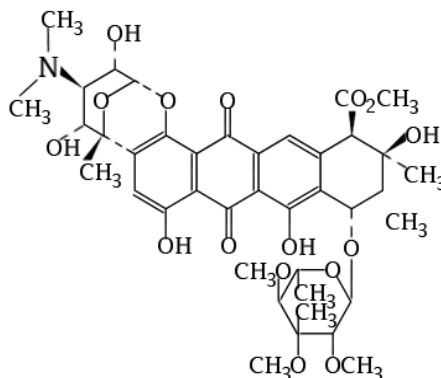


Рис. 1. Будова молекули ногаламіцину.



З цією метою, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), ми ампліфікували ділянку хромосоми *S. nogalater*, що містить ген *snorA* (рис. 3, А). Як матрицю використано сумарну ДНК, виділену зі штаму дикого типу *S. nogalater* IMET43360. Для проведення ПЛР-реакції використано олігонуклеотидні праймери SnoAF і SnoAR, які містили сайти впізнання для ендонуклеази рестрикції EcoRI.

У результаті проведення ПЛР-реакції було ампліфіковано фрагмент розміром 2,4 т.п.н., що містить ген *snorA* (рис. 3, Б). У нашій роботі для здійснення ПЛР-реакції використали Taq-полімеразу. Однією з особливостей цієї полімерази є те, що вона володіє екстендажною активністю та здатна додавати до кінців ПЛР-продуктів 3'-виступаючі аденінові залишки [4].

Проте, якщо до реакційної суміші замість суміші нуклеотидтрифосфатів (дНТФ) додати лише тимінові нуклеотидтрифосфати (дТТФ) – фермент використовуватиме лише їх. Цю властивість Taq-полімерази можна успішно застосовувати для клонування ампліфікованих фрагментів у Т/А-векторах [4]. Для створення відповідного Т/А-вектора ми обробили плазмиду рBluescript II KS/SK (+) ендонуклеазою рестрикції EcoRV та провели ПЛР-реакцію з використанням лише тимінових нуклеотидів, що приєднуються Taq-полімеразою до кінців лінеаризованого вектора. Отриманий у результаті цих маніпуляцій вектор рBluescript з 3'-виступаючими Т-нуклеотидами не здатний до самолігування і тому лігується лише з *snorA*-фрагментом, розміром 2,4 т.п.н., що містить на своїх кінцях виступаючі аденінові залишки. Правильність отриманої у результаті цих маніпуляцій конструкції рBluesnorA, розміром 5,4 т.п.н., було доведено рестрикційним аналізом.

Для експресії гена *snorA* у клітинах *S. nogalater* IMET43360 ми використали реплікативний човниковий вектор рКС1218Е. Експресія генів, клонованих у складі цього вектора, відбувається з конститутивного промотора гена резистентності до еритроміцину *ermE*р *Saccharopolyspora erythraea* [8]. Вибір цього вектора також зумовлений його здатністю підтримуватись у клітинах багатьох видів стрептоміцетів, включаючи і

