



УДК 577.214:577.152.11.1.\*10.01

## КЛОНИРОВАНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТРИПТОФАН-7-ГАЛОГЕНАЗЫ ИЗ ШТАММА *Pseudomonas aureofaciens* ACN

© 2004 г. В. Н. Бурдь<sup>\*,#</sup>, К.-Х. ван Пе<sup>\*\*</sup><sup>\*</sup>Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, 230012, Гродно, пер. Доватора, 3/1, Беларусь;<sup>\*\*</sup>Институт биохимии, ТУ, Дрезден, ФРГ

Поступила в редакцию 04.04.2003 г. Принята к печати 07.10.2003 г.

Из бактериального штамма *Pseudomonas aureofaciens* ACN, являющегося продуцентом хлорсодержащего антибиотика пирролнитрина, выделен ген триптофан-7-галогеназы и осуществлено его секвенирование. Установлена высокая степень гомологичности (более 95%) между генами и между соответствующими им галогеназами клеток *P. aureofaciens* ACN и *P. fluorescens* BL915. Методом ПЦР синтезирован исследуемый ген триптофан-7-галогеназы и осуществлена его экспрессия в клетках *E. coli* с помощью вектора pBSII SK+.

*Ключевые слова:* галогеназа, пирролнитрин, триптофан, *Pseudomonas*.

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что история природных галогенсодержащих соединений насчитывает более одного столетия – впервые галометаболит 3,5-диодитирозин был выделен из морского организма *Gorgonia cavolinii* в 1896 г. [1], – до недавнего времени галогенсодержащие вещества считались редко встречаемыми. Интенсивные исследования в этой области начали проводиться только в последние десятилетия. Так к 1961 г. было известно только 29 природных галометаболитов. К настоящему времени выделено и охарактеризовано более 3000 таких соединений [2, 3]. Повышенный интерес к природным галогенсодержащим соединениям вызван тем, что наличие галогена существенно повышает биологическую активность соединения по сравнению с его негалогенированным аналогом [2, 4]. Многие из галометаболитов нашли применение в фармакологии, например антибиотики хлорамфеникол, ванкомицин, хлортетрациклин, пирролнитрин и др.

Наличие в природе галометаболитов предполагает существование особых ферментов, способных катализировать образование связи углерод–галоген. Впервые галогеназа была выделена из гриба *Caldariomyces fumago* в 1966 г. [5]. Поскольку реакция галогенирования, катализируемая этим ферментом, могла протекать только в присутствии пероксида водорода, данная группа

галогеназ была названа галогенидпероксидазами (КФ 1.11.1.10).

В зависимости от наличия и структуры кофактора галогенидпероксидазы подразделяют на три группы: гемзависимые, металлозависимые и не содержащие кофактора. Исследование механизма каталитического действия галогенидпероксидаз показало, что непосредственным галогенирующим агентом выступает гипогалогеновая кислота [6, 7]. Реакция, как правило, носит электрофильный характер и отличается невысокой специфичностью. Дальнейшие исследования показали, что галогенидпероксидазы не участвуют в биосинтезе галогенсодержащих метаболитов [7, 8].

В 1997 г. из клеток *Pseudomonas fluorescens* BL915 удалось выделить кластер генов биосинтеза пирролнитрина (3-(2-нитро-3-хлорфенил)-4-хлорпиррол) [9]. Исходным соединением для синтеза пирролнитрина является триптофан (схема). Превращение катализируется четырьмя ферментами *pmA*, *pmB*, *pmC* и *pmD*, из которых два – галогеназы: триптофан-7-галогеназа (*pmA*) и монохлораминопирролнитрингалогеназа (*pmC*). Оба фермента являются FADH<sub>2</sub>-зависимыми и представляют собой новый класс галогенирующих ферментов [10].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе приведены данные по исследованию гена триптофан-7-галогеназы из бактериального штамма *Pseudomonas aureofaciens* ACN, являющегося продуцентом пирролнитрина.

Сокращения: *pmA* – триптофан-7-галогеназа, продукт гена *pmA*; X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индоллил-β-D-галактопиранозид; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид.

