

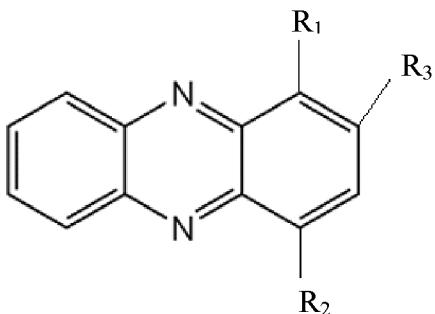
**ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ  
У БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* ПУТЕМ КЛОНИРОВАНИЯ *phzIR*  
ГЕНОВ И ВНЕСЕНИЯ В РОСТОВУЮ СРЕДУ АНТИОКСИДАНТНЫХ ДОБАВОК**

Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**Введение**

Феназиновые антибиотики представляют собой гетероциклические азотсодержащие соединения ароматической природы. Основу всех соединений данного ряда составляет феназин-1-карбоксилат, а феназин, 2-оксифеназин-1-карбоксилат, пиоцианин, оксихлорорафин, гемипиоцианин являются его производными (рисунок 1) [1, 2].



$R_1, R_2, R_3 = 0$  – феназин;  $R_1: COOH$  – феназин-1-карбоксилат;  $OH$  – гемипиоцианин;  
 $CONH_2$  – оксихлорорафин;  $R_1=O$ ,  $R_2=CH_3$  – пиоцианин;  $R_1=COOH$ ,  $R_3=OH$  – 2-оксифеназин-1-карбоксилат;  $R_1=COOH$ ,  $R_2=CH_3$  – 5-метилфеназин-1-карбоксилат

Рисунок 1 – Строение феназиновых антибиотиков

Благодаря выраженной антимикробной активности феназинов, в основе которой лежит способность генерировать активные формы кислорода ( $O_2^-$ ,  $OH^-$  и  $H_2O_2$ ), обладающие чрезвычайно высокой реакционной способностью и вызывающие гибель чувствительных к ним организмов, эти соединения представляют интерес как основа биопестицидных препаратов, а также для фармацевтической промышленности для разработки на их основе новых лекарственных препаратов противоракового действия [3].

Известно, что семь структурных генов синтеза феназинов (*phzABCDEFG*) и два регуляторных гена (*phzIR*) организованы в единый оперон размером 6,8 т.п.н. [4]. В настоящее время обнаружено еще четыре *phz*-гена, лежащие за его пределами, которые обеспечивают превращение феназин-1-карбоксилата в его производные. Продукты обоих генов *phzM* и *phzS* необходимы для синтеза пиоцианина, а *phzS*, кроме того, для синтеза 1-оксифеназина. Продукты генов *phzH* и *phzO* – феназин-1-карбоксамида и 2-оксифеназин-1-карбоксилата [5, 6].

Синтез феназиновых антибиотиков регулируется комплексом общих (глобальных) регуляторных систем вторичного метаболизма – позитивного (QS- и GacA/GacS-каскадная система) и негативного типа (*RpeA*) [7]. Ключевую роль в позитивном контроле синтеза феназиновых антибиотиков играет QS-система, повышающая экспрессию генов феназинового оперона и связанных с ним *phzM*, *phzS*, *phzH*, *phzO*-генов в ответ на увеличение плотности бактериальной культуры и накопление в среде сигнальных молекул, обеспечивающих межклеточные коммуникации [5, 6]. Роль сигнальных молекул у грамотрицательных бактерий выполняют N-ацил-гомосерин лактоны, синтез которых осуществляется ацил-гомосерин-лактон-синтазой – продуктом *phzI* гена [8]. Связывание сигнальных молекул с продуктом гена *phzR*, представляющим собой транскрипционный фактор, ведет к увеличению сродства последнего к высоко консервативным палиндромным последовательностям в промоторных областях регуляторных и структурных генов *phz*.

оперона (рисунок 1) [9]. Кластер генов *phzIR* с двух сторон окаймлен высоко консервативными палиндромными последовательностями – *phz*-боксами, которые являются сайтами связывания транскрипционного фактора (PhzR-белка) [10].