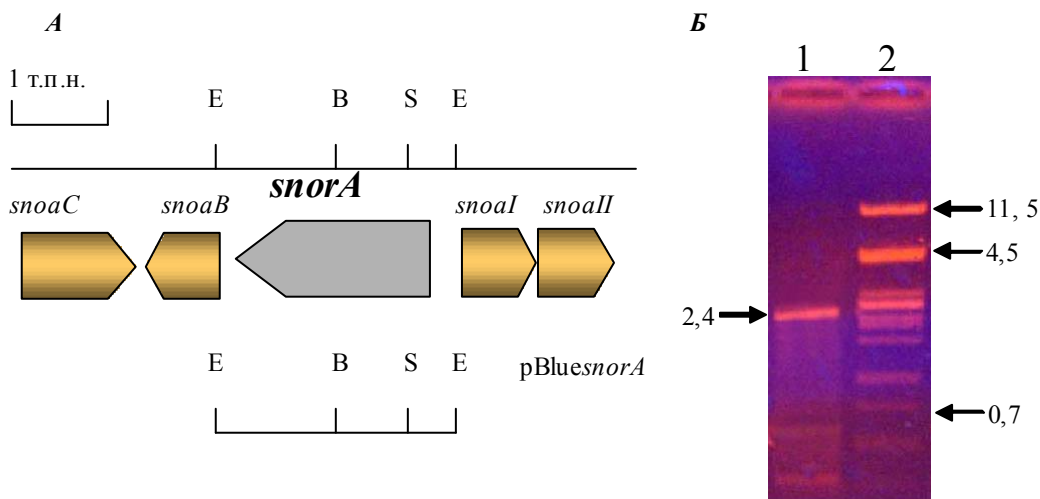


Рис. 3. А. Схематичне зображення фрагменту кластера генів біосинтезу ноґаламіцину, який включає ген *snorA*. Вказано лише сайти впізнання ендонуклеазами рестрикції, що використовувались у цій роботі: Е – сайт впізнання ендонуклеазою рестрикції EcoRI, S – SacI, В – BamHI; Б. Електрофореграма продуктів ПЛР: 1 – отриманих з використанням пари праймерів SnoAF, SnoAR, 2 – PstI-фрагменти ДНК бактеріофага  $\lambda$ . Розмір вказано у т.п.н.

*S. nogalater*, що було доведено у наших попередніх дослідженнях [1, 2]. Для створення такої конструкції плазмиду рBlue*snorA* обробили ендонуклеазою рестрикції *EcoRI* та елюювали фрагмент розміром 2,4 т.п.н. Цей фрагмент лігували з лінеаризованим вектором рКC1218E, також обробленим цією ендонуклеазою рестрикції. Лігазною сумішшю трансформували штам *E. coli* DH5 $\alpha$  та відбирали білі апраміцин-стійкі клони, плазмідну ДНК з яких аналізували за допомогою рестриктаз. У результаті було отримано плазмиду рКC1218*EsnorA*, розміром 8,4 т.п.н., що містила необхідний для експресії фрагмент хромосоми *S. nogalater* (рис. 4, А). Будову цієї плазмиди було підтверджено рестрикційним аналізом (рис. 4, Б). Так, після обробки плазмиди рКC1218*EsnorA* ендонуклеазою рестрикції *EcoRI* відбувається її розщеплення з утворенням двох фрагментів, розміром 2,4 та 6,0 т.п.н. (рис. 4, Б, доріжка 2). При обробці плазмиди ендонуклеазою рестрикції *XbaI* відбувається її лінеаризація з утворенням фрагмента розміром 8,4 т.п.н. (рис. 4, Б, доріжка 3). Плазміда рКC1218*EsnorA* містить три сайти впізнавання для ендонуклеази рестрикції *SacI*. Обробивши плазмиду цією ендонуклеазою, отримали три фрагменти розміром 5,0 т.п.н. 2,7 т.п.н. 0,7 т.п.н. (рис. 4, Б, доріжка 4), що збігається з передбачуваною структурою цієї плазмиди.

Наступним кроком роботи було перенесення отриманої рекомбінантної плазмиди рКC1218*EsnorA* у клітини штаму *S. nogalater* ІМЕТ43360 шляхом кон'югації з *E. coli* ET12567(pUB307). Цей штам несе плазмиду рUB307, яка містить гени *tra* плазмиди RK2. Продукти цих генів забезпечують кон'югаційне перенесення корезидентних плазмід з *E. coli* в клітини широкого кола актиноміцетів [3].

За допомогою кон'югації плазмиду рКC1218*EsnorA* було перенесено у клітини штаму *S. nogalater* ІМЕТ43360. У результаті кон'югації було одержано апраміцин-резистентні транскон'юганти *S. nogalater* з частотою  $4,0 \times 10^{-7}$ . Наявність плазмиди в отриманих рекомбінантних штаммах *S. nogalater* рКC1218*EsnorA* було підтверджено