<sup>#</sup>Автор для переписки (эл. почта: burd@mail.grsu.grodno.by).

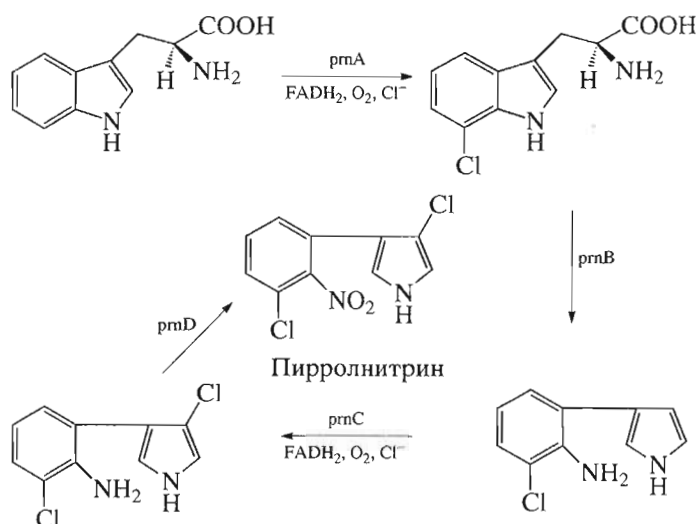


Схема биосинтеза пирролнитрина с участием ферментов *prnA*, *prnB*, *prnC* и *prnD*.

Для обнаружения гена триптофан-7-галогеназы хромосомную ДНК *P. aureofaciens* ACN гидролизовали в отдельных пробах рядом эндонуклеаз, полученные фрагменты разделяли методом электрофореза в 0.7% агарозном геле и иммобилизовали на нейлоновой мембране. Дальнейший поиск искомого гена осуществляли методом гибридизации, используя в качестве зонда ген триптофан-7-галогеназы (*prnA*) *P. fluorescens* BL915 [11], меченный диоксигенином. Расчет степени гомологичности между зондом и ДНК-мишенью осуществляли с помощью формулы [12]:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.61 \lg[\text{Na}^+] + 0.41 (\%G + C),$$

где  $T_m$  – температура плавления ДНК;  $[\text{Na}^+]$  – концентрация ионов  $\text{Na}^+$  в растворе;  $\%G + C$  – среднестатистическое содержание нуклеотидов G и C.

Известно, что уменьшение температуры на  $1^\circ\text{C}$  вызывает снижение степени гомологичности на 1% [12]. Среднестатистическое GC-содержание ДНК *Pseudomonas* равно 64% [13]. Учитывая вышесказанное, гибридизацию проводили при  $78^\circ\text{C}$  в растворе с концентрацией ионов  $\text{Na}^+$  равной 0.975 М, что обеспечивало степень гомологичности 70–100%. При последующей отмывке неспецифически связанного зонда степень гомологичности повышалась до 75% ( $71^\circ\text{C}$ ,  $[\text{Na}^+] 0.195 \text{ М}$ ). Полученный таким образом результат гибридизации приведен на рис. 1. Как видно, исследуемая ДНК содержит участок, родственный гену *prnA* со степенью гомологичности более 75%. Для последующего клонирования были выбраны фрагменты ДНК, полученные после расщепления хромосомной ДНК *P. aureofaciens* ACN рестриктазой *EcoRI*.

Фрагменты ДНК, полученные обработкой хромосомной ДНК из клеток *P. aureofaciens* ACN эндонуклеазой *EcoRI*, лигировали с вектором

*pUC18*. Рекомбинантной плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli* TG1. После отбора колоний на средах, содержащих ампициллин, X-gal и IPTG, получили геномную библиотеку, состоящую из 2000 клонов. Дальнейший поиск

