

ОСТАШ Б.О.¹, ГОРБАЛЬ Л.О.¹, ЗАБУРАНИЙ Н.В.¹, ЛОПАТНЮК М.М.¹,
МУТЕНКО Г.В.¹, РАБИК М.В.¹, ГРОМИКО О.М.¹, ОСТАШ І.С.¹, УОКЕР С.²,
ФЕДОРЕНКО В.О.¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: v_fedorenko@lnu.edu.ua

² Гарвардська медична школа,
США, 02115, Бостон, 200 Лонгвуд-авеню

НОВІ ГЕНИ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ПРОДУКЦІЮ АНТИБІОТИКІВ ФОСФОГЛІКОЛІПІДНОГО РЯДУ

Впровадження антибіотиків у медичну практику ХХ-го століття докорінно змінило медицину та сприяло підвищенню середньої тривалості й якості життя людини. Більшість антибіотичних речовин є складними органічними молекулами, що продукуються мікроорганізмами, у першу чергу актиноміцетами – міцеліальними бактеріями, геноми яких мають високий GC-вміст. Незважаючи на безпрецедентне поширення множинно-стійких форм патогенних мікроорганізмів і, відтак, гостру потребу у нових антибіотиках, їхнє впровадження у практику практично припинилось [1, 2]. Це пояснюється поступовим вичерпанням традиційних підходів до виявлення природних сполук, які б належали до нових структурних класів, діяли на нові мішені і водночас не виявляли побічних ефектів при лікуванні того, чи іншого захворювання. Наприклад, типовий цикл пошуку нових бета-лактамних антибіотиків на основі методів медичної хімії вже не веде до речовин, що перевершують за ефективністю наявні препарати. Водночас, дані геноміки засвідчують, що потенціал актиноміцетів щодо синтезу нових сполук далеко не вичерпаний. Їхні геноми містять десятки кластерів генів синтезу антибіотиків, структура яких і активність не описані. У багатьох випадках це – мовчазні (або криптичні) генні кластери, які не експресуються (або експресуються вкрай слабо) за типових лабораторних умов [3]. Розробка біологічних методів, які б відкрили доступ до криптичної частини вторинного метаболізму – важливий напрям сучасної біотехнології.

Протягом останніх 7 років співробітники НДЛ-42 кафедри генетики та біотехнології ЛНУ імені І. Франка досліджують біосинтез моеноміцинів – групи антибіотиків фосфогліколіпідної природи, що пригнічують синтез пептидоглікану. Моеноміцини надзвичайно активні, мають механізм дії, за яким не функціонує жодний

клінічно важливий антибіотик, і стійкість до моеноміцинів виникає з низькою частотою [4]. Існує значний інтерес у розвитку нового класу антибіотиків на основі моеноміцинів. На сьогодні клоновано і досліджено лише один кластер генів біосинтезу моеноміцинів з штаму *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 [5], що обмежує створення нових фосфогліколіпідних антибіотиків методами комбінаторного біосинтезу. Також немає ефективних методів уведення множинних змін у геном ATCC14672 і достатньо повного розуміння механізмів регуляції продукції моеноміцинів навіть у цьому, найкраще вивченому, штамі. У цій роботі нами описано низку експериментів, які є внеском у вирішення вищезгаданих питань. Ці експерименти створюють платформу для дальшого генно-інженерного конструювання продуцентів нових моеноміцинів із передбачуваною структурою, що слугуватимуть для пошуку нових клінічно важливих сполук.

Матеріали і методи

У роботі використано штами *S. ghanaensis* ATCC4672 (продуцент моеноміцину А дикого типу) і *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726. Для конструювання рекомбінантних плазмід і космід використано штами *Escherichia coli* DH5, *E. coli* BW25113 (pIJ790). Продукцію моеноміцинів і їхній структурний аналіз вивчали за описаних умов [5]. Для кон'югативного перенесення ДНК використано штам *E. coli* ET12567 (pUB307). Генні нокауту у штамі ATCC14672 виконано як описано в [6]. Факт генних нокаутів доведено за допомогою комплементацийного аналізу і ПЛР. Біоінформатичний пошук у геномах ATCC14672 й NRRL-B16726 гомологів описаних білків синтезу моеноміцинів і плейотропних регуляторів вторинного метаболізму стрептоміцетів виконували з використанням бази NCBI. Для надекспресії генів ви-

користали вектор рКC1139E, в якому клонували гени потрапляють під контроль конститутивного промотора гена 16S рРНК-метилтрансферази *Saccharopolyspora erythraea* – *ermEp** [5]. Веб-сервіс antiSMASH використано для пошуку нових кластерів генів вторинного метаболізму у геномах бактерій.