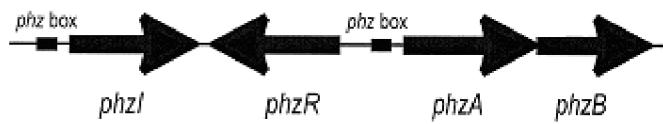


Рисунок 2 – Схема расположения регуляторных генов *phzIR* и *phz*-боксов феназинового оперона

Целью работы было изучить продукцию феназиновых антибиотиков у бактерий *P. aurantiaca* B-162 в ответ на повышение уровня синтеза продуктов *phzIR*-генов при их клонировании в составе плазмида pAYC31.

### Методы исследования

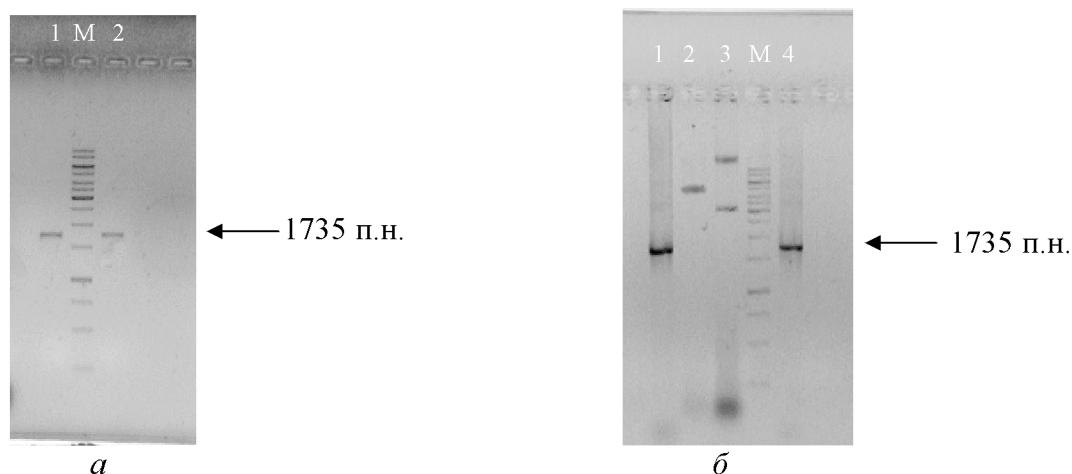
В работе использовали штамм *P. aurantiaca* B-162 и его мутанты, способные к сверхсинтезу феназинов B-162/255 и B-162/17, штамм *E. coli* XL-1Blue (F'proAB<sup>r</sup>lacZΔM15Tn10/recA1gyrA96(Nar<sup>r</sup>)thi-1hsdR17supE44relA1lac), а также известные плазмиды pTZ57R/T (Т-вектор) и pAYC31 (Sm<sup>r</sup>Ap<sup>r</sup>) (копийность в клетках грамотрицательных бактерий 15–20). Бактерии культивировали на среде ПСА [11], а также минимальной среде M9 [12] при 28°C и 37°C с аэрацией и без нее в зависимости от целей эксперимента.

Тотальную ДНК выделяли с применением саркозилового метода. Конструирование, выделение, рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca<sup>2+</sup>-зависимой трансформации и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [12]. В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы MBI Fermentas (Литва). Полимеразную цепную реакцию проводили в смеси стандартного состава [13] с использованием программируемого термостата ThermoHybaib RX2. Параметры циклов амплификации были следующими: первичная денатурация – 2 мин при 94°C; затем 30 циклов: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг – 53°C, 30 с; элонгация – 72°C, 2 мин 30 с; заключительная достройка – 72°C, 10 мин. Праймеры для ПЦР были сконструированы на основе информации из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. Последовательность прямого праймера: *cgcggatccaccgtgccctaccagat*; последовательность обратного праймера – *cgcggatccttggggcttggaaactaccgt* (выделены сайты для рестриктазы). Оба праймера содержат сайты для рестриктазы BamHI. Секвенирование проводилось с использованием секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Измерение концентрации N-гексаноил-гомосерин лактонов проводили известным способом [14]. Выявление феназинов осуществляли по методике, описанной ранее [11].