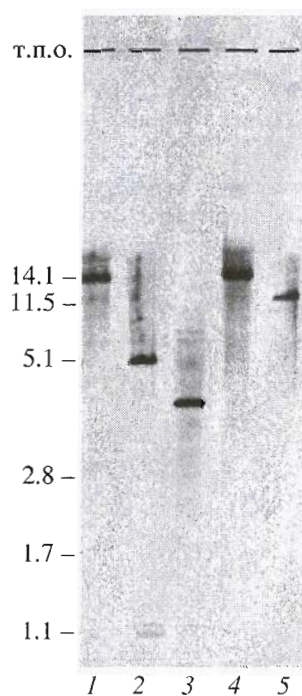


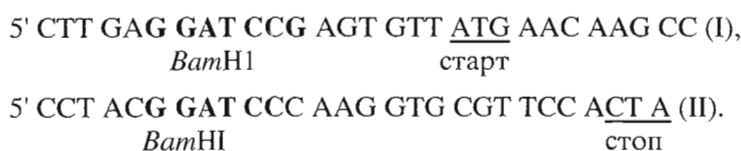
Рис. 1. Гибридизация хромосомной ДНК *P. aureofaciens* ACN, расщепленной рестриктазами *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Bgl*II и *Kpn*I (дорожки 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно) с геном триптофан-7-галогеназы (*prnA*) из *P. fluorescens* BL915, меченным диоксигенином. Визуализация после гель-электрофореза в 0.7% агарозе и переноса на нейлоновую мембрану хемилюминесцентным методом [18]. Степень гомологичности составила 75–100%.

клона осуществляли методом гибридизации с тем же зондом. Таким образом были получены клоны рWB A76 и рWB A136, содержащие гибридизующиеся с зондом вставки *EcoRI*-фрагментов длиной 5.2 и 1.0 т.п.о., соответственно (рис. 2). В соответствии с картой рестрикции клонов было осуществлено субклонирование и последующее секвенирование ряда фрагментов ДНК, содержащих искомым ген. Полученные результаты секвенирования ДНК размещены в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) [14], а соответствующая аминокислотная последовательность представлена на рис. 3.

Анализ и сравнение результатов секвенирования с уже известным геном *prnA* из *P. fluorescens* BL915 [15] показали, что указанные гены состоят

из одинакового числа нуклеотидов (1617 п.о.) и имеют степень гомологии 96%. К аналогичным результатам приводит и анализ соответствующих аминокислотных последовательностей (рис. 3). Обе галогеназы состоят из 539 а. о., при этом отличие наблюдается в 26 позициях, т. е. степень гомологичности составляет 95%.

Полученные нами клоны рWB A76 и рWB A136 содержат отдельные фрагменты гена *prnA* *P. aureofaciens* ACN. Синтез полномасштабного гена, пригодного для клонирования и последующей экспрессии, осуществлен методом ПЦР на матрице хромосомной ДНК *P. aureofaciens* ACN с помощью пары праймеров I и II, включающих сайты рестриктазы *Bam*HI, а также старт- и стоп-кодона:



Как видно из рис. 4, подобранные условия ПЦР позволили получить единичный фрагмент ДНК длиной 1.7 т.п.о. Данный фрагмент ДНК был очищен методом электрофореза, обработан эндонуклеазой *Bam*HI и лигирован с мультикопийным вектором рUC18, линеализированным той же рестриктазой и дефосфорилированным. Полученной рекомбинантной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* TG1. В сырых экстрактах клеток, несущих плазмиды с нормальной и обратной относительно промотора ориентациями гена, галогенирующая активность не обнаружена. Введение в культуральную среду IPTG не индуцировало экспрессию гена. Клонирование амплифицированного гена *prnA* с помощью эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI в векторе рBSII SK+ (Stratagene, США) [16] под контролем *tac*-промотора позволило достичь экспрессии целевого гена в клетках *E. coli* TG1. Фермент в активной форме обнаруживается в сыром экстракте клеток (рис. 5). При этом галогенирующая активность проявляется только в бесклеточном экстракте клона

рWB AAT с нормальной ориентацией гена относительно промотора.

