

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОГО К НИТРОН-ОЛИГОМИЦИНУ МУТАНТНОГО ШТАММА *Streptomyces fradiae-nitR⁺bld*

© 2020 г. О. Б. Беккер¹*, А. А. Ватлин¹, Д. А. Мавлетова¹,
Л. Н. Лысенкова², А. Е. Щекотихин², В. Н. Даниленко¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: obbekker@mail.ru

Поступила в редакцию 11.10.2019 г.

После доработки 01.11.2019 г.

Принята к публикации 05.11.2019 г.

Штамм *Streptomyces xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 чувствителен к антибиотикам различных химических классов и сверхчувствителен к макролидному антибиотику олигомицину А. Спонтанный мутант *S. fradiae-nitR⁺bld*, устойчивый к нитрон-олигомицину, несет мутацию в гене транскрипционного регулятора PadR. Проведен сравнительный протеомный анализ инвертированных мембранных везикул мутантного штамма и штамма дикого типа *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609. С помощью масс-спектрометрического анализа были выявлены в везикулах мутантного штамма количественные изменения фракций белков двух ABC-транспортёров, лейцил-аминопептидазы, щелочной фосфатазы и аланиндегидрогеназы по сравнению с везикулами штамма дикого типа. В результате транскрипционного анализа было зарегистрировано увеличение уровней экспрессии генов ABC-транспортёров, щелочной фосфатазы и лейцил-аминопептидазы и падение уровня экспрессии гена аланиндегидрогеназы мутантного штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* по сравнению со штаммом дикого типа. Это позволило сделать предположение, что ген *padR*, в котором была обнаружена мутация, может участвовать в процессах регуляции устойчивости к антибиотику и дифференцировки.

Ключевые слова: *Streptomyces xinghaiensis* (*fradiae*), *padR*, нитрон-олигомицин.

DOI: 10.31857/S0016675820090027

Штамм *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 чувствителен к антибиотикам различных химических классов более других актинобактерий рода *Streptomyces* и сверхчувствителен к макролидному антибиотику олигомицину А и его производным [1–3]. Из штамма *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 был получен спонтанный мутант со слабо развитым воздушным мицелием (“лысый” (*bald*)) *S. fradiae-nitR⁺bld*, устойчивый к нитрон-олигомицину. Сравнительный геномный анализ штаммов *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 [4] и *S. fradiae-nitR⁺bld* выявил мутацию, которая привела к аминокислотной замене Н(24)Р в высококонсервативном ДНК-связывающем домене гена *padR* многофункционального транскрипционного регулятора [5].

В результате биоинформатического анализа генома *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 был обнаружен сайт связывания транскрипционного регулятора PadR в области 13 пн выше стартового кодона гена фактора транскрипции *marR*. Индукция нитрон-олигомицином в логарифмической фазе роста культур *S. fradiae-nitR⁺bld* и штамма

дикого типа приводит к значительному увеличению уровня экспрессии гена *marR* у мутантного штамма по сравнению со штаммом дикого типа [5].

Факторы транскрипции семейства MarR (множественный регулятор устойчивости к антибиотикам) могут регулировать оперон *marRAB* и участвовать в процессах устойчивости к множественным стрессам окружающей среды [6]. Белок DptR3 семейства MarR функционирует в качестве глобального регулятора, который положительно контролирует синтез антибиотика даптомицина и морфологическое развитие *S. roseosporus* [7].

Для визуализации качественных и количественных различий между белками штамма дикого типа и штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* был проведен двумерный электрофорез в ПААГ фракций белков инвертированных мембранных везикул двух штаммов. Препараты инвертированных мембранных везикул растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 16.7% раствора (30% CHAPS, 10% NP-40), 80 мМ ДТТ, 5% амфолиты (pH 3–10). Изоэлектрофокусировку

Таблица 1. Спектр количественных изменений белков и их характеристика у мутанта *S. fradiae*-nitR⁺bld и *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609

Номер в GenBank	Молекулярная масса, кДа	Аннотация белка в GenBank	Предполагаемая функция	Количественные изменения белковой фракции в штаммах <i>S. xinghaiensis</i> (<i>fradiae</i>)	
				ATCC19609	nitR ⁺ bld
WP_043466588.1 PstS	39.319	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	Включен в процессы транспорта фосфата и дифференцировки	—	+
WP_043465859.1 OppA	59.683	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	Включен в процессы адгезии	—	+
WP_043468956.1 PhoD-like	57.761	Alkaline phosphatase	Включен в метаболизм неорганических ионов	—	+
WP_043470568.1 Aminopeptidase A	51.676	Leucyl aminopeptidase	Включен в процессы споруляции	—	+
WP_043468956.1 Ald	39.366	Alanine dehydrogenase	Включен в процессы споруляции	+	—

