

(apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.— 2007.— V.61, N6.— P. 1–7.

#### **Резюме**

Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы Csp6I и дополнительной рестриктазы с CG- или AT-богатыми сайтами узнавания. Исследована экспансия выявленных маркеров апомиксиса в пределах семейства *Brassicaceae*. Гомология секвенированных маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

The new variant of the transposon display on the basis of Csp6I and additional restrictase with CG-or AT-rich sites of recognition is developed and applied. Expansion of the revealed markers of apomixis is investigated among some forms of *Brassicaceae*. Homology of sequenced markers with known sequences was from 85 up to 100%.

**ГОРБАЛЬ Л.О., ОСТАШ Б.О., РЕБЕЦЬ Ю.В., РАБИК М.В.,  
МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., ЦИПІК О.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ І.С.,  
ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.,\* БЕХТОЛЬД А.,\* ФЕДОРЕНКО В.О.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79005,  
Львів, вул. Грушевського, 4*

*\*Альберт-Людвіг університет, Німеччина, 72076, Фрайбург,  
вул. Стефана-Мейєра, e-mail: lidutko@yahoo.com*

#### **МЕРЕЖІ ГЕНІВ, ЗАДІЯНИХ У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІКЕТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ У СТРЕПТОМІЦЕТІВ**

Вивчення механізмів регуляції вторинного метаболізму і морфогенезу актиноміцетів є однією з центральних проблем генетики та біотехнології мікроорганізмів. Це зумовлено здатністю цих бактерій продукувати широкий спектр біологічно активних сполук. Цікавими в цьому плані є штами *S. antibioticus* Tü6040, *S. aureofaciens* Tü117 та *S. globisporus* 1912 — продуценти полікетидних антибіотиків сімоциклінону D8,  $\alpha$ -ліпоміцину і ландоміцину E відповідно (рис.). Усі ці антибіотики володіють антибактерійною активністю, а сімоциклінон D8 та ландоміцин E виявляють також цитостатичну активність щодо різних типів пухлинних клітин [3, 5, 8, 11]. Проведені нами дослідження дали змогу з'ясувати деякі нові аспекти генетичного контролю біосинтезу цих антибіотиків та розробити підходи до отримання їхніх надпродуцентів.

**Регуляція біосинтезу сімоциклінону D8.** У кластері генів біосинтезу сімоциклінону D8 *S. antibioticus* Tü6040 виявлено три регуляторні гени *simReg1*, *simReg2* і *simReg3*. Біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей відповідних білків, свідчить про те, що вони кодують регулятори SARP-, TetR- і MarR-родин відповідно. Продукт гена *simReg1* є шлях-специфічним транскрипційним активатором. Його спрямоване руйнування в

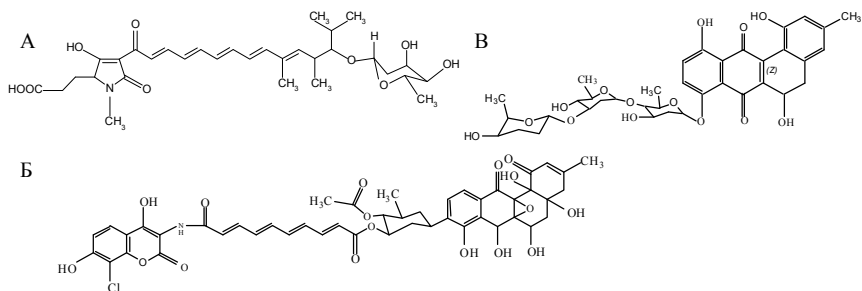


Рис. 1. Структура антибіотиків  $\alpha$ -іпоміцину (А), сімоциклінону D8 (Б), ландоміцину Е (В)

