УДК 579.222.3:579.66:579.61

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРОВ LaeA И LovE В БИОСИНТЕЗЕ ЛОВАСТАТИНА ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ПОЛИАМИНОВ У Aspergillus terreus

© 2019 г. А. А. Жгун^{1,} *, Г. К. Нураева¹, М. А. Эльдаров¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

> **e-mail: Zzhgun@mail.ru* Поступила в редакцию 27.02.2019 г. После доработки 16.05.2019 г. Принята к публикации 20.06.2019 г.

Мицелиальный гриб Aspergillus terreus — основной промышленный продуцент холестерин-понижающего препарата ловастатина и получаемого на его основе симвастатина. Биосинтез ловастатина у *A. terreus* находится под контролем двух основных положительных регуляторов, путь-специфического регулятора LovE и глобального регулятора вторичного метаболизма грибов LaeA. Показано, что экспрессия *laeA* может негативно регулироваться LovE, Zn_2Cys_6 транскрипционным фактором биосинтеза ловастатина. Оверэкспрессия *lovE* под контролем конститутивного промотора gpdA из *Aspergillus nidulans*, приводящая к 10–30 кратному увеличению продукции ловастатина, сопровождалась снижением экспрессии *laeA* в процессе ферментации. Обнаруженная обратная взаимосвязь между регуляторами LovE и LaeA выражалась в даунрегуляции *lov*-генов устойчивости и транспорта у *A. terreus* с дополнительной копией *lovE* и проявлялась фенотипически в токсичности полиаминов для продукции ловастатина. Внесение в среду полиаминов в процессе ферментации *A. terreus OE::lovE* приводило к снижению продукции ловастатина.

Ключевые слова: Aspergillus terreus, ловастатин, вторичный метаболизм грибов, полиамины, спермидин, LovE, LaeA

DOI: 10.1134/S0555109919060175

Продукция ловастатина (LOV) широко распространена у грибов, она может происходить как у одноклеточных дрожжей, так и в клетках различных мицелиальных грибов или в плодовых телах базидиомицетов [1, 2]. Одна из причин подобной распространенности связана с антимикозной функцией этого вторичного метаболита (ВМ). от которого самому грибному продуценту требуется защита [3]. LOV ингибирует 3-гидрокси-3-метилглютарил-кофермент A редуктазу (HMG-KoA), ключевой фермент биосинтеза эргостерина, необходимого для построения цитоплазматических мембран грибов [4, 5]. В кластере генов ловастатина (lov-гены), помимо генов биосинтеза и регуляции, имеются гены устойчивости продуцента к самому метаболиту [6]. Таким образом, приобретение lov-кластера в результате горизонтального переноса дает грибу возможность не только подавлять грибы-конкуренты, но и защищаться от других продуцентов LOV [3]. Механизм резистентности реализуется за счет функционирования двух стратегий: активного транспорта LOV из клетки в результате работы MFS-транспортера и повышения устойчивости белка-мишени

в результате присутствия дополнительной копии гена HMG-KoA в кластере *lov*-генов [3]. Устойчивость к LOV используют также в качестве одного из селективных факторов после проведения случайного мутагенеза для получения высокоактивных продуцентов [7]. Так после 4 раундов УФ-мутагенеза штамма *A. terreus* дикого типа в результате селекции на чашках с экзогенным LOV удалось поднять уровень продукции этого BM в 3 раза [7].

Известно, что контроль биосинтеза LOV у *А. terreus* реализуется за счет работы двух основных положительных регуляторов, путь-специфического регулятора LovE [8] и глобального регулятора вторичного метаболизма грибов LaeA [9]. Ранее влияние LovE [10–12] и LaeA [9, 13] исследовали по отдельности, в независимых экспериментах. В предыдущих работах была изучена роль LovE в контроле *lov*-генов у созданных рекомбинантных штаммов [14] и LaeA как медиатора воздействия полиаминов (ПА) на продукцию LOV [15]. Однако, в настоящее время нет работ, в которых изучалась взаимосвязь в работе этих регуляторов. В недавней работе по получению монокалина J у *А. terreus* были созданы продуценты, конститутивно-экспрессирующие либо *lovE*, либо *laeA*, при этом не было изучено, что происходило с генной экспрессией второго регулятора [16]. Возможно, это связано с тем, что пока нет четкой модели, описывающей согласованную работу двух уровней регуляции LOV, в которых участвуют LovE и LaeA.

