

ЮЩУК О.С.<sup>1</sup>, ГОРБАЛЬ Л.О.<sup>1,2</sup>, ДАЦЮК Ю.Р.<sup>1</sup>, ОСТАШ Б.О.<sup>1</sup>, ШТЕГМАНН Е.<sup>3</sup>,  
ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.<sup>2</sup>, ФЕДОРЕНКО В.О.<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка,  
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

<sup>2</sup> Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland,  
Germany, Saarbrücken

<sup>3</sup> Eberhard Karls University of Tübingen,  
Germany, Tübingen

✉ v\_fedorenko@franko.lviv.ua, (032) 239-44-07, (032) 239-44-75

## ГЛОБАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ МОРФОГЕНЕЗУ В СПОРАНГІАЛЬНИХ АКТИНОБАКТЕРІЙ

Такі грам-негативні таксони, як *Mycobacteriales* та *Caulobacteriales* чи грам-позитивні *Actinobacteria*, репрезентовані організмами, що демонструють різноманітні життєві форми та цікаві життєві цикли з чергуванням поколінь. Генетичні механізми регуляції морфогенезу в цих випадках є дуже складними. Серед актинобактерій найбільш дослідженими стали представники роду *Streptomyces*, що цікаві водночас як продуценти антибіотиків і як бактерії зі складними механізмами регуляції життєвого циклу. Основною життєвою формою стрептоміцетів є багатоклітинний полінуклеоїдний вегетативний міцелій. Після вичерпання джерел живлення вегетативний міцелій диференціюється із утворенням повітряного міцелію, який потім компартменталізується, а з його гіфів утворюються ланцюжки одноклітинних спор [1]. Разом із проростанням повітряного міцелію запускаються шляхи біосинтезу вторинних метаболітів. Регуляторні механізми морфогенезу та вторинного метаболізму є взаємопов'язаними. Дослідження, проведені на таких модельних об'єктах, як *Streptomyces coelicolor* та *Streptomyces griseus*, виявили присутність декількох генетичних каскадів, що задіяні в регуляції морфогенезу та вторинного метаболізму [2]. Гени, що кодують ці каскади, є консервативними і трапляються в багатьох секвенсованих геномах стрептоміцетів.

Незважаючи на те, що глобальні регуляторні механізми морфогенезу та вторинного метаболізму в представників роду *Streptomyces* є добре дослідженими, дані про аналогічну регуляцію в нестрептоміцетних актинобактерій є вкрай обмеженими [3]. Про глобальні регуляторні механізми у таких надзвичайно цікавих актинобактерій, як актинопланети (родина *Micromonosporales*), що утворюють рухомі спори всередині великих спорангієподібних структур, не відомо абсолют-

но нічого. У нашій роботі ми зосередилися на дослідженні механізмів глобальної регуляції морфогенезу в *Actinoplanes teichomyceticus*, що є продуцентом індустриально-важливого антибіотика тейкопланіну [4, 5]. У геномі *A. teichomyceticus* було здійснено пошук ортологів стрептоміцетних глобальних регуляторів. Функції деяких із них було досліджено за допомогою гетерологічної експресії в модельному об'єкті генетики актинобактерій – *S. coelicolor* або надекспресії в *A. teichomyceticus*.

### Матеріали і методи

У роботі використано такі штами: *A. teichomyceticus* NRRL-B16726, *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M1152, а також штами *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  для конструювання рекомбінантних плазмід та ET12567 pUZ8002 для кон'югаційного перенесення плазмід в *A. teichomyceticus*, *S. coelicolor* [6].

Для надекспресії генів, що кодують регулятори AdpA<sub>AT3</sub>, AdpA<sub>AT80</sub>, BldD<sub>AT</sub>, AbsB<sub>AT</sub>, SsgB<sub>AT</sub> в *A. teichomyceticus* та *S. coelicolor*, застосовано інтегративний вектор pSETpAm [7]. Для надекспресії гена, що кодує регулятор AdpA<sub>AT19</sub>, використано реплікативний вектор pKC1139 [8]. Конструювання рекомбінантних молекул ДНК та інші молекулярно-генетичні роботи здійснювалися згідно із стандартними протоколами [9]. У роботі було використано ферменти та реактиви від фірми Thermo Fisher Scientific відповідно до рекомендацій виробника.