Результати та обговорення

Біоінформатичне передбачення мережі генів, що регулюють продукцію моеноміцинів. Нуклеотидну послідовність хромосоми ATCC14672 майже повністю встановлено і, на сьогодні, її довжина становить 8,2 млн. п.н. (див. <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/>). Невелика частка генома залишається невідомою (приблизно 3,5 %). Однак, це не перешкоджає здійснювати його докладний аналіз, зокрема виявлення регуляторних мереж вторинного метаболізму. Згадана послідовність генома *S. ghanaensis* міститься у базі даних NCBI та анотована автоматично, без урахування літературних даних про регуляцію вторинного метаболізму. Зокрема, гени часто анотовано як такі, що кодує гіпотетичні білки, проте не зазначено їхніх точних регуляторних властивостей. Тому нами виконано докладніший пошук регуляторних генів у геномі ATCC14672. Унаслідок подібності хромосом *S. ghanaensis* і *S. coelicolor* M145 (остання була джерелом усіх генів для порівняння) майже завжди можна підтвердити ідентифікацію генів-ортологів за ознаками синтенії, тобто збереження лінійної послідовності генів на хромосомі. У результаті нами виявлено, що геном ATCC14672 кодує ортологи усіх описаних плейотропних регуляторів вторинного метаболізму у модельному штамі M145. Виявлену мережу регуляторів ATCC14672 наведено на рис. 1. Зокрема, враховуючи наявність у кодуєчих послідовностях генів біосинтезу моеноміцину (*moe*) рідкісного лейцинового кодона ТТА, на продукцію цього антибіотика має впливати ген лейцил-тРНК $tRNA^{Leu}_{UAA}$ (*bldA*). Ген цієї тРНК виявлено у геномі ATCC14672. Кодон ТТА також містить у гені *adpA*, що кодує глобальний транскрипційний регулятор низки процесів у стрептоміцетів. Ортолог цього білка M145 кодується і в геномі ATCC14672. З літературних даних відомо, що рівень експресії *AdpA* визначається на посттранскрипційному рівні рибонуклеазою *AbsB*, яка здатна деградувати мРНК гена *adpA*. Ортологічний ген *absB* є і в геномі ATCC14672. Ми припустили, що ці три вищезгадані гени формують своєрідну регуляторну

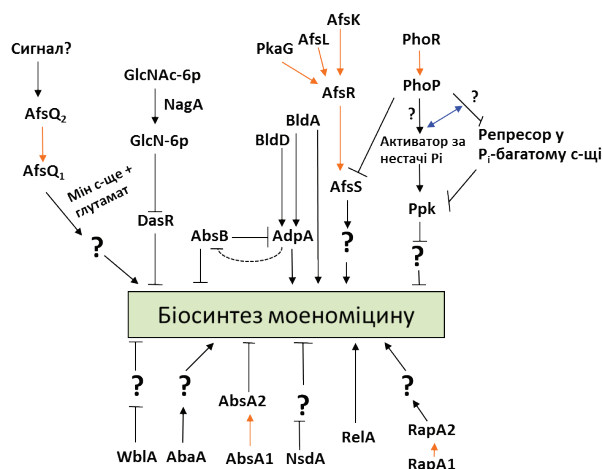


Рис. 1. Узагальнена схема плейотропних регуляторів вторинного метаболізму та їхній імовірний вплив на продукцію моеноміцинів. Стрілки позначають позитивний (активаторний) вплив, лінії з поперечними рисками – негативний (репресорний). У низці випадків вплив регулятора визначається умовами вирощування. Див. також основний текст

«тріаду», яка може прямо впливати на продукцію моеноміцинів, і наше припущення нещодавно частково отримало експериментальне підтвердження [7]. У промоторних ділянках *moe*-кластера виявлено також операторні послідовності, що нагадують ті, які в штамі M145 розпізнаються транскрипційним фактором *BldD*. Дійсно, ортолог гена *bldD* штаму M145 виявлено у геномі ATCC14672, що може вказувати на контроль білком *BldD* продукції моеноміцинів. Біоінформатичний аналіз також вказує на можливість участі у продукції моеноміцинів низки інших регуляторів, як підсумовано на рис 1 і далі частково досліджено у цій роботі.

