

7. Driver J., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock // Hort-Science.— 1984.— Vol.19.— P. 507–509.

8. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Inter. Pl. Prop. Soc.— 1980.— Vol.30.— P. 421–427.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15.— №13.— P. 473–497.

### **Резюме**

Представлены результаты сравнительного анализа регенерационной способности представителей рода *Crataegus* в культуре *in vitro*. Проанализировано влияние минеральной основы и гормонального состава питательных сред на морфогенные процессы.

Представлено результати порівняльного аналізу регенераційної здатності представників роду *Crataegus* у культурі *in vitro*. Проаналізовано вплив мінеральної основи та гормонального складу живильних середовищ на морфогенні процеси.

The results of comparative analysis of the genus *Crataegus* representatives regenerative ability in the *in vitro* culture are given. An impact of mineral basis and hormonal composition of nutrient mediums on the morphogeny processes was analyzed.

**ОСТАШ Б.О.<sup>1</sup>, МАКІТРИНСЬКИЙ Р.П.<sup>1</sup>, РАБИК М.В.<sup>1</sup>, ЗАБУРАННИЙ Н.В.<sup>1</sup>,  
ОСТАШ І.С.<sup>1</sup>, УОКЕР С.<sup>2</sup>, ФЕДОРЕНКО В.О<sup>1</sup>**

*Львівський національний університет імені Івана Франка,*

*<sup>1</sup>Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

*<sup>2</sup>Гарвардська медична школа,*

*США, 02115, Бостон, МА*

## **ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ, ЩО РЕГУЛЮЮТЬ ПРОДУКЦІЮ МОЕНОМІЦИНІВ У *STREPTOMYCES GHANAENSIS***

Сьогодні спостерігається значне поживлення інтересу до впровадження нових класів антибіотиків і фосфогліколіпідний антибіотик моюноміцин А (Мм, рис.) розглядається як одна із найперспективніших моделей у галузі розробки протибактерійних препаратів. Його продукує низка стрептоміцетів, зокрема *Streptomyces ghanaensis*. Моюноміцин А — єдиний відомий природний інгібітор глікозилтрансфераз (трансглікозилаз), що задіяні у передостанньому кроці біосинтезу пептидоглікану у бактерій [3]. Моюноміцин А виявляє активність у субнаномолярних концентраціях, що є найкращим показником серед усіх відомих антибіотиків. Він пригнічує метицилін- та ванкоміцин-резистентні бактерії. Сьогодні проводяться інтенсивні дослідження, спрямовані на створення похідних Мм за допомогою методів хімічного синтезу і генно-інженерних маніпуляцій [5, 7]. Гени біосинтезу Мм клонувано і секвеновано, а також встановлено основні етапи його біосинтезу [5, 6].

Водночас, механізми регуляції цього процесу не вивчено. Гени біосинтезу моеноміцину А у *S. ghanaensis* зосереджені у двох кластерах, але на відміну від більшості досліджених кластерів генів синтезу антибіотиків, в них не виявлено жодного регуляторного гена. Доведено, що застосувавши генно-інженерні підходи, можна отримати похідні Мм з покращеними фармакокінетичними параметрами, проте, їхній біосинтез відбувається на надзвичайно низькому рівні [5]. Метою роботи є пошук і дослідження генів, які потенційно задіяні у регуляцію біосинтезу а моеноміцину А та опрацювання підходів до отримання штамів з підвищеним синтезом цього антибіотика.

### **Матеріали і методи**

У роботі використано штами актиноміцетів *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* J1074, *S. lividans* TK24 та 1326, *S. coelicolor* M145 і M512, а також їхні похідні. *Escherichia coli* DH5a використали для маніпуляцій з субклонування ДНК, а *E. coli* ET12567 (pUB307) — для проведення міжродових кон'югацій. Як тест-культуру для визначення антибіотичної активності штамів актиноміцетів використали *Bacillus cereus* ATCC19637. Актиноміцети вирощували на вівсяному середовищі [1], а також у середовищах TSB і R5A [2] при температурі 28 °С, а *E. coli* — у середовищі LB при 37 °С. Схрещування *E. coli* — *Streptomyces* проводили на вівсяному середовищі згідно описаної методики [1] Антибіотичну активність штамів актиноміцетів визначали методом дифузії в агар і методом LS-MS. Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК, полімеразну ланцюгову реакцію, трансформацію *E. coli* проводили за стандартними методиками [2]. Аналіз *in silico* геномів *S. ghanaensis* і *S. albus* J1074 проводили, використовуючи такі програмні продукти, як Glimmer, Prodigal, BLAST, Elph, tRNAscan і Artemis.