Зразки для сканувальної електронної мікроскопії були напилені атомарним шаром міді. Мікрофотографії зроблено за допомогою сканувального електронного мікроскопа JEOL-220.

Біоінформатичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей проведено за допомогою пакета програм Geneious 4.8.5 [10].

## Результати та обговорення

**Елементи AdpA-опосередкованої регуляції в *A. teichomyceticus*.** Ключовим позитивним регулятором як морфогенезу, так і вторинного метаболізму в стрептоміцетів є транскрипційний регулятор AraC/XylS-типу AdpA [11]. Для AdpA описано один із найбільших регулонів серед грам-позитивних бактерій. Цей білок має знижену селективність і розпізнає доволі вироджену операторну послідовність ДНК. До регулону AdpA входять як глобальні, так і шлях-специфічні регулятори [12]. У свою чергу експресія *adpA* регулюється на транскрипційному, посттранскрипційному і на трансляційному рівнях. Транскрипція *adpA* залежна від присутності в середовищі факторів кворум-сенсингу, таких як А-фактор-подібні бутиролактони в *S. griseus* [11] чи SCB1 в *S. coelicolor* [13]; після транскрипції *adpA*-мРНК процесується AbsB РНКазою II типу [14]. У свою чергу регуляція на трансляційному рівні здійснюється за допомогою лейцил-тРНК, від присутності якої залежить зчитування рідкісного ТТА-кодону, що входить до складу всіх стрептоміцетних *adpA*. Мутанти стрептоміцетів, в яких зруйновано ген *adpA*, мають характерний «bald» фенотип: такі штами не здатні формувати повітряний міцелій і спори, а також не продукують антибіотиків [2]. AdpA-опосередкована регуляція була описана для багатьох стрептоміцетів.

Ми здійснили пошук усіх необхідних для AdpA-опосередкованої регуляції компонентів у геномі *A. teichomyceticus*. Як прототипи для пошуку були використані амінокислотні послідовності AdpA, AbsB зі *S. coelicolor*; послідовності ферментів біосинтезу факторів кворум-сенсингу з *S. griseus* (А-фактор), *S. coelicolor* (SCB1), *S. virginiae* (вірджиніє-бутанолід [15]) – AfsA, ScbA, BarX та відповідних рецепторів AgrA, ScbR, BarA. У результаті нами не було знайдено достовірного ортолога для AdpA в *A. teichomyceticus*: найподібніші гомологи при більш детальному дослідженні виявилися ортологами інших регуляторів AraC/XylS родини *S. coelicolor* чи інших стрептоміцетів, але не AdpA. Цікаво, що гени цих гомологів не мають у своєму складі ТТА-кодонів. Не було знайдено жодного ортолога для систем синтезу/розпізнавання факторів кворум-сенсингу. Натомість AbsB<sub>sc</sub> має ортолога в *A. teichomyceticus* (AbsB<sub>AT</sub>), ідентичність амінокислотних послідовностей AbsB<sub>sc</sub> та AbsB<sub>AT</sub> становить 65 %.

Хоча достовірний ортолог AdpA відсутній у *A. teichomyceticus*, ми вирішили гетерологічно експресувати в *S. coelicolor* гени, що кодують три

найподібніші його гомологи: *adpA*<sub>AT19</sub>, *adpA*<sub>AT80</sub> та *adpA*<sub>AT3</sub>. Як виявилось, деякі з цих гомологів все ж таки мають вплив на морфологічну диференціацію в *S. coelicolor*: Так, надекспресія *adpA*<sub>AT19</sub> кардинально пришвидшує формування повітряного міцелію та спор у *S. coelicolor* за умов вирощування на різних агаризованих середовищах та збільшує продукцію актинородину в десять разів [16]. Надекспресія *adpA*<sub>AT80</sub> має позитивний вплив на рівень синтезу актинородину в *S. coelicolor*, але не має жодного впливу на морфогенез. У свою чергу жодних відмінностей у рості та синтезі актинородину не спостерігалося в штаммах, що надекспресували *adpA*<sub>AT3</sub>.