хромосомі *S. antibioticus* Tü6040 призводить до припинення біосинтезу сімоциклінону D8, а уведення додаткових копій *simReg1* в штам дикого типу підвищує рівень продукції антибіотика [1]. Ми з'ясували, що білок SimReg1 активує експресію структурних генів біосинтезу сімоциклінону D8 і генів білків-експортерів SimEx1, SimEx2. Він також регулює експресію регуляторного гена *simReg3* і власного гена. Здатність SimReg1 взаємодіяти з ДНК, найбільш імовірно, регулюється кінцевим продуктом біосинтезу — сімоцикліноном D8. Білки SimReg2 і SimReg3 регулюють експресію генів стійкості, оскільки обидва мутанти і штами з додатковими копіями генів *simReg2* і *simReg3*, значно стійкіші до низки антибіотиків. Білок SimReg2 зв'язується з оператором гена *simEx1*, блокуючи його транскрипцію. Білки SimReg3 і SimReg2 можуть регулювати експресію одних і тих же генів, оскільки обидва здатні зв'язуватись із промоторними ділянками між генами *simReg2* і *simEx1*. Білок SimEx1 задіяний головно в експорті сімоциклінонів А і В. Узагальнивши отримані нами дані та дані літератури [7], ми запропонували гіпотетичну схему регуляції біосинтезу та експортування сімоциклінонів. Біосинтез та експортування сімоциклінону D8 у *S. antibioticus* Tü6040 — це координовані процеси. Білок SimReg1 активує експресію структурних генів біосинтезу сімоциклінону D8, генів, що кодують білки-транспортери SimEx1, SimEx2 і регуляторного гена *simReg3*. Як наслідок розпочинається біосинтез антибіотика. Коли концентрація сімоциклінону D8 і/або його попередників є низькою, експресія гена-транспортера *simEx1* репресується білком SimReg2. Сімоциклінон D8 і/або його попередники нагромаджуються в клітині. Коли внутрішньоклітинна концентрація сімоциклінонів С та D8 перевищує певний рівень, вони сприяють дисоціації SimReg2 від промотора гена *simEx1*. Білок SimReg1 зв'язується з цим промотором та підвищує транскрипцію гена *simEx1*. Так активується експортування сімоциклінонів із клітини. Коли концентрація сімоциклінону D8 у клітині збільшується до рівня, що є токсичним для клітини, антибіотик починає зв'язуватись із SimReg1, інактивуючи його. Внаслідок цього експресія структурних генів зменшується, а біосинтез сімоциклінону пригнічується.

**Регуляція біосинтезу  $\alpha$ -ліпоміцину.** Кластер генів біосинтезу  $\alpha$ -ліпоміцину містить п'ять регуляторних генів. Продукти генів *lipReg1* та *lipReg2* виявляють гомологію до регулятора та гістидин-кінази відповідно, *lipReg3* — до регулятора родини MarR, *lipReg4* — до білків родини LAL, *lipX1* — до РНКаз Sa-типу. Білок LipReg4 є шлях-специфічним активатором структурних генів біосинтезу  $\alpha$ -ліпоміцину. Його інактивація блокує експресію структурних *lip*-генів та продукцію антибіотика. Білки LipReg1 та LipReg2 утворюють двокомпонентну систему. Їхнє руйнування призводить до зменшення продукції  $\alpha$ -ліпоміцину, а надекспресія в штамі дикого типу спричиняє зростання продукції антибіотика в декілька разів. Беручи до уваги те, що в штамі DlipReg4, який не продукує  $\alpha$ -ліпоміцину, гени *lipReg1* та *lipReg2* активно транскрибуються, ми припустили, що продукти цих генів не здатні безпосередньо регулювати експресію структурних *lip*-генів. Саме тому, ми вважаємо, що обидва білки є регуляторами вищого рівня і беруть участь у модуляції рівня біосинтезу  $\alpha$ -ліпоміцину, підвищуючи експресію гена *lipReg4*. Білок LipReg3 є репресором експорту  $\alpha$ -ліпоміцину. Руйнування *lipReg3* зумовлює зростання продукції ліпоміцину і експресії гена-експортера *lipEx1* і, як наслідок, може спричиняти посилений експорт  $\alpha$ -ліпоміцину з клітин, імовірно, створюючи сприятливі умови для біосинтезу ліпоміцину. РНКазы LipX1 також задіяна в регуляції біосинтезу ліпоміцину. Руйнування *lipX1* зменшує рівень синтезу ліпоміцину, а його надекспресія в дикого типу під контролем конститутивного промотора  $P_{ermE}$  спричиняє зростання біосинтезу антибіотика та накопичення його попередника дез-дегітокси- $\alpha$ -ліпоміцину. Отримані нами результати аналізу *in silico*, *in vitro* та *in vivo* дали можливість запропонувати імовірну модель регуляції біосинтезу  $\alpha$ -ліпоміцину в штамі *S. aureofaciens* Tь117 [6]. Білок LipReg2 сприймає певні сигнали з зовнішнього середовища та передає їх на білок LipReg1 шляхом фосфорильовання. Білок LipReg1 у фосфорильованій формі є активним і може підвищувати транскрипцію гена *lipReg4*. Продукт гена *lipReg4* контролює експресію структурних *lip*-генів. Білок LipReg3 контролює кількість ліпоміцину шляхом пригнічення експресії *lipEx1*. РНКазы LipX1 також якимось чином задіяна в біосинтезі ліпоміцину, але механізм її впливу залишається не зрозумілим. Отже, *lip*-кластер містить групу генів, продукти яких взаємодіють між собою за принципом ієрархії і регулюють біосинтез ліпоміцину.