Ранее было показано, что введенные экзогенно ПА способны повышать продукцию LOV у высокоактивного продуцента, и это воздействие опосредовано регуляцией LaeA [15]. Поскольку сверхэкспрессия lovE также может значительно увеличивать выход LOV [10, 17], для A. terreus WT был получен набор рекомбинантных штаммов, конститутивно-экспрессирующих дополнительную копию lovE под контролем промотора gpdA из A. nidulans [14]. Лучшие показатели в процессе ферментации были достигнуты для A. terreus E6, у которого выход LOV увеличивался более чем в 10 раз и достигал 1 г/л. В тех же условиях штамм *А. terreus* HY продуцировал до 10–12 г/л LOV [14]. Было установлено, что у НУ-штамма нет дупликаций кластера lov-генов, но при этом происходит апрегуляция в 5-50 раз биосинтетических lovгенов и регулятора lovE, а экзогенное введение ПА дополнительно повышает экспрессию lov-генов, laeA и выход LOV [15].

Расшифровка механизмов регуляции биосинтеза ВМ у биотехнологически значимых организмов, к которым относится *A. terreus* — важнейший этап на пути повышения их целевой продукции. Поскольку штамм НҮ был получен в результате многораундового случайного мутагенеза на основе WT [18], трудно при их сравнении охарактеризовать все важнейшие механизмы повышения продукции LOV, в том числе, возникающие при добавлении ПА. В генно-инженерном штамме Еб введено всего одно направленное изменение [14].

Цель работы — изучить взаимосвязь между специфичной и глобальной регуляцией биосинтеза LOV у *A. terreus*, в том числе, через воздействие на штамм *A. terreus OE::lovE* полиаминов, способных влиять на экспрессию *laeA* [15].

МЕТОДИКА

Штаммы, использованные в работе. Использовали штаммы *А. terreus*: WT (ATCC 20542) — дикий тип, HY (\mathbb{N} 43–16) — высокоактивный продуцент LOV, полученный на основе штамма ATCC 20542 методам УФ-мутагенеза [18] и E6 (ATCC 20542/LovE₆) — экспрессирует *lovE* из *A. terreus* под контролем промотора gpdA из *A. nidulans* [14].

Анализ последовательностей генов кластера биосинтеза LOV. Анализ *lov*-генов на присутствие сайтов связывания для GAL4-подобного Zn₂Cys₆ транскрипционного фактора [19] проводили в среде Vector NTI v.8.0 software ("Thermo Fisher Scientific", США) [20]. Для анализа *lovA*, *lovC*, *lovD*, *lovE*, *lovF*, *lovG*, *lovT* и *lovR* использовали последовательность GenBank: CH476600.1; для анализа *lovB* использовали последовательность GenBank: AF151722.

Культивирование штаммов *А. terreus* с ПА на твердых питательных средах. Для выращивания гриба использовали агаризованную среду для *А. terreus* (AT) (г/л): глюкоза – 100, соевая мука – 20, мальт-экстракт – 5, мясной пептон – 5, NaCl – 2, KH₂PO₄ – 0.5, MgSO₄ · 7H2O – 0.5, aгар – 20, pH 6.1, и среду Чапека–Докса (ЧД) (г/л): сахароза – 30, NaNO₃ – 2, K₂HPO₄ – 1, MgSO₄ · 7H ₂O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄ · 7H₂O – 0,01, агар – 20, pH 7.1, без добавок или с добавлением 1,3-диаминопропана (ДАП), или 5 мМ спермидина (СП) ("MP Biomedicals", США).

Для определения влияния ПА на рост и морфологию колоний A. terreus использовали метод, описанный ранее, с некоторыми изменениями [21]. Клетки А. terreus собирали микробиологической петлей со скошенного АТ-агара, разводили в 0.9%-ном растворе NaCl до оптической плотности $O\Pi_{600} = 0.5$ и готовили последовательные 10-кратные разведения в 0.9%-ном NaCl. По 2 мкл полученных суспензий использовали для инокуляции агаризованной среды ЧД в чашках Петри, содержащей 5.0 мМ ДАП или 5 мМ СП и без добавления ПА (контрольные образцы). Инкубацию проводили при 26°С в течение 3–5 сут (штаммы WT, E6) или 6-8 сут (штамм НУ). Влияние ПА оценивали по характеру роста инокулятов в серии последовательных разведений на агаризованных средах с 5 мМ ДАП или СП по сравнению с контролем без добавок.

Ферментация штаммов A. terreus с ПА. Штаммы предварительно выращивали в пробирках на скошенной среде АТ в течение 7 сут при 25°С, переносили микробиологической петлей для инокуляции 30 мл жидкой среды АТ (ПАТ, посевная среда). Штаммы на среде ПАТ культивировали 48 ч при 26°С. Одной десятой объема инокулировали ферментационную среду АТ (ФАТ, г/л): глюкоза – 200, соевая мука – 40, мальт-экстракт – 5, мясной пептон – 10, NaCl – 2, KH₂PO₄ – 0.5, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, рН 6.1. В среду добавляли СП или ДАП, до конечной концентрации 5мМ, или культивировали без добавления ПА (контроль). Ферментацию проводили в течение 8 – 11 сут при 26°С. Все этапы глубинного культивирования (на средах ПАТ и ФАТ) проводили в 250 мл колбах Эрленмейера, на качалке CERTOMAT[®]BS-1 ("Sartorius", Германия) при 230 об./мин, как описано ранее [18].