Як уже зазначалося, відомою є послідовність ДНК, із якою зв'язується AdpA. Класичний сайт зв'язування регулятора AdpA у *S. griseus* розміщений у промоторній ділянці гена, що кодує шлях-специфічний регулятор біосинтезу стрептоміцину (StrR). Ми дослідили, чи здатні AdpA<sub>AT19</sub>, AdpA<sub>AT80</sub> та AdpA<sub>AT3</sub> взаємодіяти із промоторною ділянкою *strR in vitro*. Для цього фрагменти генів, що кодують N-термінальні ділянки AdpA<sub>AT19</sub>, AdpA<sub>AT80</sub> та AdpA<sub>AT3</sub>, які містять ДНК-зв'язувальні домени, злили з послідовністю гена *malE*, який кодує мальтозо-зв'язувальний білок. Рекombінантні гени надекспресували в *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS.

Виявилось, що рекombінантний білок, який містить ДНК-зв'язувальний домен AdpAgr (MalE-AdpA(246-405 ак.), взаємодіє з промоторною ділянкою *strR*. На противагу цьому рекombінантні білки MalE-Sc19(207-333 ак.), MalE-Sc3(200-327 ак.) та MalE-Sc80(199-324 ак.) не зв'язували промоторну ділянку *strR in vitro*. Однак ці дані не дають однозначної відповіді про ДНК-зв'язувальні властивості AdpA<sub>AT19</sub>, AdpA<sub>AT80</sub> та AdpA<sub>AT3</sub>, оскільки неспроможність зв'язувати промоторну ділянку може бути також наслідком неактивності очищених білків.

Підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що AdpA-опосередкованої регуляції в *A. teichomyceticus* (як і в інших Micromonosporales) швидше за все немає. Проте деякі AraC/XylS регулятори, що є гомологами AdpA в *A. teichomyceticus*, діють як позитивні регулятори морфогенезу та синтезу актинородину в *S. coelicolor*.

Ймовірну роль AbsB<sub>AT</sub> також було досліджено за допомогою гетерологічної експресії відповідного гена в штаммах *S. coelicolor*.

Ефекти гетерологічної експресії AbsB<sub>AT</sub> виявилися неочевидними і, можливо, залежали від середовища вирощування та генетичного фону

штамів *S. coelicolor*, в яких було здійснено експресію. На всіх досліджених агаризованих середовищах штами *S. coelicolor* M145  $absB_{AT}^+$  формували повітряний міцелій подібно до дикого типу. Лише на багатому середовищі R5 надекспресія мала помітний вплив на забарвлення повітряного міцелію, що ставало яскраво-рожевим. Це, швидше за все можна пояснити появою забарвлених антибіотиків в гіфах повітряного міцелію. Надекспресія  $absB_{AT}$  в *S. coelicolor* M1152, що не продукує забарвлених антибіотиків, призводила в свою чергу до прояву *whi*-фенотипу на деяких середовищах; на інших штами *S. coelicolor* M1152  $absB_{AT}^+$  були повністю заблоковані на етапі проростання повітряного міцелію (рис. 1). Виходячи з отриманих результатів, важко що-небудь сказати про точні функції  $AbsB_{AT}$ ; ймовірно, РНКаза  $AbsB_{AT}$  здатна розщеплювати транскрипти деяких *whi*-генів за певних умов у *S. coelicolor*. Та все ж  $AbsB_{AT}$  також виступає глобальним регулятором морфогенезу.