### Результаты и обсуждение

В качестве матрицы для амплификации участка регуляторных генов *phzIR* с промоторной областью и прилегающими к ней *phz*-боксами использовали тотальную ДНК бактерий *P. aurantiaca* B-162. Размер полученного ПЦР-продукта составил 1735 п.н., что полностью соответствует таковому для бактерий *P. aureofaciens* 30–84, в геноме которых, как известно, имеется участок *phzIR*-генов (рисунок 3а). Затем продукт амплификации *phzIR* был клонирован в составе плазмида pTZ57R/T и перенесен в клетки штамма *E. coli* XL-1Blu. Последующий электрофоретический анализ рекомбинантной плазмиды pTZ57R/T подтвердил наличие в ее составе вставки, идентичной по размерам ПЦР-продукту *phzIR*-генов (рисунок 3б). Для окончательной идентификации клонированного фрагмента было осуществлено его секвенирование (с обоих концов было отсеквенировано 808 и 643 п.о.), которое показало, что нуклеотидная последовательность *phzIR*-участка имеет высокую степень гомологии (до 94%) с имеющимися в базе данных NCBI Blast последовательностями *phzI* и *phzR* генов (таблица 1).



*a* – электрофорез ПЦР-продуктов *phzIR*-генов: 1 – бактерий *P. aurofaciens* 30–84 (контроль), 2 – бактерий *P. aurantiaca* B-162; *б* – ДНК плазмида pTZ57R/T со вставкой *phzIR*-генов: 1 – ПЦР-продукт *phzIR*-генов (контроль), 2 – линеаризированной по *Sma*I формы, 3 – кольцевой формы, 4 – ПЦР продукт плазмида со вставкой, М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Рисунок 3 – Электрофоретический анализ продуктов амплификации *phzIR*-генов и рекомбинантной плазмида pTZ57R/T с *phzIR*-вставкой

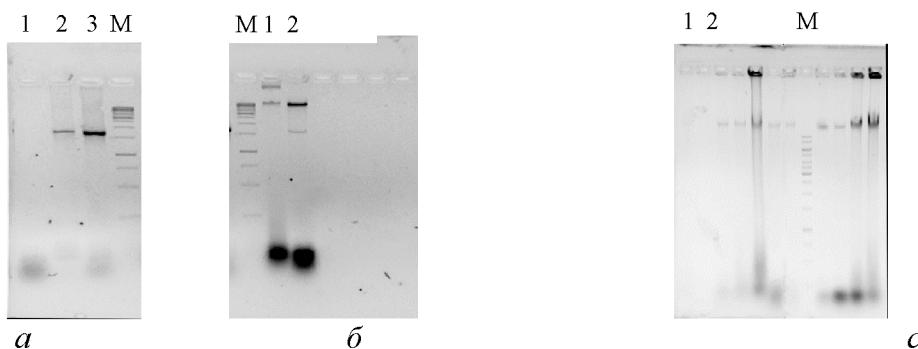
Таблица 1 – Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей клонированного фрагмента с последовательностями, имеющимися в базе данных

Код доступа	Описание	Процент гомологии
<a href="#">AY927995.1</a>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain O6 синтаза гомосерин лактонов PhzI ( <i>phzI</i> ), транскрипционный фактор PhzR ( <i>phzR</i> )	93%
<a href="#">FJ267646.1</a>	<i>Pseudomonas</i> sp. G5(2008b) PhzI ( <i>phzI</i> ) и PhzR ( <i>phzR</i> ) гены	92%
<a href="#">AF195615.1</a>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> синтаза гомосерин лактонов PhzI ( <i>phzI</i> ), транскрипционный фактор PhzR ( <i>phzR</i> ),	90%
<a href="#">L33724.1</a>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> синтаза гомосерин лактонов ( <i>phzI</i> ) ген	89%
<a href="#">EF626944.1</a>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain 30-84 PhzR ( <i>phzR</i> ) ген	93%
<a href="#">AF007801.1</a>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> PhzX ( <i>phzX</i> ) и PhzY ( <i>phzY</i> ) гены	94%

Для изучения экспрессии клонированных *phzIR*-генов в клетках *P. aurantiaca* было осуществлено их переклонирование в вектор pAYC31 (число копий на клетку 15–20) по *Bam*H сайту. Полученную таким образом конструкцию вводили с помощью трансформации в клетки штамма *P. aurantiaca* B-162 с последующим отбором плазмидсодержащих клонов на устойчивость к стрептомицину (350 мкг/мл). Затем клоны, несущие плазмиду pAYC31 со вставкой, отбирали с помощью ПЦР и рестрикционного анализа (рисунок 4*a* и *б*), а наличие плазмиды pAYC31*phzIR* в клетках нового хозяина было подтверждено с помощью электрофоретического анализа (рисунок 4*c*).