Биомассу отобранных из растущей культуры образцов отделяли центрифугированием, промы-

Олигонуклеотид	Последовательность (5' \rightarrow 3')	Источник
Act_RT_F	CCACGTTACCACTTTCAACTCC	Genbank: XM_001209659.1, [14]
Act_RT_R	GAGGAGCGATGATCTTGACCT	
E2_6_RT_F	TGACCAGCGAAGAAATGACA	Genbank: XM_001211932.1, [14]
E2_6_RT_R	TTATCTTTCATCCATTTCCA	
LovA_RT_F1	GCGATGTCAAGCCACTCCTCATTATG	Genbank: AH007774.2, [15]
LovA_RT_R1	AGACCCAAGCTCCCAAGTACGTCAAG	
LovB_F1	GCCCCATTCTATAAAAACCTGAGGATTC	GenBank: AF151722, [15]
LovB_R1	AGTCCTCATTATTCGAGACTCGCAGC	
LovC_RT_F	GCAGAGGAGGTCTTTGACTATCG	Genbank: AH007774.2, [14]
LovC_RT_R	GACTCGACGTTGGTGATACAGTCG	
LovD_RT_F	GGATCTGGACGGAGAGAACTG	
LovD_RT_R	CAGGGTTCCAGTTGGAAGAAC	
LovE_RT_F	TCGATGCGTCTACAGTGAGC	
LovE_RT_R	TAGCTGTCCGGTGGATCAAG	
LovF_RT_F	TTGCATCTTGCCATTCAGAG	
LovF_RT_R	TCGAGTCAAATGAGTAGGA	
LovG_RT_F	GCTCCGTTCCCTTCCTCTGCA	Genbank: AH007774.2, [15]
LovG_RT_R	GGGGTGTTGAGTCTGCCAGTCG	
LovT_RT_F	GATCCTTGTGTCCATATCCGCCG	Genbank: AH007774.2
LovT_RT_R	GCTAGCGAAATGCCGATGGG	
LovR_RT_F	GCCTCAAGAATGGTGCCTCCG	
LovR_RT_R	TTCAACGCCCATGCCTCCAAC	
LaeA_RT_F	GGATGCACGAGAACATAATCCTGGC	GenBank: NT_165972, [15]
LaeA_RT_R	AACTTGTGGAAAAGATCGAGGCGATC	

Таблица 1. Структура синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе

вали 10 об. H_2O 2 раза, высушивали при 80°C, 96 ч до постоянного веса и взвешивали.

ВЭЖХ-анализ. Содержание LOV после экстракции этилацетатом из культуральной жидкости, полученной в процессе ферментации *A. terreus*, определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 ("Agilent Technologies", США), используя хроматографическую колонку Agilent-C18 (4.6 × 250 мм), с диаметром частиц 5 мкм, В подвижной фазе — метанол/0.1 М уксусная кислота (в % соотношении — 85/15) при расходе 1.0 мл/мин. Детекцию проводили при 238 нм.

Получение препаратов тРНК, кДНК, ПЦР-анализ в реальном времени (ПЦР–РВ). Получение суммарной РНК и синтез кДНК проводили в соответствии с протоколами, описанными ранее [15, 22]. На основании последовательностей *lovT* и *lovR* в среде Vector NTI v.8 software [20] сконструировали праймеры для оценки уровней экспрессии этих генов (табл. 1). Также использовали ранее подобранные пары праймеров для оценки уровней экспрессии других изучаемых *lov*-генов (*lovA*, *lovB*, *lovC*, *lovD*, *lovE*, *lovF*, *lovG*) и *laeA*, табл. 1 [14, 15]. Реакции и обработку полученных результатов проводили в соответствии с протоколом [22], при этом для нормализации данных об уровнях экспрессии использовали праймеры к ранее подобранным генам "домашнего хозяйства", актина и убиквитин-конъюгирующего фермента E2_6 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни экспрессии генов устойчивости и транспорта, входящих в кластер генов биосинтеза LOV у *A. terreus* WT, HY и E6. В составе кластера биосинтеза LOV у *A. terreus* находятся гены, выполняющие различные задачи, связанные с функционированием этого BM [6]. Ранее был охарактеризован уровень экспрессии биосинтетических генов (*lovC*, *lovD*, *lovF*) и гена регулятора *lovE* в штаммах *A. terreus* WT, HY и E6 [14]. Для штаммов WT, HY также был определен уровень экспрессии еще трех биосинтетических генов *lovA*, *lovB* и *lovG* [15]. В настоящей работе на первом этапе изучили уровни экспрессии *lov*-генов других типов, связанных с активным транспортом LOV из клетки (*lovT*) и устойчивостью самого продуцента *A. ter*-