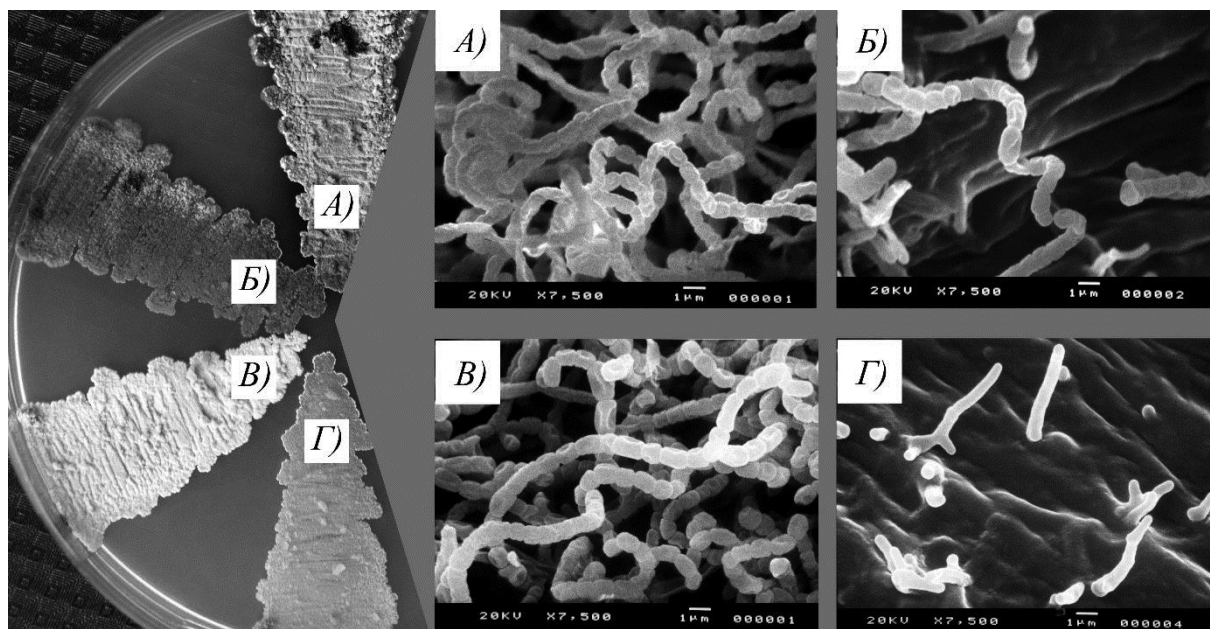
**BldD-опосередкована регуляція в *A. teichomyceticus*.** BldD є одним із найважливіших негативних регуляторів як морфогенезу, так і вторинного метаболізму в стрептоміцетів [17]. Цей регулятор одночасно є ключовим у *bld*-каскаді (регуляторний каскад проростання повітряного міцелію) і *whi*-каскаді (регуляторний каскад диференціації гіфів повітряного міцелію). На моделях *S. griseus* та *S. coelicolor* було показано, що BldD безпосередньо репресує експресію ге-

нів, які кодують  $\sigma$ -фактори  $\sigma^{BldN}$ ,  $\sigma^{WhiG}$ ,  $\sigma^H$  та транскрипційні регулятори BldM, WhiB, SsgA, SsgB [2]. У геномі *A. teichomyceticus* нам вдалося знайти гени, які кодують ортологи майже всіх перерахованих білків: BldD<sub>AT</sub> (68 % ідентичності амінокислотної послідовності із BldD *S. coelicolor*, SCO1489), BldN<sub>AT</sub> (68 % і.а.п. з SCO3323), BldM<sub>AT</sub> (50 % і.а.п. з SCO4768), WhiG<sub>AT</sub> (38 % і.а.п. з SCO5621), WhiB<sub>AT</sub> (56 % і.а.п. з SCO3034), SigH<sub>AT</sub> (55 % і.а.п. з SCO5243). Серед SsgA та SsgB (SCO3926, 1541) ортолог було знайдено лише для SCO1541: SsgB<sub>AT</sub> (54 % і.а.п.).

Отже, пошук *in silico* показав, що стрептоміцетний BldD, а також майже всі його мішені, мають своїх ортологів у *A. teichomyceticus*. Тому надзвичайно цікаво було дізнатися, чи BldD<sub>AT</sub> має функції, подібні до своїх стрептоміцетних ортологів, особливо беручи до уваги віддаленість родин Micromonosporales та Streptomycetales. Для цього ми гетерологічно експресували *bldD*<sub>AT</sub> в *S. coelicolor*.

Штами *S. coelicolor*, в яких було надекспресовано *bldD*<sub>AT</sub> виявилися помітно відмінними від дикого типу. *S. coelicolor bldD*<sub>AT</sub><sup>+</sup> не формували нормальні споруючі газони на більшості з використаних агаризованих середовищ, а також продукували помітно менше забарвлених антибіотиків (рис. 1).