**Регуляція біосинтезу ландоміцину E.** У кластері генів біосинтезу ландоміцину E виявлено та вивчено функції чотирьох регуляторних генів, що кодуєть шлях-специфічний активатор LndI [9, 10], протеїназу Prx [4], сенсорну кіназу LndY та регулятор родини GntR — LndYR [2]. Білок LndI є транскрипційним активатором експресії структурних *lnd*-генів та власного гена. Уведення додаткових копій цього гена в штамі дикого типу приводить до зростання біосинтезу ландоміцину E в декілька разів. Ген *prx* кодує серинтреонінову протеїн-кіназу. Його руйнування призводить до зменшення продукції антибіотика в п'ять разів, а введення додаткових копій у штамі дикого типу підвищує продукцію ландоміцину. Ми припускаємо, що протеїназа Prx

здіяна в процесингу білків — продуктів структурних генів біосинтезу цього антибіотика. Продукт гена *lndYR* кодує білок, що належить до широко розповсюдженій в актиноміцетів YtrA-підродини регуляторів родини GntR. Руйнування цього гена в *S. globisporus* 1912 блокує споруючію та біосинтез ландоміцину, тоді як уведення додаткових його копій у штам дикого типу не викликає помітних змін. Результати експериментів *in vivo* та *in vitro* свідчать, що *lndYR* репресує експресію генів *lndW-lndW2*, які кодують ABC-транспорттер. Він здатен зв'язуватись із промотором гена-регулятора *lndI*. Не виключено, що в штамі *S. globisporus* є й інші гени-мішені білка *lndYR*, оскільки відомо, що регулятори підродини YtrA контролюють транспортні процеси пов'язані з метаболізмом вуглеводів. Гетерологічна експресія гена *lndYR* в штаммах *S. coelicolor*, *S. ghanensis* та *S. siوياensis* викликає зміни в біосинтезі вторинних метаболітів і морфогенезі, які залежать від умов культивування, а саме джерел живлення. Отже, *lndYR* є одним із плейотропних регуляторів, що, імовірно, слугують містком між первинним і вторинним метаболізмом у *S. globisporus*.