544





ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ том 55 № 6 2019

reus к LOV (lovR) (рис. 1а, 1б). При ферментации штамма A. terreus НҮ наблюдали рост уровня экспрессии обоих этих генов по сравнению со штаммом WT. Для lovR это увеличение составляло 5–7 раз, для *lovT* – 10–15 раз, что отражало общую тенденцию, связанную с индукцией экспрессии lov-генов у НУ штамма, которую ранее прослеживали для биосинтетических генов lovA, lovB, lovC, lovD, lovF и lovG [14, 15]. С физиологической точки зрения индукция экспрессии генов резистентности может быть важна как фактор устойчивости к повышенной продукции LOV у штамма НҮ. Наряду с этим, для штамма Еб обнаружили снижение уровня экспрессии lovR в 4–5 раз и lovT в 2-3 раза (рис. 1а, 1б), что противоречило ранее отмеченной тенленции повышения экспрессии биосинтетических генов (lovC, lovD, lovF) в штамме Е6 по сравнению с WT-штаммом [14].

Для получения полного профиля экспрессии lov-генов у A. terreus E6 изучили также биосинтетические гены lovA, lovB и lovG (рис. 1в, 1г, 1з). Наибольшее увеличение генной экспрессии наблюдали для lovA, кодирующего цитохром P450, ключевой фермент модификаций построенного нонакетидного звена, осуществляющий две последовательные реакции окислительного гидроксилорования [23]. Уровень экспрессии этого гена в штамме Е6 по сравнению с WT-штаммом был повышен в 50-80 раз, что даже превышало экспрессию у штамма НУ по сравнению с WT (рис. 1в). Для гена lov B, кодирующего нонакетидсинтазу (NKS), центральный фермент для биосинтеза LOV, наблюдаемая в штамме Е6 "апрегуляция" по сравнению с WT-штаммом составляла 10-12 раз, а у НУштамма по сравнению с WT штаммом - 25-30 раз (рис. 1г). Уровень экспрессии lovB в штамме Еб занимал промежуточное значение между WT и НУ штаммами; подобное соотношение ранее наблюдали для биосинтетических генов lovC, lovD, lovF (рис. 1д, 1е, 1ж) и гена регулятора lovE при сравнении их экспрессии в штаммах A. terreus WT, НР и Еб [14].

Уровень экспрессии гена *lovG*, кодирующего тиоэстеразу, необходимую для высвобождения дигидромонаколина L из комплекса с LovB [24], в штамме E6 оказался ниже на 15-20%, чем в исходном штамме WT. Отметим, что при этом уровни мPHK других биосинтетических генов (*lovA*, *lovB*, *lovC*, *lovD*, *lovF*), в штамме E6 занимают промежуточное положение между WT штаммом и HY штаммом. Однако наблюдаемое падение *lovG* в штамме E6 было незначительным, существенно отличалось от поведения генов *lovR* и *lovT*, уровень экспрессии которых падал в несколько раз по сравнению с WT (рис. 1а, 16, 1з).

Уровни экспрессии регуляторных генов биосинтеза LOV у *A. terreus* WT, НУ и Еб. Для объяснения феномена угнетающей регуляции генов lovR и lovT v A. terreus E6 был проведен сравнительный анализ уровней экспрессии генов-регуляторов среди изучаемых штаммов. На первом этапе провели поиск потенциальных сайтов связывания фактора LovE в промоторах lov-генов. LovE – это GAL4-подобный транскрипционный фактор, способный распознавать участки сайт-специфического связывания с консенсусной последовательностью CGGN₍₁₀₋₁₂₎ССС [10, 19]. В результате проведенного компьютерного анализа обнаружены гипотетические сайты связывания для LovE в промоторных областях ряда lov-генов (рис. 2a). Такие сайты были обнаружены в областях двунаправленных промоторов генов lovA/lovB и lovG/lovC, а также, в промоторных зонах генов lovD и lovF. Для генов транспорта lovT, устойчивости lovR и самого регулятора lovE потенциальных сайтов связывания обнаружено не было.