Подобным образом рекомбинантная плазмида pAYC31*phzIR* была введена в клетки мутантных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков – B-162/255 и B-162/17, полученных нами ранее с помощью НГ-мутагенеза [15]. Уровень синтеза феназинов у бактерий B-162/255 был выше, чем у дикого типа примерно в 5,6 раз и соответствовал

420 мг/л, а у B-162/17 – 210 мг/л [15]. Следует отметить, что штамм B-162/17 является производным B-162/255 и в отличие от своего предшественника характеризуется уникальной способностью синтезировать феназины на синтетических средах (например, минимальной среде M9), которая появилась, скорее всего, в результате мутации в *rpeA*-гене [16].



*a* – электрофорез ПЦР-продуктов: 1 – плазмиды pAYC31 без вставки (контроль), 2 – плазмиды со вставкой *phzIR*-генов, 3 – хромосомных генов *phzIR* *P. aurantiaca* (контроль), *b* – электрофорез плазмида pAYC31phzIR: 1 – кольцевая форма, 2 – линеаризированная *Bam*H I форма; *c* – электрофорез плазмида pAYC31phzIR, выделенной из трансформантов *P. aurantiaca*: 1 и 2 – без плазмида (контроль), остальные дорожки – трансформанты, М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Рисунок 4 – Электрофоретический анализ рекомбинантной плазмида pAYC31phzIR

Затем у полученных рекомбинантных штаммов анализировали уровень продукции N-гексаноил-гомосерин лактона. Ранее было показано, что бактерии *P. aurantiaca* синтезируют именно этот тип сигнальных молекул [17]. Проведенный анализ установил, что продукция N-гексаноил-гомосерин лактона у всех бактерий, несущих рекомбинантную плазмиду pAYC31phzIR, была в среднем выше в 1,3–1,9 раза по сравнению с бесплазмидными вариантами (таблица 2). Следует также отметить, что изначально, уровень синтеза N-гексаноил-гомосерин лактона у мутантных бактерий B-162/255 и B-162/17 был выше, чем у бактерий дикого типа в 1,2–1,9 раз и коррелировал с показателями продуктивности штаммов.

Что касается продукции феназиновых антибиотиков, то наиболее выраженный положительный эффект плазмида pAYC31phzIR наблюдался лишь при введении ее в клетки штамма B-162 дикого типа – выход феназинов у них возрос в 5,4 раза и достиг 410 мг/л на среде PCA (таблица 3). Ранее подобный эффект был обнаружен у бактерий *P. chlororaphis* PCL1391 [10]. Клонирование *phzIR*-генов в составе плазмида pMP4067, позволило авторам увеличить продукцию феназиновых антибиотиков примерно в 6 раз. Вместе с тем, у мутантных бактерий B-162/255 и B-162/17, уже имеющих высокий уровень синтеза феназинов, введение в их клетки плазмида pAYC31phzIR повысило выход феназинов лишь в 1,2 раза для штамма B-162/255 (pAYC31phzIR) – с 420 до 500 мг/л, и в 1,4 раза для штамма B-162/17(pAYC31phzIR) – с 210 до 300 мг/л.

Таблица 2 – Уровень синтеза N-гексаноил-гомосерин лактона плазмидсодержащими бактериями *P. aurantiaca* (pAYC31phzIR)

№	Штаммы <i>P. aurantiaca</i>	Уровень синтеза N-гексаноил-гомосерин лактона ( $\text{ОП}^{\lambda=585}$ )
1.	B-162 (дикий тип)	0,1016±0,0089
2.	B-162 (pAYC31phzIR)	0,1894±0,0118
3.	B-162/255	0,1828±0,0417
4.	B-162/255 (pAYC31phzIR)	0,2748±0,01374
5.	B-162/17	0,1187±0,0291
6.	B-162/17 (pAYC31phzIR)	0,1483±0,0215

Примечание. ОП – оптическая плотность при длине волнны  $\lambda=585$ .