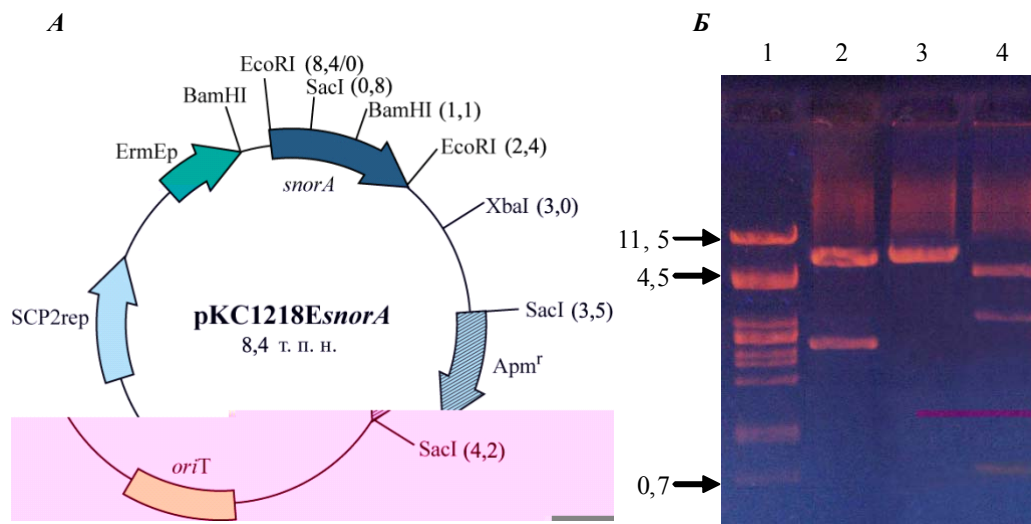


Рис. 4. А. Фізична карта плазмиди рКC1218*EsnorA*. *Apm<sup>f</sup>* – ген стійкості до апраміцину, SCP2rep – реплікон плазмиди SCP2; Б. Електрофореграма фрагментів плазмиди рКC1218*EsnorA*: 1 – PstI-фрагменти ДНК бактеріофага  $\lambda$ ; 2 – рКC1218*EsnorA*, розщеплена ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*; 3 – рКC1218*EsnorA*, розщеплена *XbaI*; 4 – рКC1218*EsnorA*, розщеплена *SacI*. Розмір фрагментів вказано у т.п.н.

шляхом трансформації клітин *E. coli* DH5 $\alpha$  сумарною ДНК цих штамів з подальшим рестрикційним картуванням виділеної з *E. coli* плазмиди рКС1218*EsnorA*. Для подальшої роботи було відібрано три незалежні екскон'юганти, для яких підтверджено наявність цієї плазмиди.

Дослідження стабільності успадкування плазмиди рКС1218*EsnorA* екскон'югантами показало, що фенотип *Apm*<sup>F</sup>, який забезпечується плазмідною, повністю втрачається екскон'югантами після трьох пересівів у рідкому середовищі TSB без апраміцину. Проте ця плазміда стабільно успадковується за умов вирощування штамів екскон'югантів у присутності апраміцину в кінцевій концентрації 50 мкг/мл, стійкість до якого забезпечується зазначеною плазмідною.

Було проведено аналіз метаболітів отриманих штамів і вивчено вплив плазмиди рКС1218*EsnorA* на рівень синтезу антибіотиків штамми *S. nogalater*. Як тест культуру було використано *S. lutea*. На чашки з тест-культурою накладали паперові диски, на які наносили рівну кількість екстрактів антибіотиків, отриманих із культур транскон'югантів *S. nogalater* рКС1218*EsnorA*. Як контроль було використано екстракти антибіотиків, одержаних зі штаму *S. nogalater* IMET43360. У результаті порівняння індексів продуктивності (ІП) цих штамів було встановлено, що рекомбінантні штамиди відрізняються від дикого типу за антибіотичною активністю (рис. 5). Так, для штамів *S. nogalater* рКС1218*EsnorA* середнє значення ІП становить 2,7, тоді як для *S. nogalater* IMET43360 – 2,3. Таке зростання середнього значення ІП може свідчити про зростання рівня синтезу ногаламіцину штамом *S. nogalater* рКС1218*EsnorA*. Для підтвердження цього було проведено аналіз сполук, що синтезуються рекомбінантними штамми *S. nogalater* рКС1218*EsnorA* та штамом дикого типу методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). Результати ТШХ аналізу вказують на те, що при введенні додаткових копій гена *snorA* спостерігається зростання рівня продукції ногаламіцину та його попередників, при цьому наявність плазмиди рКС1218*EsnorA* не призводить до утворення рекомбінантними штамми нових сполук. Отримані результати можуть вказувати на позитивну роль білкового продукту гена *snorA* у регуляції біосинтезу ногаламіцину, а штам *S. nogalater* рКС1218*EsnorA* може бути використаний як перспективний господар для вивчення генетичного контролю біосинтезу цього антибіотика.

Таким чином, методом ПЛР з хромосоми *S. nogalater* було субклоновано ген *snorA*, білковий продукт якого гомологічний факторам транскрипції, виявленим у інших стрептоміцетів. Показано, що введення додаткових копій цього гена у складі плазмиди рКС1218*EsnorA* в клітини *S. nogalater* призводить до зростання рівня синтезу ногаламіцину. Це вказує на те, що продуктом гена *snorA* є шлях-специфічний активатор транскрипції генів біосинтезу ногаламіцину.