Уровень экспрессии *lovE* последовательно возрастал в ряду штаммов A. terreus WT, Еб и НУ (рис. 26), что соответствовало тенденции для биосинтетических lov-генов (их уровень экспрессии возрастал при повышении в штамме продукции LOV) и полностью согласовывалось с данными предыдущих экспериментов [14]. Уровень экспрессии laeA, глобального регулятора BM грибов, у НУ-штамма был выше в 5-10 раз по сравнению со штаммом WT, однако у штамма Е6 он падал в 3-5 раз по сравнению с WT штаммом (рис. 2в). Подобное снижение уровня экспрессии гена положительного регулятора биосинтеза LOV на фоне значительного роста продукции этого ВМ у штамма Еб оказалось неожиданным. Для объяснения этих результатов вместе с данными о дифференциальной экспрессии lov-генов у A. terreus Еб была предложена модель регуляции биосинтеза LOV у штаммов A. terreus (рис. 3), основанная на взаимодействии двух основных регуляторов -LovE и LaeA. Согласно этой модели, LaeA апрегулирует все гены кластера, тогда как LovE апрегулирует большинство биосинтетических генов, но не гены, связанные с транспортом и устойчивостью (рис. 3a). Наряду с прочими lov-генами, LaeA также апрегулирует ген lovE, тогда как LovE является негативным регулятором для экспрессии laeA (рис. 3б-3г). Подобная отрицательная обратная связь между транскрипционным фактором AflR, регулирующим экспрессию генов биосинтеза стеригмацистина и laeA была выявлена ранее [13]. Из экспериментов следует, что баланс между LaeA и LovE у штамма WT может поддерживаться за счет их перекрестного регулирования (рис. 3б), что, в свою очередь, контролирует продукцию LOV, не позволяя апрегулировать lov-гены и значительно увеличивать выход этого ВМ у природного штамма.



Рис. 2. Контроль экспрессии *lov*-генов у *A. terreus*. а – кластер *lov*-генов; стрелками показаны предполагаемые сайты связывания для LovE. Экспрессия генов регуляторов биосинтеза LOV: *lovE* (б) и *laeA* (в) после культивирования в течение 8 сут на среде ФАТ штаммов *A. terreus* WT (*1*), E6 (*2*) и HY (*3*).



Рис. 3. Регуляция *lov*-генов у *A. terreus*. а – положительная регуляция кластера *lov*-генов LovE и LaeA. Стрелками отмечены гены-мишени апрегуляции, пунктирными стрелками показаны возможные гены-мишени для регуляции LovE. Маленькие стрелки – предполагаемые сайты связывания для LovE в локусе *lov*-генов. б – г – регуляция биосинтеза LOV белками LaeA, LovE и LovE^{cn} (полученный в результате конститутивной экспрессии *lovE*) у штаммов *A. terreus* WT (б), HY (в) и E6 (г).

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ том 55 № 6 2019



Рис. 4. Продукция LOV (мкг/мл, а), накопление биомассы (мг/мл, б) и удельная продукция LOV (мкг/мг биомассы, в) при ферментации штаммов *A. terreus* WT (1, контроль), E6 (2) и HY (3) с ДАП (5.0 мМ, II) и СП (5.0 мМ, III) 8 сут на среде ФАТ. На врезках – продукция и удельная продукция LOV для *A. terreus* WT (а, в, 1) (цена деления оси ординат увеличена в 400 раз и в 500 раз соответственно).

Селекция НУ штамма, по-видимому, сопровождалась выходом *laeA* из-под регуляции LovE, в результате значительно повысился уровень экспрессии обоих положительных регуляторов, что, в свою очередь, привело к апрегуляции всех *lov*-генов и увеличению биосинтеза LOV более, чем в 100 раз (рис. 3в).

Экспрессия дополнительной копии lovE v штамма Еб, по всей видимости, оказалась laeAнезависимой и происходила за пределами lovкластера. В результате между уровнями экспрессии *laeA* и *lovE* нарушился баланс, возникающий при их взаимной регуляции (рис. 3г). Уровень lovE вырос, a laeA снизился по сравнению с исходным штаммом (рис. 2). В результате экспрессия lov-генов, положительно регулируемых белками LovE и LaeA, увеличилась, а lov-генов, контролируемых только LaeA – снизилась (рис. 2). Поскольку LovE контролирует биосинтетические lov-гены, уровень продукции LOV значительно повысился. Наряду с этим резкое снижение экспрессии гена lovR могло привести к потенциальной токсичности продукции LOV для данного штамма. В общем ряду увеличения экспрессии биосинтетических генов у штамма Еб (по сравнению с WT) несколько выпадает поведение гена lovG, уровень экспрессии которого оказался несколько снижен (рис. 1е). Возможно, это связано, с менее эффективной активацией lovG путь-специфическим регулятором LovE. Поскольку для штамма Еб наблюдалось значительное увеличение продукции LOV, тиоэстераза LovG, по-видимому, не являлась лимитирующим ферментом в пути биосинтеза этого поликетида.

Влияние ПА на продукцию LOV и уровень биомассы при ферментации A. terreus E6. У A. terreus E6 наряду с 10-кратным увеличением продукции LOV была снижена экспрессия гена положительного регулятора laeA. Экзогенные ПА способны повышать экспрессию laeA у высокоактивных грибных продуцентов [25, 26], в том числе, у A. terreus [15]. Повышенная экспрессия laeA у A. terreus коррелировала с увеличением выхода LOV (8 сут, 26°С), поэтому в дальнейшем проводили ферментацию трех исследуемых штаммов с добавлением ПА.