Таблица 3 – Уровень синтеза феназинов плазмидсодержащими бактериями *P. aurantiaca* (pAYC31phzIR)

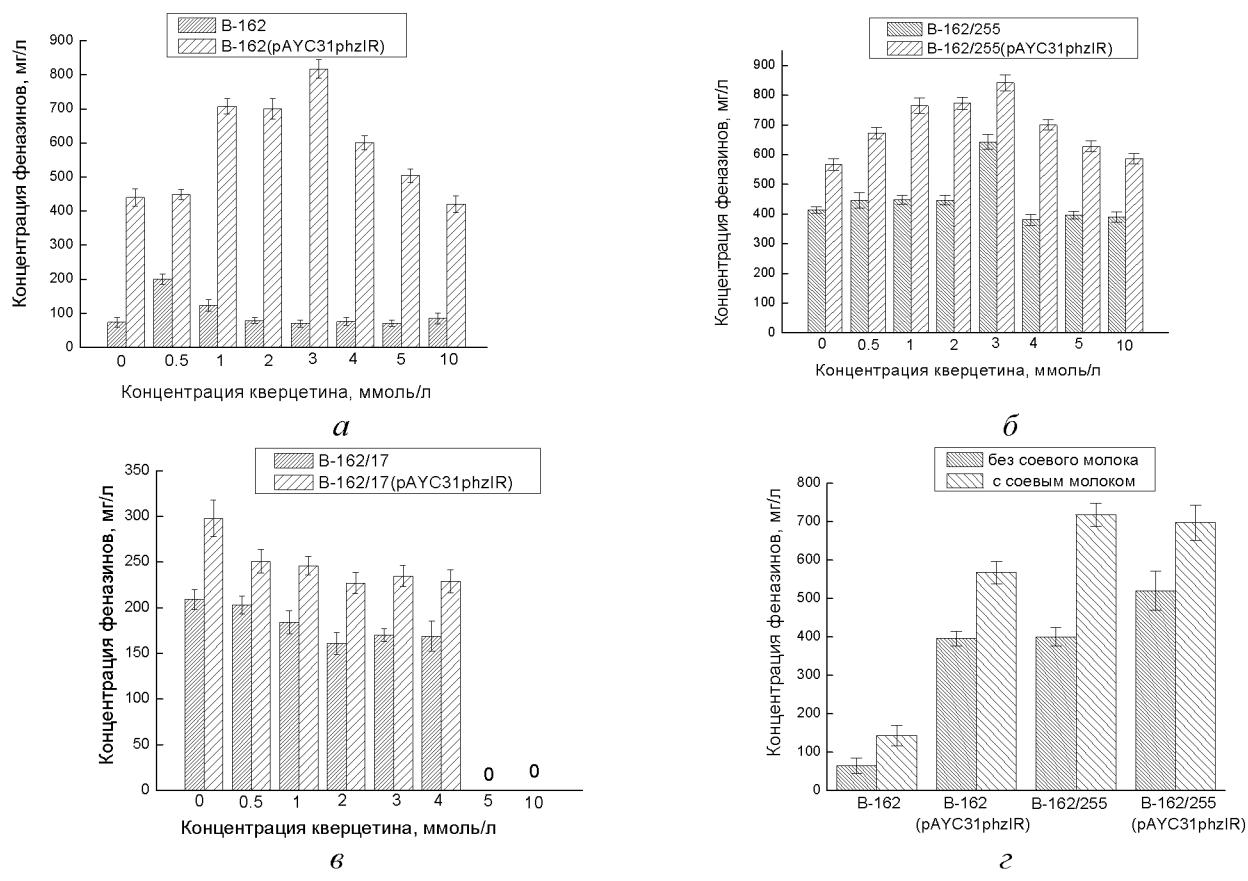
№	Штаммы <i>P. aurantiaca</i>	Уровень синтеза феназинов (мг/л)
1.	B-162 (дикий тип)	75±8,95
2.	B-162 (pAYC31phzIR)	410±25,83
3.	B-162/255	420±30,11
4.	B-162/255 (pAYC31phzIR)	500±29,78
5.	B-162/17	220±14,62
6.	B-162/17 (pAYC31phzIR)	300±17,84

