

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕНАЗИНОВЫХ  
АНТИБИОТИКОВ**  
**DEVELOPMENT OF NEW MOLECULAR GENETIC APPROACHES  
FOR PRODUCING PHENAZINE ANTIBIOTICS PRODUCERS**

Шилова Юлия Александровна, Веремеенко Екатерина Геннадьевна,  
Максимова Наталья Павловна  
Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: феназиновые антибиотики, биопестицидные препараты, микробные биотопливные технологии.

Резюме. Феназиновые антибиотики относятся к группе ароматических гетероциклических соединений, обладающих широким спектром биологической активности. Ввиду способности данных веществ вступать в окислительно-восстановительные реакции, они и продуцирующие их штаммы рассматриваются в качестве перспективной основы для (microbial fuel cell). Высокая антибиотическая активность феназинов в отношении ряда фитопатогенов известна относительно давно, что дает возможность создавать на основе синтезирующих их штаммов высоко эффективные биопестицидные препараты. В последние годы появляется все больше сведений о том, что использование феназиновых антибиотиков не ограничивается лишь промышленностью и сельским хозяйством: ряд производных феназинов проявляют выраженную антираковую, антипаразитарную и гипотензивную активности, что открывает перспективы их использования в медицине и фармакологии.

Keywords: phenazine antibiotics, biopesticides creation, the genetically engineering construction.

Summary. Phenazine antibiotics are aromatic heterocyclic compounds, which produced by microorganisms and possess various biological activity and have a great interest for agriculture and medicine. The active work on the study of phenazine antibiotics has been carried out at the Department of Genetics, Biological faculty, BSU under the supervision of the head Chair Professor, Ph.D. Maximova Natalia Pavlovna, who is one of the founders of biopesticides creation in the Republic of Belarus. In order to obtain superproducers of phenazine antibiotics, the study of regulation systems of phenazine synthesis was conducted. The transcription factor PsrA affects on production of phenazine antibiotics, but its specific role in the synthesis regulation for these compounds in bacteria *Pseudomonas* genus has not been established. To investigate the role PsrA in the regulation of secondary metabolites production, the genetically engineering construction of suicidal integrative vector pK18mob230psrA was developed. We also optimized method of site-directed insertional mutagenesis of psrA-gene for *Pseudomonas*.

На кафедре генетики биологического факультета Белорусского государственного университета ведется активная работа по исследованию феназиновых антибиотиков под руководством зав. кафедрой профессора, доктора биологических наук Максимовой Натальи Павловны, которая является

одним из основоположников создания биологических препаратов защиты растений на основе ризосферных бактерий в Республике Беларусь. В настоящее время направление исследований феназинов в БГУ существенно расширилось. Под руководством Максимовой Н.П. и ее непосредственной ученицы кандидата биологических наук доцента Веремеенко Екатерины Геннадьевны изучаются механизмы регуляции синтеза феназинов, а также причины устойчивости к ним у штаммов-продуцентов, анализируется спектр синтезируемых феназиновых антибиотиков, а также ведутся биоинформационные исследования, позволяющие выяснить направления горизонтального переноса некоторых феназиновых генов между царствами живых организмов. Большое внимание также уделяется изучению антимикробной активности феназиновых антибиотиков в отношении условно-патогенных для человека и животных микроорганизмов и раковых клеток. К исследовательской работе активно привлекаются аспиранты (Шилова Ю.А.) и студенты кафедры (Семашко А.И., Новосадова Е.В.). Ключевым объектом исследований является штамм ризосферных бактерий — продуцентов феназинов — *Pseudomonas chlorographis* ssp. *aurantiaca* В-162. Цель исследований: получение высокоактивных продуцентов феназиновых антибиотиков, пригодных для медицинского и сельскохозяйственного использования. В работе используются различные подходы: химический мутагенез, разнообразные молекулярно-генетические и биохимические методы, ВЭЖХ-анализ и протеомный анализ, современные биоинформационные методы.