Використання сконструйованого нами модифікованого транспозона Tn5, що містить два конститутивних промотори P<sub>ErmE</sub> та P<sub>lcr</sub>, дало можливість виявити низку нових генів, продукти яких задіяні в споруючій і/або біосинтезі ландоміцину E в штамі *S. globisporus*, а також в окремих випадках “увімкнути”, або підвищити експресію деяких генів, оскільки інтегруючись в певну ділянку хромосоми він вносить два конститутивні промотори. Серед ідентифікованих генів — сім нових регуляторів, білкові продукти яких належать до протеїн-кіназ, або родин білків MarR, LuxR, GntR та ROK, та прямо, або опосередковано беруть участь у регуляції біосинтезу ландоміцину E. Це свідчить про те, що біосинтез ландоміцину E контролюється не лише тими регуляторними генами, що знайдені безпосередньо в *lnd*-кластері, а й низкою інших регуляторів, гени яких розташовані поза класером.

### Література

1. Горбаль Л.О., Ребець Ю.В., Лужецький А.М., Бехтольд А., Федоренко В.О. Регуляція біосинтезу сімоциклінону у штамі *Streptomyces antibioticus* Ть6040 за участю гена *simReg1* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр.— 2007.— С. 343–347.
2. Цулік О., Остап Б., Федоренко В. Гени *lndY* та *lndYR*, що кодують імовірно двокомпонентну регуляторну систему у *Streptomyces globisporus* 1912 // Молодь і поступ в біології: V міжнар. конф. студ. аспір. (Львів, 12–15 травня 2009 р.): тези доп.— Л., 2009.— С. 150–151.
3. Bihlmaier C., Welle E., Hofmann C., Welzer K., Vente A., Breiting E., Müller M., Glaser S., Bechthold A. Biosynthesis of the acyclic polyene antibiotic lipomycin in *Streptomyces aureofaciens* Ть117 // *Antimicrobiol. Agents Chemother.*— 2006.— Vol.50.— P. 2113–2121.
4. Dutko L., Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Bechthold A., Nakamura T., Fedorenko V. A putative proteinase gene is involved in regulation of landomycin E biosynthesis in *Streptomyces globisporus* 1912 // *FEMS Microbiol. Lett.*— 2006.— Vol.255.— P. 280–285.

5. Flatman R., Howells A., Heide L., Fiedler H-P., Maxwell A. Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2005.— Vol.49.— P. 1093–1100.
6. Horbal L., Rebets Y., Rabyk M., Luzhetskyy A., Ostash B., Welle E., Nakamura T., Fedorenko V., Bechthold A. Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tь117 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*— 2009.— Vol.85.— P. 1069–1079.
7. Le T., Fiedler H-P., den Hengst C., Ahn S., Maxwell A., Buttner M. Coupling of the biosynthesis and export of the DNA gyrase inhibitor simocyclinone in *Streptomyces antibioticus* // *Mol. Microbiol.*— 2009.— Vol.72.— P. 1462–1474.
8. Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products // *Medical Chem.*— 2009.— Vol.9.— P. 1040–1051.
9. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Hoffmeister D., Brana A., Mendez C., Salas J.A., Bechthold A., Fedorenko V. Production of landomycins in *S. globisporus* and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators // *FEMS Microbiol. Lett.*— 2003.— Vol.194.— P. 10965–10971.
10. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Kushnir S., Fukuhara M., Bechthold A., Nashimoto M., Nakamura T., Fedorenko V. 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. 281–290.
11. Sadig A., Patel M., Jacobson B., Escobedo M., Ellis K., Oppegard L., Hiasa H., Kratzke R. Anti-proliferative effects of simocyclinone D8 (SD8), a novel catalytic inhibitor of topoisomerase II // *Invest New Drugs.*— 2009.— Vol.28.— P. 20–25.

### Резюме

З використанням методів аналізу *in silico*, спрямованого мутагенезу, надекспресії, вивчення рухливості ДНК-білкових комплексів та аналізу експресії генів досліджено функції генів, що регулюють біосинтез сімоциклінону D8,  $\alpha$ -ліпоміцину і ландоміцину E. Встановлено, що вивчені регулятори можуть взаємодіяти за принципом ієрархії. Показано наявність тісного взаємозв'язку між регуляцією біосинтезу антибіотиків, їхнім транспортуванням, стійкістю до антибіотиків, а також первинним метаболізмом.