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о наличии эффекта большей «отзывчивости» бактерий дикого типа на обусловленное плазмидными *phzIR*-генами повышение уровня синтеза феназинов, по сравнению с мутантными бактериями B-162/255 и B-162/17, уже имеющими изначально высокие уровни продукции феназинов. При этом для последних зарегистрирован верхний предел их продуктивности (около 500 мг/л). Таким образом, имеет место закономерность – чем выше исходный уровень синтеза феназинов у бактерий-продуцентов, тем сложнее обеспечить дальнейшее повышение этого показателя с помощью генетических методов. Причиной этого может быть негативного влияния высоких концентраций собственных феназинов на процессы метаболизма клеток-продуцентов в результате развития окислительного стресса при достижении их критической концентрации (500 мг/л). Если это действительно так, то введение в среду для культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов веществ, предотвращающих развитие окислительного стресса, даст возможность снизить негативное влияние феназинов и, тем самым, повысить выход антибиотиков. Выяснению данного факта и был посвящен следующий этап работы.

В качестве антиоксидантов нами были выбраны следующие известные в этом отношении соединения – бензоат натрия, кверцетин, ионол, а также богатый изофлавоноидами коммерческий продукт «соевое молоко» (производитель «PRAGOSOJA», Чехия). Наибольший положительный эффект был зарегистрирован при добавлении в среду культивирования в качестве антиоксидантов кверцетина и «соевого молока». Установлено, что присутствие кверцетина в концентрации 3 моль/л увеличивает уровень синтеза феназиновых антибиотиков у плазмидсодержащих бактерий B-162/255(pAYC31phzIR) в 1,5 раза, что соответствует 842 мг/л (рисунок 5б). Интересным оказался факт повышения выхода феназинов у мутантных бесплазмидных бактерий штамма-продуцента B-162/255 – в 1,5 раза (до уровня 643 мг/л) и у плазмидсодержащих бактерий дикого типа B-162(pAYC31phzIR) – в 1,9 раза (до 817 мг/л). Вместе с тем на клетки штамма B-162/17, культивируемые в минимальной среде М9, кверцетин оказывал скорее негативное действие (рисунок 5в), чем позитивное, что, по-видимому, связано с особенностями взаимодействия данного соединения с компонентами минеральной среды (наблюдалось образование нерастворимых комплексов).

Применение же в качестве добавки для культивирования бактерий на среде ПСА «соевого молока» в условиях периодического культивирования, позволяет увеличить выход феназинов в 1,3–2,2, причем наиболее высокий положительный эффект (повышение в 2,2 раза) был зарегистрирован для плазмидсодержащего штамма B-162/255(pAYC31phzIR) – выход феназинов у которого достиг величины 720 мг/л (рисунок 5г).

Последующее повышение выхода феназинов в присутствии антиоксидантов лимитируется и недостатком в среде культивирования источников углерода или азота, а используемая среда ПСА (или М9) перестает обеспечивать потребности изучаемых бактерий. Решить эту проблему позволит переход на режим непрерывного культивирования в условиях ферментера. Следует отметить, что способность антиоксидантных препаратов увеличивать выход феназиновых антибиотиков у штаммов-продуцентов обнаружена нами впервые.