Роль генів *bldD* й *afsA* у біосинтезі моеноміцинів. На сьогодні мало відомо про участь регулятора *BldD* у синтезі антибіотиків, оскільки цей білок головню відомий як регулятор формування повітряного міцелію у стрептоміцетів. Тому нами виконано генетичний аналіз його ортолога з ATCC14672. Ген клонувано за допомогою ПЛР з у вектор рКC11389E і сконструйовану плазмиду уведено у клітини ATCC14672. Транскон'югант не формував спори і синтезував моеноміцину втричі менше ніж вихідний штам. Це вказує на репресорний тип дії *BldD* на синтез моеноміцину. Іншим потенційним регулятором продукції моеноміцину можуть бути гамма-бутиролактони, низькомолекулярні метаболіти, що у актиномицетів виконують функцію кворум-сенсин-

гу [8]. Амінокислотні послідовності бутиролактонсинтази AfsA зі штамів M145 і ATCC14672 виявляють високу подібність, тому імовірно, що і відповідні бутиролактони мають подібну, або ідентичну структуру. Тому нами перевірено участь бутиролактонів у продукції моеноміцинів за рахунок експресії *moe*-кластера у *afsA*-мутанті *S. lividans* M707 (цей штам накопичує бутиролактони ідентичні до таких штаму M145). Отриманий штам не продукував моеноміцину, в той час як дикий тип *S. lividans* продукує його [9]. На сьогодні нами отримано клони ATCC14672 із зруйнованим геном *afsA*, дальший аналіз яких допоможе точно зрозуміти роль цього гена у продукції моеноміцину.

Нові кластери генів біосинтезу моеноміцинів та вивчення функції окремих генів з цих кластерів у штамі ATCC14672. У геномах низки актиноміцетів нами виявлено кластери генів, які можуть контролювати біосинтез нових фосфогліколіпідних антибіотиків. Зокрема, у *S. viridosporus* й *S. peruviansis* виявлено кластери генів ідентичні до *moe*-кластера. У геномах штамів *S. clavuligerus* ATCC27064 й *S. sp.* Tu6176 виявлено кластери генів, що високоподібні до *moe*-кластера. Двома відмінностями є відсутність генів формування А-кільця, глікозилтрансферази *MoeGT3* (приєднує бічний залишок глюкози), гени *moeR5moeS5*, що контролюють перетворення залишку N-ацетилглюкозаміну у кіновозамін.

Практично всі описані на сьогодні фосфогліколіпідні антибіотики продукуються бактеріями роду *Streptomyces*. Винятком є штам *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726, відомий як продуцент клінічно важливого антибіотика тейхопланіну й фосфогліколіпідного антибіотика тейхоміцину, структура якого наразі невідома. У чорновій версії генома NRRL-B16726 нами виявлено кластер генів біосинтезу фосфогліколі-

підних антибіотиків (*tch*), який значно відрізняється від *moe*-кластера (рис. 2). Зокрема, у цьому кластері відсутні гени синтезу А-кільця, приєднання глюкози і формування кіновозаміну, натомість присутні імовірні гени синтезу пренілпірофосфату й пренілциклази. Можна припустити, що ці нові гени задіяні у постачанні будівельних блоків для синтезу пренільної частини фосфогліколіпідного антибіотика, та циклізації пренільного хвоста. Далі, загальна організація *tch*-й *moe*-кластерів відрізняється – окремі гени займають різні позиції. Нарешті, білок *TchH5*, що кодується геном з *tch*-кластера, має відмінності від білка *MoeH5* з *moe*-кластера [6]. Так, *TchH5* містить на N-кінці абсолютно консервативний залишок цистеїну, необхідний для нуклеофільної атаки залишку глутаміну та вивільнення йона амонію. Тому можна припустити, що *TchH5* виконує реакції карбоксамідування залишку галактуронату тейхоміцину, і не може приєднувати інші до карбоксильної групи інші NH₂-вмісні сполуки, як-от А-кільце, гліцин, серин тощо (так, як це характерно для *MoeH5*). Для перевірки цього припущення нами сконструйовано плазмиду для надекспресії гена *tchH5* і спеціальний штам ATCC14672 – V38.3 – у якому видалено гомологічний ген *moeH5*. У штамі V38.3 делецію гена *moeH5* виконано з використанням сайт-специфічних рекомбіназ, що дає змогу позбутися послідовностей маркерного гена стійкості до апраміцину [10]. Дальші експерименти дозволять підтвердити або спростувати висунуті припущення про функціонування білка *TchH5*.

Висновки

У результаті виконаних досліджень описано мережу генів, які можуть регулювати продукцію моеноміцину. Роль окремих генів цієї мережі перевірено експериментально. Показано, що плейотропні регулятори морфогенезу стрептоміцетів можуть впливати на продукцію моеноміцину. Вперше описано нові кластери генів біосинтезу фосфогліколіпідів у низці актиноміцетів, які можна використати для ідентифікації нових сполук-представників моеноміцинової родини антибіотиків.