С использованием методов анализа *in silico*, направленного мутагенеза, сверхэкспрессии, изучения подвижности ДНК-белковых комплексов и анализа экспрессии генов исследованы функции генов, регулирующих биосинтез симоциклинона D8,  $\alpha$ -липომидина и ландомицина E. Установлено, что изученные регуляторы могут взаимодействовать по принципу иерархии. Показано наличие тесной взаимосвязи между регуляцией биосинтеза антибиотиков, их транспортом, устойчивостью к антибиотикам, а также первичным метаболизмом.

*In silico* analysis, site-directed mutagenesis, overexpression, gel-mobility shift assay and analysis of the genes expression let us establish functions of the regulatory genes involved in the biosynthesis of simocyclinone D8,  $\alpha$ -lipomycin and landomycin E. It has been shown that these regulators can interact with the principle of hierarchy. The close relationship between the regulation of the biosynthesis of antibiotics, their transport, resistance to antibiotics and primary metabolism has been proved.

**ЖУКОВ В.А., НЕМАНКИН Т.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., КУЗНЕЦОВА Е.В.,  
ЖЕРНАКОВ А.И., ТИТОВ В.С., ГРИШИНА О.А., СУЛИМА А.С.,  
БОРИСОВ Я.Г., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии Россельхозакадемии,*

*Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3,*

*e-mail: zhukoff01@yahoo.com*

## **СОЗДАНИЕ СЕРИИ ГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) И ДИПЛОИДНОЙ ЛЮЦЕРНЫ (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.)**

Неотъемлемой частью изучения генетического контроля биологических процессов в настоящее время является клонирование ключевых генов, отвечающих за протекание этих процессов, осуществляемое обычно на основании генетического картирования. Генетическое картирование базируется на методах классической генетики — определении групп сцепления и частот рекомбинации, и основным его инструментом в настоящее время являются молекулярные маркеры, выявляющие полиморфизм в геномной ДНК или в белковых продуктах генов. Особое значение для сравнительного картирования, то есть сопоставления генетических и/или физических карт различных видов растений, имеют маркеры, создаваемые на основе последовательностей генов (Zhukov et al., 2007).

Среди бобовых растений подробные генетические карты создаются как для модельных видов (лядвенец японский *Lotus japonicus* (Regel.) Larsen и диплоидная люцерна *Medicago truncatula* Gaertn.), так и для сельскохозяйственно-ценных (горох *Pisum sativum* L., фасоль *Phaseolus vulgaris* L., бобы *Vicia faba* L., соя *Glycine max* (L.) Merr., арахис *Arachis hypogaea* L. и др.) (см. ресурс Интернет [www.comparative-legumes.org](http://www.comparative-legumes.org)). В настоящее время также развернуты международные программы по секвенированию геномов лядвенца японского и диплоидной люцерны (см. <http://www.kazusa.or.jp/lotus/> и <http://www.medicago.org/genome/>, соответственно). Благодаря сходной организации геномов бобовых растений, эти достижения могут быть использованы для создания маркеров, поиска генов и их позиционного клонирования у культурных бобовых (Young, Udvardi, 2009).

Горох посевной является одной из важнейших сельскохозяйственных культур мира после сои и фасоли (согласно данным FAOSTAT <http://faostat.fao.org>). Для некоторых генотипов гороха продемонстрировано увеличение семенной продуктивности и качества продукции под влиянием взаимодействия с почвенными микроорганизмами (Штарк и др., 2006). По этой причине изучение процессов развития симбиотических взаимоотношений гороха с почвенной микрофлорой представляется важным как для фундаментальной науки, так и для современного растениеводства. На горохе получено более 100 мутантов с нарушениями развития взаимовыгодных симбиозов