### **Результати та обговорення**

**Використання штамів *S. lividans*, *S. coelicolor* і *S. albus* як гетерологічних господарів для експресії генів біосинтезу моеноміцинів.** У попередніх роботах нами показано можливість синтезу моеноміцинів за гетерологічних умов з використанням *S. lividans* TK24 [5, 6]. Проте рівень синтезу Мм був доволі низьким. До того ж продукування вихідним штамом *S. lividans* забарвлених метаболітів актинородину та ундецилпродегіозину значно утруднювало виявлення Мм. Тому ми вирішили перевірити штами *S. albus* і *S. coelicolor* щодо можливості ними синтезу Мм. *S. albus* J1074 широко використовують як гетерологічний господар для синтезу різноманітних сполук. Він характеризується дрібнодисперсним ростом і не синтезує забарвлених метаболітів. *S. albus* J1074 є чутливим до МмА, тому нами отримано mutant *S. albus* R1, стійкий до цього антибіотика.

Як гетерологічні господарі використано два штами *S. coelicolor* — M145 (продуцент антибіотиків актинородину та ундецилпродегіозину) та його похідний M512 *DactII-orf4*, *DredD*. У M512 делетовані гени шлях-специфічних активаторів біосинтезу згаданих антибіотиків, тому він їх не синтезує.

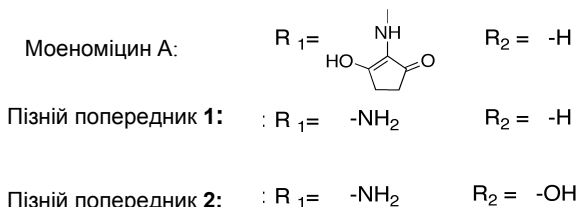
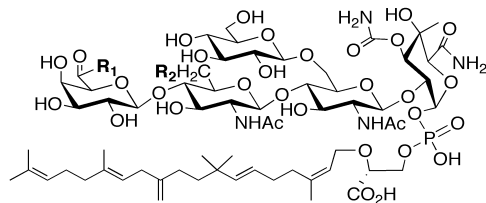


Рис. 1. Структурні формули молекул моеноміцинів. Моеноміцин А та пізній попередник 1 накопичуються штамом *S. ghanaensis*, а пізній попередник 2 синтезується гетерологічними господарями

Для досягнення поставленої мети сконструйовано косміду moeno38-5, що містить гени біосинтезу безхромових похідних ММА. Косміду перенесено у вищезазначені штами актиноміцетів за допомогою міжродової кон'югації *E. coli* — *Streptomyces*. Усі штами, що несли цю косміду, синтезували Мм. Результати LC-MS засвідчують, що *S. coelicolor* M512 moeno38-5<sup>+</sup> синтезує приблизно у три рази менше антибіотика, ніж *S. coelicolor* M145 moeno38-5<sup>+</sup>. Можливо, шлях-специфічні регулятори ActII-ORF4 та RedD, гени яких відсутні у M512, впливають на синтез Мм. Мутант *S. albus* R1 moeno38-5<sup>+</sup>, стійкий до Мм, продукує більше Мм, ніж чутливий до нього штам *S. albus* J1074 moeno38-5<sup>+</sup>. Рівень синтезу Мм у *S. albus* R1 moeno38-5<sup>+</sup> приблизно у два рази вищий, ніж у штамів *S. lividans*. У той час *S. coelicolor* M512 moeno38-5<sup>+</sup> продукує у 30 разів менше Мм, ніж *S. albus* R1 moeno38-5<sup>+</sup>. Ми також порівняли синтез Мм двома штамами *S. lividans*, що містять згадану косміду — диким типом 1326 та його мутантом TK24 з мутацією у гені *rpsL*, що кодує рибосомальний білок S12. Однак на відміну від *S. lividans*, де мутація *rpsL* зумовлювала значне зростання синтезу актинородину [4], вона не впливала на синтез Мм у *S. lividans* TK24 moeno38-5<sup>+</sup>. Отримані дані свідчать про штамову та видову залежність синтезу ММА. Отже, серед проаналізованих штамів найкращим гетерологічним господарем для експресії клонованих генів біосинтезу моеноміцинів є *S. albus* R1.

**Титрування промоторів генів *moeO5* і *moeE5*.** Гени *moeE5* і *moeO5* контролюють перші кроки біосинтезу моеноміцину А у *S. ghanaensis* [5]. Продукт гена *moeO5* — пренілтрансфераза, що каталізує утворення С15 ліпід-фосфогліцерату із фарнезил-пірофосфату і моеноциніл-пірофосфату.