Предполагали, что такой прием увеличит продукцию LOV, однако добавление 5 мМ ДАП или 5 мМ СП при ферментации *A. terreus* Е6 приводило к значительному снижению выхода LOV на протяжении всего периода культивирования. Наиболее значительные отличия для штаммов WT, HY Е6 наблюдали после 8 сут ферментации на среде ФАТ с добавлением ПА (рис. 4). Добавление ДАП увеличивало выход LOV у штамма WT на 15%, у штамма HY – на 30% и снижало выход LOV у штамма E6 на 50%. Добавление СП сопровождалось еще большими различиями: выход LOV увеличивался у штамма WT на 20%, у штамма HY – на 45% и снижался у штамма E6 более, чем в 2 раза (рис. 4а).

Уровень сухой биомассы при культивировании на среде ФАТ без добавок практически не отличался у штаммов WT и E6 (рис. 4б). Это может свидетельствовать о том, что как апрегуляция lovE, так и даунрегуляция *laeA*, lovR и *lovT* не ингибируют рост для клеток штамма Еб. Более низкий уровень биомассы у штамма НҮ типичен для высокоактивных грибных продуцентов, полученных в результате многораундового мутагенеза и селекции, что наблюдали и ранее на примере высокоактивного продуцента цефалоспорина С Acremonium chrysogenum RNCM F-4081D [22, 27, 28]. При добавлении ПА выявили разностные воздействия этих соединений на рост или биомассу штаммов (рис. 4б). Биомасса WT-штамма несколько возрастала (на 3-5%) при добавлении как ДАП, так и СП (рис. 4б, 2), что может отражать описанный ранее стимулируюший эффект ПА [29]. Для штаммов с повышенной продукцией LOV наблюдали снижение биомассы при добавлении ПА в ходе ферментации, как 5.0 мМ ДАП, так и 5.0 мМ СП. Для штамма НУ это снижение составляло 10-12% при добавлении ДАП или 15-7% при добавлении СП. Для штамма Еб токсическое воздействие было выражено сильнее, уровень биомассы падал на 18-20% при добавлении ДАП и 20-25% при добавлении СП. Такое снижение биомассы было описано ранее для высокоактивного продуцента пенициллина G Penicillium chrvsogenum; внесение в среду при выращивании 5.0 мМ ДАП приводило к 20-25%-ному падению биомассы [25].

Условия эксперимента были подобраны ранее для штамма НҮ [15], при этом стимулирующие действие ПА на продукцию LOV у этого штамма значительно превышало побочное токсичное воздействие. Удельный выход LOV после 8 сут ферментации с ПА увеличивался на 40-50% при добавлении ДАП и на 60-70% при добавлении СП (рис. 4в, 3). В этих же условиях у штамма Е6 уменьшение биомассы, сопровождалось резким падением LOV, в результате удельный выход LOV уменьшался на 20-30% при добавлении ДАП и на 75-85% при добавлении СП (рис. 4в, 2).

Воздействие экзогенных ПА при культивировании штамма Еб в жидкой среде ФАТ также отличалось от ранее полученных данных при его культивировании на агаризованной среде ЧД. При добавлении ПА наибольшую стимуляцию роста для всех изучаемых штаммов (WT, HY и Еб) наблюдали при концентрации 5 мМ (как ДАП, так и СП) [15]. Этот эффект коррелировал с повышением продукции LOV в процессе ферментации в глубинных условиях с 5 мМ ПА как для штамма WT, так и для HY. В данной работе показали, что для E6 штамма добавление ПА, стимулирующих рост на агаризованной среде, снижает уровень биомассы и значительно уменьшает продукцию LOV при ферментации в глубинных условиях.