Незважаючи на те, що BldD<sub>AT</sub> походить із віддаленої родини актинобактерій, він зберігає свої функції глобального негативного регулятора



**Рис. 1.** Морфологія та мікроморфологія газонів (5 день, сер. YMPG) штамів: А) *S. coelicolor* M145; Б) *S. coelicolor* M145**bldD**<sub>AT</sub><sup>+</sup>; В) *S. coelicolor* M1152; Г) *S. coelicolor* M1152 **absB**<sub>AT</sub><sup>+</sup>

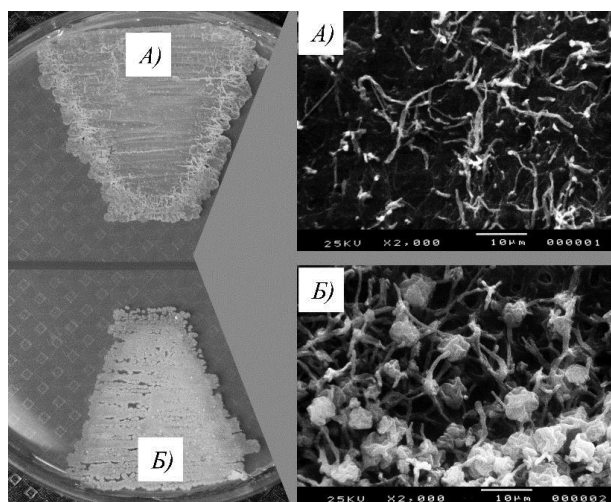


формування повітряного міцелію та вторинного метаболізму. Така консервативність ролі свідчить, що BldD вже був присутній в останнього спільного предка спорулюючих актинобактерій і вже тоді виконував функцію глобального негативного регулятора ранніх етапів морфогенезу.

**Надекспресія позитивного регулятора  $ssgB_{AT}$  в *A. teichomyceticus* та *S. coelicolor*.** У стрептоміцетів паралоги SsgA та SsgB виступають регуляторами септування гіфів повітряного міцелію, тобто задіяні в формуванні спор [18]. SsgA позитивно регулює SsgB, який в свою чергу контролює транскрипцію гена *ftsZ*. В *A. teichomyceticus* формування спор відбувається всередині спорангіїв, тому, ймовірно, генетичні механізми регуляції формування спор та спорангіїв є спільними.

Надекспресія  $ssgB_{AT}$  в *A. teichomyceticus* не мала помітного впливу на споруляцію під час вирощування на агаризованих середовищах ISP3 чи SM. Натомість, коли штами *A. teichomyceticus*  $ssgB_{AT}^+$  були посіяні на середовище ISP2, на якому *A. teichomyceticus* зазвичай формує поодинокі гіфи повітряного міцелію та ніколи не формує спорангіїв, стало помітно, що вони утворюють спорулюючий газон (рис. 2). Більше того, дослідження мікрморфології газонів *A. teichomyceticus*  $ssgB_{AT}^+$  за допомогою сканувальної електронної мікроскопії показало присутність розвинених спорангіїв (рис. 2). Гетерологічна експресія гена  $ssgB_{AT}$  в *S. coelicolor* M145 викликала більш раннє формування повітряного міцелію та спор.

Отже,  $SsgB_{AT}$  є ще одним прикладом глобального регулятора, функції якого подібні в представників віддалених родин Micromonosporales та Streptomycetales.



**Рис. 2.** Морфологія та мікрморфологія штамів *A. teichomyceticus* дикого типу (А) та з надекспресією  $ssgB_{AT}$  (Б), 6 день росту на середовищі ISP2

### Висновки

Глобальні регуляторні механізми морфогенезу в спорангіального актиноміцета *A. teichomyceticus* виявляються багато в чому подібними до досліджених у стрептоміцетів. Зокрема, показано, що такі регулятори, як BldD<sub>AT</sub> та SsgB<sub>AT</sub>, мають функції, подібні до стрептоміцетних ортологів. Такий консерватизм свідчить про стародавність цих регуляторних механізмів. Мабуть, найважливішою відмінністю, про яку можна говорити на цьому етапі досліджень, є відсутність AdpA-опосередкованої системи регуляції в *A. teichomyceticus*. Ця система, очевидно, виникла ексклюзивно у стрептоміцетів і не характерна для інших спорулюючих актинобактерій.

Ця робота підтримана грантом DAAD № 57048249 (для О.С. Ющука).

### ЛІТЕРАТУРА

1. Wildermuth H. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor* // J. gen. Microbiol. – 1970. – № 60. – P. 43–50.
2. McCormick J., Flardh. K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – 36, № 1. – P. 206–231.
3. Chng C., Lum A. M., Vroom J. A., Kao C.M. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea* // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 2008. – 105, № 30. – P. 11346–11351.
4. Parenti F., Beretta G., Berti M., Arioli V. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties // J. Antibiot. – 1978. – 31, № 4. – P. 276–283.
5. Wink J., Kroppenstedt R., Schumann P., Seibert G., Stackebrandt E. *Actinoplanes liguriensis* sp. nov. and *Actinoplanes teichomyceticus* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – 56, № 9. – P. 2125–2130.