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружен и клонирован ген триптофан-7-галогеназы из *P. aureofaciens* ACN. Проведенное секвенирование показало, что гены, кодирующие галогеназы из *P. aureofaciens* ACN и *P. fluorescens* BL915, а также соответствующие им белки обладают высокой степенью гомологичности – 96 и 95% соответственно. Методом ПЦР синтезирован полноразмерный ген триптофан-7-галогеназы *P. aureofaciens* ACN и осуществлена его экспрессия в клетках *E. coli* TG1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Секвенирование ДНК проводили на приборе DNA-Sequencer (GATC-Gesellschaft) с использованием наборов реактивов фирмы "Pharmacia". ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе LiChrospher 100, снабженным УФ-детектором. Хроматографирование проводили на колонке RP-18 (4.6 × 250 мм) в системе метанол–вода (60 : 40). Амплификацию ДНК проводили на автоматическом приборе Personal Cyler (Biometra).

В работе использовали ферментные препараты фирм "Fermentas" (Литва) и "Boehringer Mannheim" (ФРГ).

### Культивирование и селекция микроорганизмов.

В работе использованы штаммы *P. fluorescens* ACN, продуцент антибиотика пирролнитрина и *Escherichia coli* TG1 (*lacZ*) [17].

Клетки *P. fluorescens* ACN и *E. coli* TG1 выращивали при 30 и 37°C соответственно в среде, содержащей 1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой

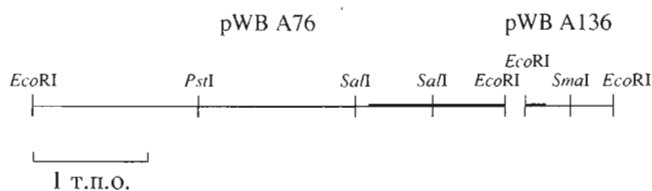


Рис. 2. Схема вставок *EcoRI*-фрагментов ДНК *P. aureofaciens* ACN в клоны рWB A76 и рWB A136. Утолщенной линией изображен ген триптофан-7-галогеназы. Указаны участки расщепления рестриктазами.

1	MNKPIKNIVI	VGGGTAGWMA	ASYLVRALQQ	QANITLIESA	AIPRIGVGEA	50
	-----	-----	-----	-----E	-----	
51	TIPSLQKVFF	DFLGIPEREW	MPQVNGAFKA	AIKFDVNRKS	PDPSRDDHfy	100
	-----	-----	-----	-----	-----GS-----	
101	HLFGNVPNCD	GVPLTHYWLR	KREQGFQQPM	EYACYQP	PGA	150
	-----	-----	-----	-----A	-----P	
151	DGTRQMSHAW	HFDAHLVADF	LKRWAVERGV	NRVVDEVVDV	RLNNRGYISN	200
	-----	-----	-----	K-----	H-E-----S	
201	LLTKEGRTLE	ADLFIDCSGM	RGLLINQALK	EPFIDMSDYL	LCDSAVASAV	250
	-F-----	-----	-----	-----	-----	
251	PNDDARDGVE	PYTSSIAMNS	GWTWKIPMLG	RFGSGYVFSS	HFTSRDQATA	300
	-----E	-----A	-----	-----	-----K	
301	DFLKLWGLSD	NQPLNQIKFR	VGRNKRAWVN	NCVSIQGLSSC	FLEPLESTGI	350
	-----	-----	-----	-----	-----	
351	YFIYAALYQL	VKHFPDTSFD	PRLSDAFNAE	IVHMFDDCRD	FVQAHYFTTS	400
	-----	-----	-----	---Y-----	-----A	
401	RDDTPFWLAN	RHDLRLSDAI	KEKVQRYKAG	LPLTTTSFDD	STYYETFDYE	450
	-E-----	-----	-----	-----	-----	
451	FKNFWLNGNY	YCIFAGLGML	PDRSLPLLQH	RPESIEKAEA	MFASIRREAE	500
	-----	-----	-----	-----	-----	
501	RLRTSLPTNY	DYLRSLRDGD	AGLSRGQRGP	KLAAQESL		539
	-----	-----	T---HSSS---	NVE---T-		

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей триптофан-7-галогеназ *P. aureofaciens* ACN (верхняя строчка) и *P. fluorescens* BL915 (нижняя строчка, показаны только несовпадающие аминокислотные остатки).