Анализ уровней экспрессии генов кластера биосинтеза LOV и регулятора laeA у A. terreus E6 при внесении ПА в процессе ферментации. Сравнительный анализ уровней экспрессии lov-генов и laeA после ферментации штамма Е6 с 5.0 мМ СП (рис. 5) выявили угнетение регуляции многих генов биосинтеза, уровень экспрессии lovA, lovB, lovDи lovG падал 2–5 раз (рис. 5 II). С другой стороны, для экспрессии генов lovC и lovF наблюдали рост. не превышающий 20-30%. Уровень экспрессии генов устойчивости и транспорта падал в 2-3 раза. При этом практически не менялась экспрессия генов регуляторов lovE и laeA. Одно из объяснений полученных данных может быть связано с конститутивной, laeA-независимой экспрессией дополнительной копии lovE у штамма Еб. Основной вклад в уровень экспрессии lovE у данного штамма вносит дополнительная копия, находящая под контролем gpdA-промотора, уровень экспрессии lovE у штамма E6 повышен более чем в 3 раза (рис. 2б) и не зависит от эффектов экзогенных ПА. С другой стороны, добавление ПА стимулирует экспрессию laeA у WT и HY штаммов, но не у Еб (рис. 5, 10). По-видимому, в штамме Еб на экспрессию *laeA* оказывают влияние два противоположных фактора: положительная регуляция со стороны ПА и негативная регуляция со стороны конститутивно-экспрессируемого Zn₂Cys₆ – фактора транскрипции LovE (рис. 3г). При этом уровень *laeA* не увеличивался, как и *lovE*. Отсутствие апрегуляции обоих положительных регуляторов на фоне токсичной для клетки концентрации ПА приводит к снижению продукции LOV, что может быть опосредовано и другими механизмами контроля биосинтеза ВМ грибов [30].

Токсичность ПА для штамма Е6, внутриклеточные уровни ацетил-КоА и экспрессия *lov*-генов. ПА – жизненно-важные соединения для всех клеток, необходимые для нормального функционирования множества клеточных процессов [31]. Внутриклеточное содержание ПА строго регулируется на уровнях биосинтеза и катаболизма этих соединений [32]. При избытке ПА их баланс восстанавливается за счет активации путей катаболизма и экспорта, с участием, в частности, таких ферментов как спермидин N-ацетил трансфераза (SSAT), различных полиаминоксидаз (РАО) и специфических мембранных транспортеров [33]. Реакционноспособные соединения, такие как акролеин и перекись водорода, образуемые в процессе катаболизма ПА, могут оказывать существенное токсическое воздействие на клетки, повреждая



Рис. 5. Относительная экспрессия [(*A. terreus* + СП)/*A. terreus*] генов кластера биосинтеза LOV *lovA* (1), *lovB* (2), *lovC* (3), *lovD* (4), *lovF* (5), *lovG* (6), lovR (7), lovT (8), *lovE* (9) и регулятора *laeA* (10) в штаммах *A. terreus* (I – WT, II – E6, III – HY) после 8 сут ферментации с 5.0 мМ СП. Пунктирная линия – уровень экспрессии генов при ферментации штаммов без добавления СП.

белки, ДНК, другие клеточные компоненты [34]. ПА в используемых концентрациях (5.0 мМ) не токсичны для штамма WT, однако их эффект становится значимым на фоне резко увеличенного биосинтеза LOV у штамма A. terreus E6. При этом также заметно падает уровень экспрессии lov-генов и продукция LOV. Повышенная чувствительность штамма A. terreus E6 к экзогенным ПА может возникать вследствие истощения внутриклеточного содержания ацетил-КоА, который расходуется на биосинтез LOV. Эти эффекты могут проявляться на поздних стадиях ферментации, когда резко возрастает продукция LOV и, напротив, не проявляться в условиях роста на твердой среде. Истощение пула ацетил-КоА снижает эффективность катаболизма ПА [35] и может проводить к его избыточному внутриклеточному накоплению, токсичному для клетки [34]. Истощение пула ацетил-КоА под воздействием экзогенных ПА также может негативно отражаться на транскрипции lov-генов вследствие снижения уровня ацетилирования гистонов и повышения степени компактизации хроматина [36]. У А. terreus НУ внутриклеточное содержание ацетил-КоА должно быть достаточно высоким для обеспечения концентрации субстратов (ацетил-КоА, малонил-КоА), необходимой для повышенной продукции LOV. В связи с этим, токсические эффекты ПА для штамма менее значимы и не приводят к снижению экспрессии *lov*-генов. Для проверки этих предположений требуются дополнительные эксперименты, в том числе, по определению внутриклеточных уровней ПА, ацетил-КоА, а также, уровней экспрессии генов метаболизма ПА у изучаемых штаммов *A. terreus*.

В работе на подобранной системе было продемонстрировано, что LovE, всесторонне-изученный Zn_2Cys_6 фактор транскрипции, являющийся путь-специфическим регулятором биосинтеза LOV у *A. terreus*, способен в определенных условиях



Рис. 6. Влияние экзогенного СП на продукцию LOV в штаммах *А. terreus* Е6 и НУ после 8 сут ферментации.

негативно регулировать LaeA. Эти данные важны для понимания молекулярных основ регуляции ВМ у грибных продуцентов, что является необходимой базой для конструирования штаммов-суперпродуцентов биотехнологически-значимых соединений.