Посредством химического мутагенеза Веремеенко Е.Г. получены штаммы В-162/17 и В-162/255. Штамм В-162/17, в отличие от большинства известных в мире феназинсинтезирующих штаммов, способен к продукции феназинов на минимальных средах, что является одним из важнейших критериев для промышленных продуцентов. Данный штамм в настоящее время является одним из компонентов эффективного биопестицидного препарата «Профибект-Фито». Штамм В-162/255 в оптимизированных условиях способен давать до 520 мг/л, что выше известных мировых аналогов. Также Веремеенко Е.Г. создан штамм, несущий дополнительные копии генов позитивной регуляции продукции феназинов *phzI/R* и способный в оптимизированных условиях продуцировать до 842 мг/л.

По литературным данным регуляция биосинтеза феназинов носит сложный и многоуровневый характер и включает каскад из глобальной регуляторной *GacS/GacA* киназной системы, транскрипционных факторов *PsrA* (от англ. *Pseudomonas sigma regulator*) и *Pip*, сигма фактор *RpoS* ( $\sigma^S$ ), а также зависимую от плотности клеток «quorum sensing»-систему. Вместе с тем показано, что *PsrA* влияет на экспрессию многих генов, что делает его привлекательной целью для исследований регуляции продукции вторичных метаболитов и мишенью для генно-инженерных манипуляций при создании продуцентов.

Известно, что *PsrA*, связываясь с промотором, активировать транскрипцию сигма фактора *rpoS* [1], *exsCEBA*-оперона, продукты которого регули-

руют синтез компонентов систем секреции III типа [2], а также ингибирует транскрипцию собственного гена [1] и оперона деградации длинноцепочечных жирных кислот *fadBA5* [3]. Помимо этого есть данные, что *PsrA* участвует в регуляции формирования бактериальных биопленок, сворминге и адгезии [4], биосинтезе 2,4-диацетилфлороглюцинола [5], продукции полигидроксиалкоаноатов [6]. Вместе с тем, конкретная функция *psrA* в регуляции синтеза феназинов у бактерий рода *Pseudomonas* не установлена. Вероятной причиной этого может служить то, что в регуляции продукции феназиновых антибиотиков у разных штаммов могут быть задействованы различные механизмы, подразумевающие вовлечение данного белка. Выяснение данных механизмов может явиться основой разработки новых методик получения продуцентов феназиновых соединений.

*Материалы и методы.* Объектом исследования является штамм *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 (коллекционный номер КМБУ B-162). В работе также использовали штамм *E. coli* XL-1Blue (F'proABlacIqlacZΔM15-Tn10/recA1gyrA96(Narr)thi-1hsdR17 supE44relA1lac), мобилизирующий штамм *E. coli* BW19851 (*recA*, ΩRP4 *tra*, *uidA::pir+*) из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ. Клонирование исследуемых фрагментов осуществлялось в вектор pTZ57R/T («МБИ Ферментас», Литва) и суицидальный интегративный вектор pK18mob [8]. Культивирование бактерий осуществляли в стандартных питательных средах при температуре 37°C (*E. coli*) и 28°C (*P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca*). Тотальную ДНК выделяли фенольным методом. Выделение плазмид, трансформацию и электрофорез проводили согласно стандартным протоколам [9,10]. Выделение ДНК из агарозного геля осуществлялось с использованием коммерческого набора GeneJET™ Gel Extraction Kit («МБИ Ферментас», Литва). Лигирование и рестрикцию проводили в смеси стандартного состава, в условиях, рекомендованных фирмой-производителем («МБИ Ферментас», Литва).

Праймеры для ПЦР полноразмерного гена *psrA* имели следующую последовательность: прямой 1P *gcggatccGAGTAGCCATGGCCCA*; обратный — 2P *gcggatccACGGTCAGGCCTTGGC* (курсивом выделены сайты для рестриктазы *VamHI*). ПЦР проводили в смеси стандартного состава с использованием ThermoHybaib PX2. Параметры циклов амплификации для полноразмерного *PsrA* гена были следующими: первичная денатурация — 2 мин при 94°C; затем 30 циклов: денатурация — 94°C, 1 мин; отжиг — 52°C, 30 с; элонгация — 72°C, 1 мин; заключительная достройка — 72°C, 10 мин.

Секвенирование ДНК проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit на секвенаторе ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (производитель «Applied Biosystems», США).