проводили на 7 см IPG Strips (pH 3–10, Bio-Rad, США) с использованием PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad, США), согласно рекомендациям производителя. Во втором направлении использовали 12.5% SDS-ПААГ. Гели окрашивали CBV R-250. Качественные изменения были детектированы с помощью масс-спектрометрического анализа белковых фракций везикул в первой половине логарифмической фазы роста штаммов *S. fradiae*-nitR⁺bld и дикого типа. Образцы для масс-спектрометрии были получены методом, рекомендованным Promega (США) (In Gel Digest Protocol); масс-спектры — методом, рекомендованным Bruker Daltonics (США), с помощью аналитического масс-спектрометра Ultrafle Xtreme MALDI TOF/TOF Ms (Bruker Daltonics GmbH, Германия) в отделе протеомных исследований Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН. Белки были идентифицированы с использованием программного обеспечения Mascot (www.matrixscience.com) и базы данных NCBI. Было зарегистрировано количественное увеличение фракций белков двух ABC-транспортеров, щелочной фосфатазы и лейцил-аминопептидазы, а также отсутствие белковой фракции аланиндегидрогеназы в штамме *S. fradiae*-nitR⁺bld по сравнению со штаммом дикого типа (табл. 1).

Белки щелочной фосфатазы (WP_043468956.1) и лейцил-аминопептидазы (WP_043470568.1) находятся в одной и той же белковой фракции. Возникает вопрос: какой из двух генов мутантного штамма обладает повышенным уровнем экспрессии? Исследование экспрессии генов было проведено с использованием метода ПЦР в реальном времени. Определение количественного измене-

ния уровней транскрипции двух генов ABC-транспортеров (WP_043466588.1, WP_043465859.1) и гена аланиндегидрогеназы (WP_043468956.1) также проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени в пробах, отобранных в первой половине логарифмической фазы роста. Для синтеза кДНК использовали стандартные процедуры, установленные Invitrogen Company (США). Все ампликоны имели длину ~150 пн, все эксперименты были проведены в трех независимых повторях. Геноспецифичные праймеры, использованные в этом эксперименте, представлены в табл. 2. Для постановки реакций амплификации использовали мастер-смеси Power PCB SYBR® Green (Applied Biosystems), амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad). Экспрессия генов была нормализована на экспрессию генов “домашнего хозяйства” *dna-polymerase I*, *gtp-ase*. Изменение уровней экспрессии генов рассчитывали с использованием метода 2^{-ΔΔCt}. Мы зарегистрировали 6-кратное и 3-кратное увеличение уровней экспрессии генов ABC-транспортеров *pstS* и *opp*, 2.5-кратное увеличение — гена щелочной фосфатазы *phoD* и 3-кратное увеличение — гена лейцил-аминопептидазы мутантного штамма (рис. 1). Уровень экспрессии гена аланиндегидрогеназы штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld был многократно ниже по сравнению со штаммом дикого типа, что соответствует результатам масс-спектрометрического анализа.

Увеличение уровня синтеза белка лейцил-аминопептидазы может внести свой вклад в образование “лысого” (bald) — фенотипа штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld. Делеция гена лейцил-аминопептидазы у *S. coelicolor* привела к усилению споруля-

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

№	Название гена	Номер в GenBank	Последовательности олигонуклеотидных праймеров
1	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS	gi 759756058	CGACTGGAAGTACGAGGACG ACCGAGTTGAGGTTGTTGCT
2	Peptide ABC transporter substrate-binding protein Oop	gi 759755325	GTTGTGCGCCCTTCTCCATCA AAGGTCAAGGGCATGTACCG
3	Alanine dehydrogenase <i>ald</i>	gi 759758444	TGCTGCTCAAGGTGAAGGAG GGTCTCCACCGTCTCGTAGG
4	Alkaline phosphatase <i>phoD-like</i>	gi 759752118	CAGGATGATCGTCGAGACCT CAGCACCCGGTAGTGGATTT
5	Leucyl aminopeptidase	gi 759760072	GAAGGACTTCGGGTGCAGG AGAAGGACGACAAGAGCACG
6	<i>dna-polymerase I</i>	WP_043463190.1	GAACGACCCGAACCTGGTTGA CGGAGAAGGTGCAGGAGAAG
7	<i>gtp-ase</i>	WP_043460113.1	CATCCACGCCAACCTCTACA GTCCTTGGCGACCTTCACAT

ции у исследуемого штамма [8], следовательно увеличение уровня экспрессии гена, вероятно, приводит к ослаблению процесса спорообразования.