моєЕ5 — епімераза, яка перетворює УДФ-глюкуронову кислоту у УДФ-галактуринову кислоту, і тим самим постачає перший цукор для біосинтезу ММА [6]. Ми припустили, що промотори цих генів можуть бути основними мішенями дії різних транскрипційних регуляторів. Для того, щоб оцінити вплив на них регуляторів ми використали метод титрування промоторів. Повну послідовність промоторів генів *моєЕ5* і *моєО5* ампліфіковано і клоновано в мультикопійну плазмиду рSOK101. Отримані рекомбінантні плаزمіди рSOKмоєО5р і рSOKмоєЕ5р, перенесено у штами *S. ghanaensis* і *S. albus* R1моє38-5<sup>+</sup>. Порівняли рівень продукції Мм у штамів, що несуть клоновані промотори — *S. ghanaensis* (+рSOKмоєО5р), *S. ghanaensis* (+рSOKмоєЕ5р), *S. albus* R1 (+моє38-5; +рSOKмоєО5р), і *S. ghanaensis*, що несе лише вектор рSOK101, а також у *S. albus* R1 з цим вектором і космоїдою моє38-5. Штами, які містять обидві мультикопійні плазміди з клонованими промоторами, синтезують менше Мм, контрольні штами. Падіння рівня синтезу антибіотика є більшим в штамів, що містять рSOKмоєО5р. Метаболіти *S. ghanaensis* (+рSOKмоєО5р) проаналізовано з допомогою методу ВЕРХ-МС. Отримані результати свідчать про падіння продукції Мм у більш, ніж чотири рази порівняно з контрольним штамом. Ці дані дають змогу припустити, що з промоторними ділянками ключових генів біосинтезу ММА *моєЕ5* і *моєО5* імовірно зв'язуються позитивні транскрипційні регулятори.

**Вивчення впливу глобальних регуляторних генів на біосинтез моєноміцинів штамми актиноміцетів.** Відсутність регуляторних генів, асоційованих із кластерами генів біосинтезу Мм, а також результати попередніх дослідів, дали змогу припустити, що деякі глобальні регуляторні елементи можуть впливати на синтез ММА. Низку глобальних регуляторів добре вивчено у *S. coelicolor*, тому ми провели аналіз *in silico* наявності їхніх гомологів у геномах *S. ghanaensis* і *S. albus*, які частково секвеновано.

Проаналізовано 10 імовірних генів негативної та 10 — позитивної регуляції. Усі вони присутні у геномі *S. ghanaensis* і більшість (16 із 20) — у *S. albus*. Вивчено вплив генів глобальних регуляторів *relA*, *afsS*, *afsR*, *nsdAgh* і *atrAgh* на рівень синтезу ММА, за умови їхньої надекспресії у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, а також *S. albus* R1 моє38-5<sup>+</sup>. Ці гени клоновано у складі плазмід рIJ6085, рKcafS рIJ2476 та перенесено у згадані штами. Надекспресія гена *relA* у *S. ghanaensis* спричиняла зростання синтезу ММА удвоє порівняно з вихідним штамом, тоді як *afsS* і *afsR* достовірно не підвищували рівень синтезу антибіотика. Так само *S. albus* R1 моє38-5<sup>+</sup>, в якому клоновано ген *relA*<sup>+</sup>, продукує у два рази більше антибіотика, ніж *S. albus* R1 моє38-5<sup>+</sup>. Надекспресія гена *afsS* зумовлювала зростання синтезу сполуки на 25%, а гена *afsR* — суттєво не впливала на біосинтез моєноміцинів. З'ясовано, що гени *nsdAgh* і *atrAgh* не впливають на синтез Мм за умов їхньої надекспресії у штамі *S. ghanaensis*. З усього сказаного випливає, що синтез ММА підлягає впливу певних глобальних регуляторів. Доведено можливість використання глобальних регуляторних елементів задля створення штамів зі збільшеним рівнем синтезу моєноміцинів.

## Висновки

1. Як гетерологічні господарі для синтезу моеноміцину А можна використати *S. albus*, *S. coelicolor* і *S. lividans*. Серед проаналізованих штамів найкращим гетерологічним господарем є *S. albus* R1, що несе косміду моепо38-5 з генами, які забезпечують біосинтез безхромосомних похідних МмА.

2. З промоторними ділянками ключових генів біосинтезу моеноміцину А *moeE5* і *moeO5* імовірно зв'язуються позитивні транскрипційні регулятори.