Для амплификации срединного участка гена размером 230 п.о. на основе сиквенса были сконструированы праймеры: 1S — *ggatccCATGAAGTG-CACAACG* и 2S — *ggatccAGAGCTGCTGGAAATC* (курсивом выделены сайты для рестриктазы *VamHI*). Параметры амплификации: первичная денатурация — 1 мин при 94°C; затем 10 циклов: денатурация — 94°C, 30 с; отжиг —

59°C, 30 с; элонгация — 68°C, 1 мин; 20 циклов: денатурация — 94°C, 30 с; отжиг — 53°C, 30 с; элонгация — 68°C, 1 мин заключительная достройка — 70°C, 5 мин

Для идентификации инсерции генно-инженерной конструкции на основе плазмиды рК18mob в область хромосомного psrA-гена проводили ПЦР-анализ с использованием смеси полимераз Taq и Pfu и праймеров к полно-размерному гену. ПЦР-анализ на наличие генно-инженерной конструкции в составе бактериальной хромосомы осуществляли по следующей программе амплификации: первичная денатурация — 3 мин при 94°C; затем 30 циклов: денатурация — 94°C, 1 мин; отжиг — 55°C, 30 с; элонгация — 68°C, 3 мин; заключительная достройка — 68°C, 5 мин. Использовали ПЦР-амплификатор C1000 Touch™ Thermal Cycler BIO RAD

*Результаты и обсуждение.* Для установления роли транскрипционного фактора PsrA в регуляции продукции феназиновых антибиотиков и других вторичных метаболитов у *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 была предпринята попытка инактивировать ген psrA с помощью сайт-направленного инсерционного мутагенеза. Для этого на начальном этапе работы было осуществлено клонирование полноразмерного гена psrA в составе вектора рTz57R/T, после чего рекомбинантную конструкцию перенесли в клетки штамма *E. coli* XL-1Blue. Для идентификации клонированного фрагмента было осуществлено его полное секвенирование и соответствующая нуклеотидная последовательность psrA-гена бактерий *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 помещена в базу данных GenBank (accession number BankIt1812739 Seq1 KR063269). Затем на основе сиквенса были разработаны праймеры, несущие навески для рестриктазы BamHI, к центральной области гена psrA. Полученный ПЦР продукт был клонирован в вектор рTz57R/T и затем переклонирован в составе суицидального интегративного вектора рК18mob. В связи с необходимостью конъюгативного переноса созданной генно-инженерной конструкции в клетки бактерий *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162, на начальном этапе вектор рК18mob230psrA был трансформирован в клетки мобилизующего штамма *E. coli* BW19851.

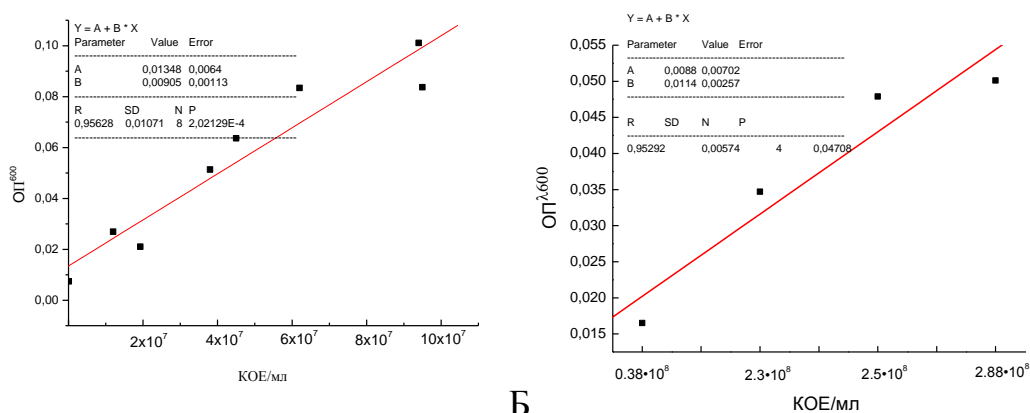


Рис. 1. Калибровочная кривая отражающая зависимость концентрации клеток от оптической плотности раствора. А — штамм *E. coli* BW19851, В — штамм *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162.