Увеличение количества белка щелочной фосфатазы может быть вызвано проблемами утилизации фосфора [9], что, по всей видимости, связано с процессами дифференцировки у стрептомицетов [10]. Клеточная стенка большинства грамположительных бактерий содержит равные количества пептидогликана и гликополимеров фосфат-богатой тейхоевой кислоты. Во время роста, лимитированного фосфатом, грамположительного модельного организма *Bacillus subtilis*-168 тейхоевая кислота терялась из клеточной стенки в результате ответа, опосредованного двухкомпонентной системой PhoPR, которая регулирует гены, участвующие в сохранении и приобретении фосфата. Считается, что тейхо-

вая кислота обеспечивает источник фосфора для поддержания роста в условиях голода [11].

PstS, мембраносвязанный липопротеин, необходим для высокоаффинного транспорта фосфатов в *S. coelicolor* [12]. PstS-1, 38-кДа *M. tuberculosis*, — маннозилированный гликолипопротеин. Опыт его ингибирования с использованием маннана и иммунопреципитации показал, что PstS-1 связывает рецептор маннозы [13]. Делетирование генов *pstS* у *S. lividans* и *S. coelicolor* нарушало транспорт фосфатов и ускоряло дифференцировку и споруляцию культур на твердых средах [14]. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение уровня экспрессии *pstS* влияет на приобретение “лысого фенотипа” мутантным штаммом *S. fradiae*-nitR⁺bld.

Олигопептидпермеаза (Opp) — белок-связывающий АТФ-зависимый ABC-транспортёр [15]. Кас-

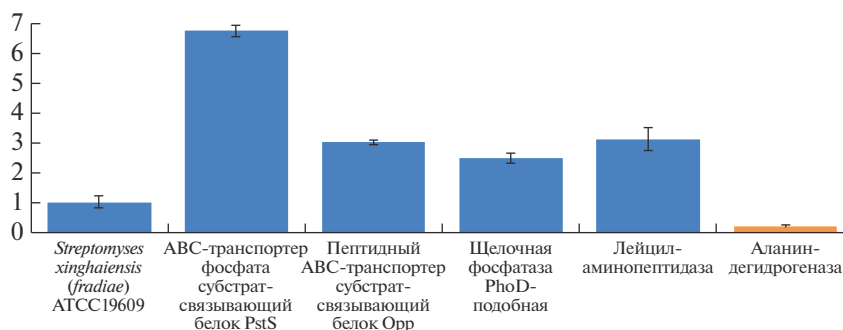


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии генов *S. fradiae*-nitR⁺bld в сравнении с *S. xinghaiensis (fradiae)* ATCC19609 в первой половине логарифмической фазы. Относительная экспрессия генов *S. fradiae*-nitR⁺bld по сравнению со штаммом *S. xinghaiensis (fradiae)* ATCC19609 была рассчитана с использованием сравнительного метода Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), принимая экспрессию генов в *S. xinghaiensis (fradiae)* ATCC19609 за единицу. Экспрессия целевых генов была нормирована на экспрессию генов домашнего хозяйства.

сета с олигопептид-пермеазой, система транспорта олигопептидов, относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассет (АВС) и широко распространена у бактерий. У *Streptococcus suis* белки Опр играют важную роль в вирулентности патогена, делеция гена *oprA* значительно влияет на его рост и вирулентность. Темпы роста, а также способность к адгезии штамма с делетированным геном на эпителиальные клетки человека значительно уменьшаются по сравнению со способностью штамма дикого типа [16]. В работе [17] подтверждается роль ОпрАв стимуляции адгезии *Lactobacillus casei* и *Lactococcus lactis* на культуры эукариотических клеток.

Таким образом, результаты протеомного исследования и транскрипционного анализа объясняют bald-фенотип мутантного штамма. Мы можем предположить, что устойчивость к нитрон-олигомицину обуславливается процессами, связанными с метаболизмом фосфата в клетке.

Работа поддержана грантом РНФ № 15-00141П – “Изучение механизма действия и формирование резистентности к олигомицину А и его производным у актинобактерий.”