3. Біосинтез моеноміцину А підлягає впливу певних глобальних регуляторів. Надекспресія гена *relA* як у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, так і гетерологічному господарі *S. albus* R1мoe38-5<sup>+</sup>, спричиняє зростання синтезу антибіотика.

4. Мутація *rpsL* не впливає на синтез моеноміцину у клітинах гетерологічного господаря *S. lividans* ТК24 моепо38-5<sup>+</sup>.

## Література

1. 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.— 279 с.

2. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.— 634 p.

3. Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering // Bioci. Biochem. Biochem.— 2007.— Vol. 71, N6.— P. 1373–1386.

4. Ostash B., Walker S. Bacterial transglycosylase inhibitors // Curr. Opin. Chem. Biol.— 2005.— Vol. 9, N5.— P. 459–466.

5. Ostash B., Saghatelyan A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol.— 2007.— Vol. 14, N3.— P. 257–267.

6. Ostash B., Doud E. H., Lin C., Ostash I., Perlstein D. L., Fuse S., Wolpert M., Kahne D., Walker S. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // Biochemistry.— 2009.— Vol. 48, N37.— P. 8830–8841.

7. Ostash B., Makitrinsky R., Walker S., Fedorenko V. Identification and characterization of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 integration sites for three actinophage-based plasmids // Plasmid.— 2009.— Vol. 61, N3.— P. 171–175.

## Резюме

З'ясовано, що штами *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* і *S. lividans* можуть бути використані як гетерологічні господарі для експресії генів біосинтезу моеноміцинів, клонованих з *S. ghanaensis*. Надекспресія глобального регуляторного гена *relA* як у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, так і гетерологічному штамі *S. albus* R1мoe38-5<sup>+</sup>, спричиняє зростання синтезу моеноміцинів.

Установлено, что штаммы *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* и *S. lividans* можно использовать как гетерологические хозяева для экспрессии генов биосинтеза моеномицинов, клонированных из *S. ghanaensis*. Повышенная экспрессия гена глобального регуляторного гена *relA* как в штамме дикого типа *S. ghanaensis*, так и гетерологическом штамме *S. albus* R1мoe38-5<sup>+</sup>, обуславливает возрастание синтеза моеномицинов.

It has been shown that strains *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* and *S. lividans* can be used as heterologous hosts for expression of the biosynthetic genes from moenomycin cluster of *S. ghanaensis*. Overexpression of the global regulatory gene *relA* in both wild type strain *S. ghanaensis* and heterologous strain *S. albus* R1мoe38-5<sup>+</sup> led to increase of moenomycin production.

САХНО Л.А.<sup>1</sup>, ОСТАПЧУК А.Н.<sup>2</sup>, КЛОЧКО В.В.<sup>2</sup>, БАННИКОВА М.А.<sup>1</sup>,  
КУЧУК Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148,  
e-mail: sakhno2007@ukr.net

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины  
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

## ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *суп11А1* ЦИТОХРОМА P450<sub>SCC</sub> ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Цитохромы P450 — цитохром-зависимые могооксигеназы — это белки, вовлечённые в процессы биосинтеза регуляторных соединений, в том числе стероидных гормонов [1]. Растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1, в ядро которых был интегрирован ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения, опережали контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития, характеризовались увеличением количества растворимого белка, растворимых и нерастворимых углеводов, возрастом биомассы [2]. Наблюдаемый фенотипический эффект авторы объясняли влиянием новых биологически-активных стероидных веществ, не характерных для растений дикого типа. В нашей лаборатории были получены биотехнологические растения сельскохозяйственно ценных видов — рапса [3] и картофеля [4], в ядерный геном которых был введён упомянутый выше ген.

Поскольку рапс является третьей по количеству производимого растительного масла (после пальмы и сои [5]) масличной культурой в мире, представляло интерес изучение влияния введённого гена на качественный и количественный состав жирных кислот в трансформированных растениях рапса.

### Материалы и методы

**Растительный материал.** В качестве анализируемого материала использовали выращиваемые в условиях закрытого грунта и в условиях асептической культуры трансформированные растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., сорт Мария), несущие в ядерном геноме ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка [3].

**Газовая хромато-масс-спектрометрия эфиров жирных кислот.** Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили одноэтапно по методике [6]. Для определения использовали семена, полученные при самоопылении растений исходного сорта и первичных трансформантов в условиях теплицы. Кроме того, анализировали состав жирных кислот в листьях трансформантов T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>-поколения.

Для приготовления образцов навеску семян (50 мг) измельчали в ступке, переносили в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками, кото-