Дослідження у лабораторії проф. Федоренка В.О. підтримано грантом МОН Бг-98Ф (2012–2014) та грантом Національних Інститутів Здоров'я США (NIH) R03TW009424 (2013–2016). Текст статті відображає думку авторів і не є офіційною позицією NIH.

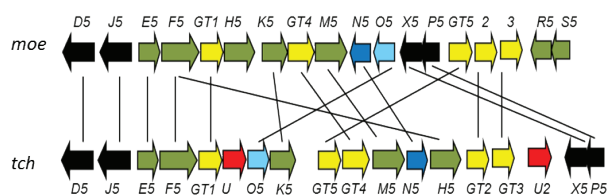


Рис. 2. Організація кластерів генів біосинтезу моеноміцину штаму ATCC14672 (*moe*) та тейхоміцину у NRRL-B16726 (*tch*). Відрізки сполучають гомологічні гени у двох кластерах. Гени *tchU* (імовірна пренілциклаза) і *tchU2* (імовірна пренілпірофосфат синтаза) не мають гомологів у *moe*-кластері

ЛІТЕРАТУРА

1. Payne D.J. Desperately seeking new antibiotics // *Science*. – 2008. – 321, N 5896. – P. 1644–1645.
2. Luzhetskyy A., Pelzer A., Bechthold A. The future of natural products as a source of new antibiotics // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. – 2007. – 8, N 8. – P. 608–613.
3. Ostash B., Ostash I., Horbal L., Fedorenko V. Exploring and exploiting gene networks that regulate natural products biosynthesis in actinobacteria // *Nat. Prod. J.* – 2013. – 3. – P. 189–198.
4. Ostash B., Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity // *Nat. Prod. Rep.* – 2010. – 27. – P. 1594–1617.
5. Ostash B., Saghatelian A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // *Chem. Biol.* – 2007. – 14. – P. 257–267.
6. Ostash B., Campbell J., Luzhetskyy A., Walker S. MoeH5: a natural glycorandomizer from the moenomycin biosynthetic pathway // *Mol. Microbiol.* – 2013. – 90, N 6. – P. 1324–1338.
7. Makitrynskyy R., Ostash B., Tsypik O., Rebets Y., Doud E., Meredith T., Luzhetskyy A., Bechthold A., Walker S., Fedorenko V. Pleiotropic regulatory genes *bldA*, *adpA* and *absB* are implicated in production of phosphoglycolipid antibiotic moenomycin // *Open Biol.* – 2013. – 3. – P. 130121.
8. Rabyk M.V., Ostash B.O., Fedorenko V.O. Gene networks that regulate secondary metabolism in actinomycetes: pleiotropic regulators // *Cyt. Genet.* – 2014. – 48, N 1. – P. 67–82.
9. Mutenko H., Makitrynskyy R., Tsypik O., Walker S., Ostash B., Fedorenko V. Genes for biosynthesis of butenolide-like signalling molecules in *Streptomyces ghanaensis*, their role in moenomycin production // *Russ. J. Genet.* – 2014. – 50, N 6. – P. 563–568.
10. Siegl T., Luzhetskyy A. Actinomycetes genome engineering approaches // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2012. – 102, N 3. – P. 503–516.

OSTASH B.O.¹, HORBAL L.O.¹, ZABURANNYI N.V.¹, LOPATNIUK M.M.¹, MUTENKO H.V.¹, RABYK M.V.¹, GROMYKO O.M.¹, OSTASH I.S.¹, WALKER S.², FEDORENKO V.O.¹

¹ Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskoho str., 4, e-mail: v_fedorenko@lnu.edu.ua

² Harvard Medical School,

USA, 02115, Boston, 200 Longwood avenue

NOVEL GENES THAT GOVERN PRODUCTION OF PHOSPHOGLYCOLIPID FAMILY ANTIBIOTICS

Aims. To identify novel genes for biosynthesis of moenomycin-like natural products in actinomycetes, and genes that control their production at transcriptional and posttranscriptional levels. **Methods.** Bioinformatic genome mining was combined with experimental verification of selected genes; gene knockouts and overexpression studies were used for the latter. **Results.** A genetic network putatively controlling the production of moenomycins by *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 is described. Involvement of several genes from this network was verified experimentally. Gene cluster for biosynthesis of putative phosphoglycolipid natural product was identified in the genome of *Actinoplanes teichomyceticus*, and this cluster features both novel genetic architecture and novel genes for phosphoglycolipid biosynthesis. **Conclusions.** The obtained data create a working ground for development of moenomycin overproducers and generation of producers of novel moenomycins.

Keywords: Streptomyces, antibiotics, phosphoglycolipid, moenomycin.