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alekseeva M.G., Elizarov S.M., Bekker O.B. et al. F0F1 ATP synthase of streptomycetes: Modulation of activity and oligomycin resistance by protein Ser/Thr kinases // Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2009. V. 3. № 1. P. 16–23. <https://doi.org/10.1134/S1990747809010036>
2. Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M. et al. Synthesis and anti-actinomycotic activity of the oligomycin A thiocyanato derivative modified at 2-oxypyrrol side chain // Macroheterocycles. 2015. V. 8(4). P. 424–428. <https://doi.org/10.6060/mhc151084s>
3. Lysenkova L.N., Saveljev O.Y., Grammatikova N.E. et al. Verification of oligomycin A structure: synthesis and biological evaluation of 33-dehydrooligomycin A // J. Antibiot. (Tokyo). 2017. V. 70(8). P. 871–877. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.48>
4. Bekker O.B., Klimina K.M., Vatlin A.A. et al. Draft genome sequence of *Streptomyces fradiae* ATCC19609, a strain highly sensitive to antibiotics // Genome Announcements. 2014. V. 2(6). e01247–14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01247-14>
5. Vatlin A.A., Bekker O.B., Lysenkova L.N. et al. A functional study of the global transcriptional regulator PadR from a strain *Streptomyces fradiae*-nitR⁺bld, resistant to nitron-oligomycin // J. Basic. Microbiol. 2018. V. 58(9). P. 739–746. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800095>
6. Gong Z., Li H., Cai Y. et al. Biology of MarR family transcription factors and implications for targets of antibiotics against tuberculosis // J. Cell Physiol. 2019. V. 234(11). P. 19237–19248. <https://doi.org/10.1002/jcp.28720>
7. Zhang Q., Chen Q., Zhuang S. et al. A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus* // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81(11). P. 3753–3765. <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-15>
8. Song E., Rajesh T., Lee B.R. et al. Deletion of an architectural unit, leucyl aminopeptidase (SCO2179), in *Streptomyces coelicolor* increases actinorhodin production and sporulation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97(15). P. 6823–6833. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4847-4>
9. Solans M., Messuti M.I., Reiner G. et al. Exploring the response of Actinobacteria to the presence of phosphorus salts sources: Metabolic and co-metabolic processes // J. Basic. Microbiol. 2019. V. 59(5). P. 487–495. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800508>
10. Franco-Correa M., Quintana A., Duquea C., Suarez C. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities // Appl. Soil. Ecol. 2010. V. 45. P. 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.007>
11. Myers C.L., Li F.K., Koo B.M. et al. Identification of two phosphate starvation-induced wall teichoic acid hydrolases provides first insights into the degradative pathway of a key bacterial cell wall component // J. Biol. Chem. 2016. V. 9. № 291(50). P. 26066–26082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.760447>
12. Wehmeier S., Varghese A.S., Gurcha S. et al. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes // Mol. Microbiol. 2009. V. 71(2). P. 421–433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06536.x>
13. Esparza M., Palomares B., García T. et al. PstS-1, the 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis // Scand. J. Immunol. 2015. V. 81(1). P. 46–55. <https://doi.org/10.1111/sji.12249>
14. Díaz M., Esteban A., Fernández-Abalos J.M., Santamaría R.I. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans* // Microbiology. 2005. V. 151(Pt 8). P. 2583–2592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27983-0>
15. Moutran A., Quaggio R.B., Balan A. et al. The oligopeptide permease (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri // Curr. Microbiol. 2004. V. 48(5). P. 354–359. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4206-2>

16. Zheng F., Shao Z.Q., Hao X. et al. Identification of oligopeptide-binding protein (OppA) and its role in the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 // Microb. Pathog. 2018. V. 118. P. 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.061>
17. Martín C., Escobedo S., Pérez-Martínez G. et al. Two alkaline motifs in the *Lactobacillus salivarius* Lv72 OppA surface are important to its adhesin function // Benef. Microbes. 2019. V. 8. № 10(1). P. 101–109. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0052>

Comparative Proteomic and Transcriptome Analysis of a Mutant Strain of *Streptomyces fradiae*-nitR⁺bld Resistant to Nitron-Oligomycin

O. B. Bekker^{a,*}, A. A. Vatlin^a, D. A. Mavletova^a,
L. N. Lysenkova^b, A. E. Shchekotikhin^b, and V. N. Danilenko^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bGauze Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: obbekker@mail.ru

The strain *Streptomyces xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 is sensitive to antibiotics of various chemical classes and is hypersensitive to the macrolide antibiotic oligomycin A. The spontaneous mutant *S. fradiae*-nitR⁺bld, resistant to nitron-oligomycin, is mutant in the gene of the transcriptional regulator PadR. A comparative proteomic analysis of the inverted membrane vesicles of the mutant and wild-type *S. xinghaiensis* (*fradiae*) ATCC19609 was performed. The mass spectrometric analysis revealed quantitative changes in the protein fractions of two ABC transporters, leucylaminopeptidase, alkaline phosphatase and alanine dehydrogenase in the vesicles of the mutant strain compared to wild type vesicles. The result of transcriptional analysis was an increase in gene expression levels of ABC transporters genes, alkaline phosphatase and leucylaminopeptidase genes, and decrease in the expression level of the alanine dehydrogenase gene of the mutant strain *S. fradiae*-nitR⁺bld as compared to the wild-type strain were recorded. This suggested that the padR gene in which the mutation was detected may be involved in the regulation of antibiotic resistance and differentiation.

Keywords: *Streptomyces xinghaiensis* (*fradiae*), padR, nitron-oligomycin.