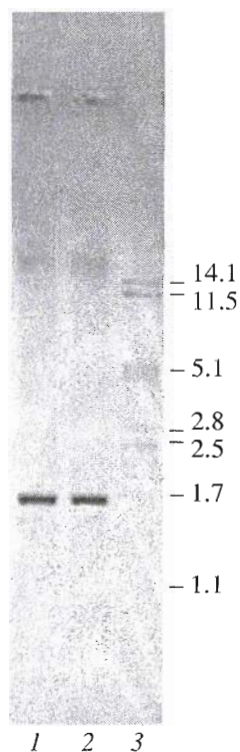
экстракт, 0.5% NaCl, или на чашках Петри на этой же среде с добавлением 1% агара. Селекцию трансформантов *E. coli* проводили на той же агаризованной среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 40 мкг/мл X-gal и 0.2 мМ IPTG [18].

**Гибридизация, клонирование и секвенирование ДНК.** Выделение хромосомной ДНК из *P. fluorescens* и плазмид из *E. coli* проводили по описанным методикам [19].

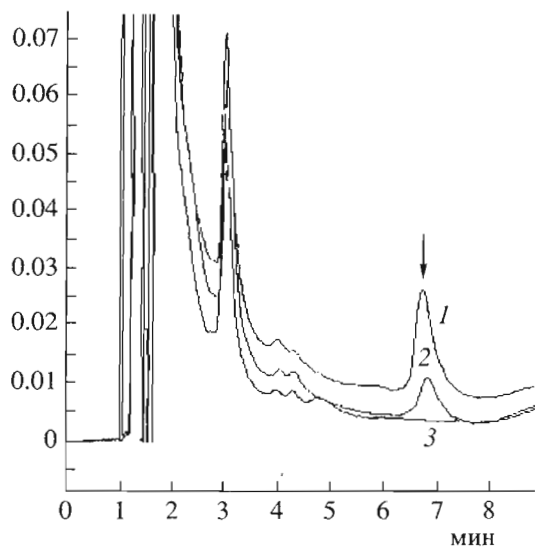
Все операции с ДНК осуществляли по методикам, приведенным в работах [18, 19]. Поиск гена

триптофан-7-галогеназы осуществляли с помощью маркированного диоксигенином [18] гена *prnA* из штамма *P. fluorescens* BL915 [11]. Реакцию маркирования проводили с использованием набора "DIG DNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) по прилагаемой методике. Секвенирование ДНК по Сэнгеру осуществляли по известным методикам [18] с использованием стандартных для вектора pUC18 праймеров [18].

**Полимеразная цепная реакция.** Инкубационная смесь (100 мкл) содержала 1 мкг хромосомной



**Рис. 4.** Гель-электрофорез в 0.7% агарозе продуктов ПЦР-амплификации гена триптофан-7-галогеназы из *P. aureofaciens* ACN (дорожки 1 и 2). Молекулярный маркер – ДНК фага  $\lambda$ , расщепленная *PstI* (дорожка 3).



**Рис. 5.** Хроматограмма ВЭЖХ тест-реакций на галогенирующую активность сырых экстрактов клеток, несущих плазмиды с геном *prnA* из *P. aureofaciens* ACN в прямой (клон pWB AAT, кривая 1) и обратной (клон pWB AATR, кривая 3) относительно промотора ориентацией, а также с геном *prnA* из *P. fluorescens* BL915 [16] (клон pREN14, кривая 2). Указанные стрелкой пики соответствуют 7-хлортриптофану.

ДНК, *Taq*-буфер (Fermentas), по 50 пмоль праймеров, по 7.5 мкмоль каждого dNTP и 5 ед. акт. *Taq*-полимеразы (Fermentas), которую добавляли в реакционную смесь после денатурации при 95°C в течение 5 мин. Затем проводили пять циклов с температурой отжига 34°C, последующие 30 циклов – с температурой отжига 60°C. Реакцию полимеризации на протяжении всех циклов проводили при 72°C, а денатурацию – при 95°C.