6. Kieser T., Bibb J., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000. – 613 p.
7. Horbal L., Kobylyanskyy A., Truman A.W., Zaburranyi N., Ostash B., Luzhetskyy A., Marinelli F., Fedorenko V. The pathway-specific regulatory genes, *tei15\** and *tei16\**, are the master switches of teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – 98, № 22. – P. 9295–309.
8. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., Schoner B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. // Gene. – № 116. – P. 43–49.
9. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 1626 p.
10. Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // Bioinformatics. – 2012. – 28, № 2. – P. 1647–1649.
11. Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J.Y., Tomono A., Horinouchi S. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2005. – 69, № 3. – P. 431–439.
12. Higo A., Hara H., Horinouchi S., Ohnishi Y. Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network // DNA Res. – 2012. – 19, № 3. – P. 259–273.
13. Takano E., Chakraborty R., Nihira T., Yamada Y., Bibb M.J. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Mol. Microbiol. – 2001. – 41, № 5. – P. 1015–1028.
14. Xu W., Huang J., Lin R., Shi J., Cohen S.N. Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor // Mol. Microbiol. – 2010. – 75, № 3. – P. 781–791.
15. Lee Y.J., Kitani S., Nihira T. Null mutation analysis of an afsA-family gene, barX, that is involved in biosynthesis of the  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator in *Streptomyces virginiae* // Microbiology. – 2010. – № 156. – P. 206–210.
16. Ostash B., Yushchuk O., Tistechok S., Mutenko H., Horbal L., Muryn A., Dacyuk Y., Kalinowski J., Luzhetskyy A., Fedorenko V. The adpA-like regulatory gene from *Actinoplanes teichomyceticus*: *in silico* analysis and heterologous expression // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – 31, № 8. – P. 1297–1301.
17. den Hengst C.D., Tran N.T., Bibb M.J., Chandra G., Leski B.K., Buttner M.J. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth // Mol. Microbiol. – 2010. – 78, № 2. – P. 361–379.
18. Xu Q., Traag B.A., Willemsse J. et al. Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex actinomycetes // J Biol. Chem. – 2009. – 284, № 37. – P. 25268–25279.

**YUSHCHUK O.<sup>1</sup>, HORBAL L.<sup>1,2</sup>, DATSYUK JU.<sup>1</sup>, OSTASH B.<sup>1</sup>, STEGMANN E.<sup>3</sup>, LUZHETSKYY A.<sup>2</sup>, FEDORENKO V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Ivan Franko national university of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

<sup>2</sup> Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland,

Germany, Saarbrücken

<sup>3</sup> Eberhard Karls University of Tübingen,

Germany, Tübingen

## **GLOBAL REGULATORY MECHANISMS OF MORPHOGENESIS IN SPORANGIAL ACTINOBACTERIA**

**Aim.** Investigation was aimed to study global regulatory mechanisms that control morphogenesis and secondary metabolism in non-*Streptomyces* actinobacterium *A. teichomyceticus* which were studied insufficiently in comparison to those in *Streptomyces*. **Methods.** A number of microbiological, biochemical, gene-engineering and scanning electron microscopy methods were used in this study. **Results.** AdpA-mediated regulatory system appeared to be absent in *A. teichomyceticus*. However, the closest homologues of AdpA from *A. teichomyceticus* had some traits of positive global regulators. *A. teichomyceticus* possessed an orthologue of a streptomycetic global negative regulator BldD. Furthermore, the functions of BldD<sub>AT</sub> appeared to be similar to those observed in *Streptomyces*. All genes downregulated by BldD had their orthologues in *A. teichomyceticus*. We have shown that one of these genes – *sgb*<sub>AT</sub> – seemed to have functions similar to its orthologues from *Streptomyces*. **Conclusions.** Obtained results gave new insights about the global regulatory mechanisms of morphogenesis in non-streptomyces *Actinobacteria*.

**Keywords:** *Actinoplanes*, global regulators, morphogenesis, scanning electron microscopy.