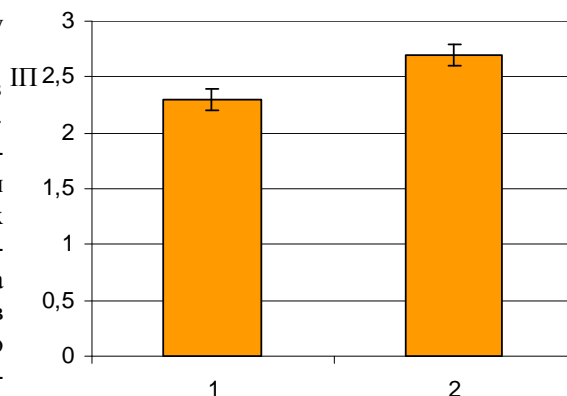


Рис. 5. Порівняння середніх значень ІП штамів: 1 – *S. nogalater* IMET43360, 2 – *S. nogalater* рКС1218*EsnorA*.



1. Аравіцька О., Климишин Д., Громико О., Федоренко В. Отримання та генетична трансформація протопластів штаму *Streptomyces nogalater* ІМЕТ 43360 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Т. 48. С. 69–74.
2. Климишин Д., Громико О., Федоренко В. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК у штам *Streptomyces nogalater* ІМЕТ 43360 // Цитологія і генетика. 2007. Т. 41. № 5. С. 263–267.
3. Луژهцький 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.
4. 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.
5. Bate N., Stratigopoulos G., Cundliffe E. Differentiation roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis // Mol. Microbiol. 2002. Vol. 43. P. 449–458
6. Bibb M. J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* // Microbiol. 2005. Vol. 8. P. 208–215.
7. Fernandez-Moreno C., Caballero J., Hopwood D., Malpartida F. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for transcriptional control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces* // Cell. 1995. Vol. 66. P. 769–780.
8. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. 634 p.
9. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // Pharmac. Ther. 1991. Vol. 51. P. 239–255.
10. Lombo F., Brana A, Mendez C., Salas J. The mitramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of cluster // J. of Bacteriology. 1999. Vol. 181. P. 642–647.
11. Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. Production of landomycins in strains *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators // FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 222. P. 149–153.
12. Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. DNA binding activity of LndI protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 // Microbiol. 2005. Vol. 151. P. 191–200.
13. Tang L., Grimm A., Zhang Y., Hatchinson C. Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius* // Mol. Microbiol. 2002. Vol. 22. P. 801–813.
14. 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.
15. 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.

**CLONING AND INVESTIGATION OF *snorA* GENE, A PUTATIVE POSITIVE  
REGULATOR OF NOGALAMYCIN BIOSYNTHESIS  
IN *STREPTOMYCES NOGALATER***

**D. Klymyshyn\*\*\*, T. Gren\*, V. Fedorenko\***

*\*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: dedima@rambler.ru*

*\*\*Institute of Animal Biology UAAS  
38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

Using polymerase chain reaction the 2,4 kb fragment, containing *snorA* gene was cloned. The *snorA* gene was subcloned into pKC1218E vector. Obtained construction was transferred into *Streptomyces nogalater* IMET43360 cells using bacterial conjugation. It was found that expression of *snorA* gene in pKC1218E vector in *S. nogalater* caused increase in nogalamycin production.

*Key words: Streptomyces nogalater, nogalamycin, a regulation of antibiotic biosynthesis, conjugation.*

**КЛОНИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ГЕНА *snorA*, ПРЕДПОЛАГАЕМОГО  
АКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА НОГАЛАМИЦИНА  
У *STREPTOMYCES NOGALATER***

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

*\*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: dedima@rambler.ru*

*\*\*Институт биологии животных УААН  
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина*

Методом полимеразной цепной реакции клонирован 2,4 т.п.н.-фрагмент кластера генов биосинтеза ногаламицина, который содержит ген *snorA*. Этот ген субклонирован в челночном векторе pKC1218E. Созданная конструкция перенесена в клетки штамма-производителя ногаламицина *Streptomyces nogalater* IMET43360 при помощи конъюгации из *Escherichia coli*. Показано, что введение дополнительных копий гена *snorA* в клетки дикого типа приводит к увеличению уровня синтеза ногаламицина.

*Ключевые слова: Streptomyces nogalater, ногаламицин, регуляция биосинтеза антибиотиков, конъюгация.*

Стаття надійшла до редколегії 12.03.09

Прийнята до друку 27.03.09