**Ферментативная активность.** Биомассу клеток суспендировали в 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH 6.8), обрабатывали ультразвуком в течение 6 мин при 2°C, затем центрифугировали (20 мин, 20000 g). Полученный сырой экстракт использовали для определения галогенирующей активности. 1 мл реакционной смеси, содержащий 200 мкл сырого экстракта, 20 мМ NaCl, 2 мМ NADH, 0.2 мМ *L*-триптофан, 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH 6.8), инкубировали 16 ч при комнатной температуре. После термической денатурации белков и центрифугирования реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ. О галогенирующей активности судили по наличию и величине пика 7-хлортриптофана.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drechsel E. // Z. Biol. 1896. V. 33. P. 85–107.
2. Neidleman S.L., Geigert J. Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications. Chichester, England. UK: Ellis Horwood, 1986.
3. van Pee K.-H. // Annu. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 375–399.
4. van Pee K.-H., Ligon J.M. // Nat. Prod. Rep. 2000. V. 17. P. 157–164.
5. Hager L.P., Morris D.R., Brown F.S., Eberwein H. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 1769–1777.
6. Dunford H.B. Heme Peroxidases. N. Y.: Wiley-VCH, 1999.
7. van Pee K.-H. // Arch. Microbiol. 2001. V. 175. P. 250–258.
8. Facey S., Gross F., Vining L.C., Yang K., van Pee K.-H. // Microbiology. 1996. V. 142. P. 657–665.
9. Hammer P.E., Hill D.S., Lam S.T., van Pee K.-H., Ligon J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 2147–2154.
10. Hohaus K., Altmann A., Burd W., Fischer I., Hammer P.E., Hill D.S., Ligon J.M., van Pee K.-H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997. V. 36. P. 2012–2013.
11. Kirner S., Hammer P.E., Hill D.S., Altmann A., Fischer I., Weislo L.J., Lanahan M., van Pee K.-H., Ligon J.M. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 1039–1043.
12. Schneider J., Mueller L. // Forum microbiol. 1986. V. 6. P. 254–262.
13. Wolffram C., Lingens F., Mutzel R., van Pee K.-H. // Gene. 1993. V. 130. P. 131–135.
14. Hammer P.E., Burd W.N., Hill D.S., Ligon J.M., van Pee K.-H. // www.ncbi.nlm.nih.gov. AF161182.



15. Hammer P.E., Hill D.S., Lam S.T., van Pee K.-H., Ligon J.M. // www.ncbi.nlm.nih.gov. U74493.
16. Keller S., Wage T., Hohaus K., Hoelzer M., Eichhorn E., van Pee K.-H. // *Angew. Chem.* 2000. V. 112. P. 2380–2382.
17. Gibson T.J. // *Studies on the Epstein-Barr Virus Genome*. Ph. D.thesis. Cambridge University, 1984.
18. Gassen H.G., Schrimpf G. // *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitseinleitungen für das molekularbiologische Labor*. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 1999.
19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

## Tryptophan 7-Halogenase from *Pseudomonas aureofaciens* ACN Strain: Gene Cloning and Sequencing and the Enzyme Expression

V. N. Burd\*\* and K.-H. van Pee\*\*

<sup>#</sup>E-mail: burd@mail.grsu.grodno.by

\*Kupala State University, per. Dovatora 3/1, Grodno, 230012 Belarus

\*\*Institute of Biochemistry, Technical University, Dresden, Germany

The gene of tryptophan 7-halogenase was isolated from the *Pseudomonas aureofaciens* ACN strain producing pyrrolnitrin, a chlorocontaining antibiotic, and sequenced. A high homology degree (over 95%) was established for the genes and the corresponding halogenases from *P. aureofaciens* ACN and *P. fluorescens* BL915. The tryptophan 7-halogenase gene was amplified by PCR, and the corresponding enzyme was expressed in *Escherichia coli* cells using the pBSII SK+ vector. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* halogenase, *Pseudomonas*, pyrrolnitrin, tryptophan