Следующий этап работы заключался в оптимизации методики сайт-направленного инсерционного мутагенеза с помощью плазмиды рK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*. Для этого на начальном этапе были определены ростовые характеристики штаммов (рис. 1), а также оптимальный температурный режим проведения скрещивания (28°C).

Установлено, что оптимальное соотношение донор:реципиент равно 1:50, при этом количество клеток реципиента должно составлять  $1 \times 10^9$ . Смесь клеток инкубировали в течение часа, отмывали и переносили каплями на поверхность твердой агаризованной среды и растили в течение суток при 28°C. Выросшие в медальонах клетки отмывали и переносили на селективную среду (полноценный агар с канамицином 50 мкг/мл и левомецетином 200 мкг/мл.). Инкубировали 48 часов при 28°C. В результате были отобраны 80 трансконъюгантов. Для идентификации вставки в нужную область генома был проведен ПЦР-анализ (рис. 2) и получен ожидаемый фрагмент размером 4770 п.о.

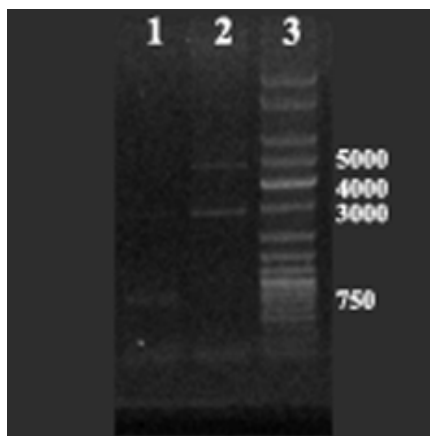


Рис. 2. ПЦР-анализ трансконъюгантов на основе *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* В-162.

Примечание: 1 — Штамм дикого типа В-162; 2 — рекомбинантный штамм В-162 рK18mob230psrA; 3 — маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range DNA Ladder (100bp-10kb), Jena Bioscience

#### Список использованной литературы

1. Kojic M. TetR family member psrA directly binds the *Pseudomonas* rpoS and psrA promoters / Kojic M., Aguilar C., Venturi V // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 2324–2330
2. Shen D. K. PsrA Is a Positive Transcriptional Regulator of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* / Shen D. K, Filopon D., Kuhn L., Polack B., Toussaint B.// *Infection and immunity.* 2006. V. 74. № 2. P. 1121–1129
3. Kang Y. The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 b-oxidation operon / Kang Y., Nguyen D.T., Son S., Hoang T.T // *Microbiology.* 2008. V. 54. P. 1584–1598
4. Gooderham J.W. Induction by Cationic Antimicrobial Peptides and Involvement in Intrinsic Polymyxin and Antimicrobial Peptide Resistance, Biofilm Formation, and Swarming Motility of PsrA in *Pseudomonas aeruginosa* / Good-

erham J.W., Bains M., McPhee J.B., Wiegand I., Hancock R.E.W. // J. of Bacteriology. 2008. V. 190. P. 5624–5634

5. Wu X. Multiple-Level Regulation of 2,4-Diacetylphloroglucinol Production by the Sigma Regulator PsrA in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 / Wu X., Liu J., Zhang W., Zhang L. // PLoS ONE. 2012. V. 7. Issue 11. P. 1-10

6. Fonseca P. A role for the regulator PsrA in the polyhydroxyalkanoate metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440 / Fonseca P., de la Peña F., Prieto M.A. // Int. J. of Biological Macromolecules. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.014>

7. Chin-A-Woeng T.F.C. The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Sigma Regulator psrA Represses the Production of the Antifungal Metabolite Phenazine-1-Carboxamide / Chin-A-Woeng T.F.C., van den Broek D., Lugtenberg J.J., Bloemberg G.V. // MPMI. 2005 V. 18. №. 3. P. 244–253

8. Schafer A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* / Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A // Gene. 1994. V. 145. P. 69-73

9. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D.W. Russel. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 2001–2344.

10. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; под ред. А.А. Баева. — Москва: Мир, 1984. С. 480.