влияние кверцетина: *а* – B-162 и B-162(pAYC31phzIR); *б* – B-162/255 и B-162/255(pAYC31phzIR); *в* – B-162/17 и B-162/17(pAYC31phzIR); *г* – влияния «соевого молока»

Рисунок 5 – Влияние антиоксидантов на синтез феназиновых антибиотиков у штаммов-продуцентов

### Список литературы

- Laursen, J.B. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity / J.B. Laursen, J. Nielsen // Chem. – 2004. – Vol. 104. – P. 1663–1686.
- Kerr, J.R. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors / J.R. Kerr // Infect. Dis. Rev. – 2000. – Vol. 2. – P. 184–194.
- Novel synthetic isoquinolino[5,4-ab]phenazines: Inhibition toward topoisomerase I, antitumor and DNA photo-cleaving activities / P. Yang [et al.] // Bioorganic. Medical Chem. – 2005. – Vol. 13. – P. 5909–5914.
- A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 / D.V. Mavrodi [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, № 9. – P. 2541–2548.
- Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / D.V. Mavrodi [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, № 21. – P. 6454–6455.
- Phz O, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 / S.M. Delaney [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, № 1. – P. 318–327.
- Whistler, Cheryl A. Repression of Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas aureofaciens* Strain 30–84 RpeA / Cheryl A Whistler, Lenard S. Pierson III // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 13. – P. 3718–3725.
- Identification and characterization of N-Acylhomoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing System in *Pseudomonas putida* KT 2440 / A. Steide [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, № 12. – P. 6371–6382.
- Pierson, L.S. Phenazine is regulated by PhzR in response to cell density / L.S. Pierson, V.D. Keppenne, D.W. Wood // J. Bacteriol. – 1994. – Vol. 176, № 13. – P. 3966–3874.

10. Phenazine-1-Carboxamide Production in the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Is Regulated by Multiple Factors Secreted into the Growth Medium / T.F.C. Chin-A-Woeng [et al.] // MPMI – 2001. – Vol. 14, № 8 – P. 969–979.
11. Levitch, M.E. A study of the biosynthesis of Phenazine-1-carboxylic acid / M.E. Levitch, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1964. – Vol. 106. – P. 194–199.
12. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва, 1984. – 480 с.
13. Ausubel, F.M. / F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston // Current protocols in molecular biology. – New York. – 1993. – Vol. 1.
14. Blosser, R.S. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers / R.S. Blosser, K.M. Gray // J. Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 40. – P. 47–55.
15. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca* – продуцентов антибиотиков феназинового ряда / Е.Г. Веремеенко [и др.] // Вестник БГУ. – 2009. – Серия 2, № 2. – С. 44–48.
16. Генетические подходы создания штаммов-продуцентов биологически активных соединений / Н.П. Максимова [и др.] // Труды Белорусского государственного университета, Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 15–55.
17. Феклистова, И.Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162: дис. ...канд.биол.наук:03.00.07 / И.Н. Феклистова – Минск, 2006 – 157 с.
18. Acyl-CoA-Dependent Regulation of Gene Expression in Bacteria, Yeast and Mammals / P.N. Black [et al.] // J. Nutr. – 2000. – Vol. 130. – P. 305–309.
19. Веремеенко, Е.Г. Механизмы устойчивости бактерий *Pseudomonas aurantiaca* – продуцентов феназиновых антибиотиков к собственным феназинам / Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова // Труды Белорусского государственного университета, Серия «Физиологические, биохимические, и молекулярные основы функционирования биосистем». – Т. 4, ч. 1. – С. 161–167.

**INCRESCENT OF PHENAZINE ANTIBIOTICS PRODUCTION IN BACTERIA  
*PSEUDOMONAS AURANTIACA* BY CLONING PHZIR GENES AND ENTERING  
THE ANTIOXIDANTS ADDITIVES AT CULTURAL MEDIUM.**

E.G. Veremeenko, N.P. Maksimova  
Belarusian State University, Minsk, Belarus

We have carried out a cloning phzIR-genes of positive regulation of phenazine antibiotics synthesis into pAYC31 in *P. aurantiaca* cells. The greatest positive effect of recombinant plasmid pAYC31 was recorded for bacteria wild type cells B-162 – production level increased 5,4 times and was 410 mg/l. At the same time in mutant strains B-162/255 and B-162/17, which have possessed heightened productivity before (420 mg/l и 210 mg/l, accordingly), in presence of pAYC31 plasmid phenazine antibiotics synthesis increased only 1,2 times (to 500 mg/l) and 1, 4 times (to 300 mg/l). It was shown, that the use of antioxidants as the additives in cultural medium additionally gives a chance to increase phenazine yield to 842 mg/l.