Авторы выражают благодарность В.Г. Джавахия, Т.М. Войновой (Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии), В.В. Джавахия (ФИЦ Биотехнологии РАН) за предоставленный для изучения молекулярно-биологических свойств штамм *А. terreus* НҮ, М.А. Думиной (ФИЦ Биотехнологии РАН) и Н.А. Вытновой (кафедра биотехнологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за получение штамма Е6.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19-04-01173.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Manzoni M., Rollini M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 5. P. 555–564.
- Atli B., Yamac M. // Int. J. Med. Mushrooms. 2012.
 V. 14. № 2. P. 149–159.
- 3. *Keller N.P.* // Nat. Chem. Biol. 2015. V. 11. № 9. P. 671–677.
- 4. Chamilos G., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. V. 50. № 1. P. 96–103.
- 5. Rodrigues M.L. // MBio. 2018. V. 9. № 5. P. e01755–18.
- 6. Subazini T.K., Kumar G.R. // Bioinformation. 2011. V. 6. № 7. P. 250–254.
- 7. *Jia Z., Zhang X., Cao X., Liu J., Qin B.* // Ann. Microbiol. 2011. V. 61. № 3. P. 615–621.
- Kennedy J., Auclair K., Kendrew S.G., Park C., Vederas J.C., Hutchinson C., Auclais K., Kendrew S.G., Park C., Vederas J.C., Hutchinson C.R. // Science. 1999. V. 284. № 5418. P. 1368–1372.
- 9. *Bok J.W., Keller N.P.* // Eukaryot. Cell. 2004. V. 3. № 2. P. 527–535.
- Huang X., Li H. // Chin. Med. J. (Engl). 2009. V. 122. № 15. P. 1800–1805.
- 11. *Barrios-González J., Miranda R.U.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 4. P. 869–883.
- Barrios-González J., Baños J. G, Covarrubias A. A., Garay-Arroyo A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. № 2. P. 179–186.
- Palonen E.K., Raina S., Brandt A., Meriluoto J., Keshavarz T., Soini J. // Microorganisms. 2017. V. 5, № 1. P. E12
- Zhgun A.A., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.V., Eldarov, M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 2. P. 188–197.
- 15. Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 3. P. 244–255.
- 16. *Huang X., Tang S., Zheng L., Teng Y., Yang Y., Zhu J., Lu X.* // ACS Synth. Biol. 2019. V. 8. № 4. P. 818–825.

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Mulder K., Mulinari F., Franco O., Soares M., Magalhes B., Parachin N. // Biotechnology Advances. 2015. V. 33. № 6. P. 648–665.
- 18. Патент РФ. 2005. № 2261901.
- 19. *Kodadek T.* // Cell. Mol. Biol. Res. 1993. V. 39. № 4. P. 355–360.
- Lu G., Moriyama E.N. // Brief. Bioinform. 2004. V. 5. № 4. P. 378–388.
- 21. Dumina M.V., Zhgun A.A., Kerpichnikov I.V., Domracheva A.G., Novak M.I., Valiachmetov A.Ya., Knorre D.A., Severin F.F., Eldarov M.A., Bartoshevich Yu.E. // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. № 4. P. 368–377.
- Dumina M.V., Zhgun A.A., Novak M.I., Domratcheva A.G., Petukhov D.V., Dzhavakhiya V.V., Eldarov M.A., Bartoshevitch Iu.E. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. № 11. P. 2933–2941.
- 23. Barriuso J., Nguyen D., Li J., Roberts J., MacNevin G., Chaytor J., Marcus S., Vederas J., Ro D-K. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. № 21. P. 8078–8081.
- Xu W., Chooi Y.-H., Choi J., Li S., Vederas J., Da Silva N., Tang Y. // Angew. Chemie Int. Ed. 2013. V. 52. № 25. P. 6472–6475.
- Martín J., García-Estrada C., Kosalková K., Ullán R., Albillos S., Martín J.-F. // Fungal Genet. Biol. 2012. V. 49. № 12. P. 1004–1013.
- Жгун А.А., Калинин С.Г., Новак М.И., Домрачева А.Г., Петухов Д.В., Джавахия В.В., Эльдаров М.А., Бартошевич. Ю.Э. // Известия вузов. Прикл. химия и биотехнол. 2015. V. 14. № 3. Р. 47–54.
- Dumina M.V., Zhgun A.A., Domracheva A.G., Novak M.I., El'darov M.A. // Russ. J. Genet. 2012. V. 48. № 8. P. 778–784.
- Zhgun A.A., Ivanova M.A., Domracheva A.G., Novak M.I., Elidarov M.A., Skryabin K.G., Bartoshevich Yu.E. // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. № 6. P. 600–607.
- 29. *Tabor C.W., Tabor H. //* Microbiol. Rev. 1985. V. 49. P. 81–99.
- 30. *Brakhage A.A.* // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. № 1. P. 21–32.
- Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. № 21. P. 3389–3406.
- Casero R.A., Pegg A.E. // Biochem. J. 2009. V. 421. № 3. P. 323–338.
- 33. Persson L. // Essays Biochem. 2009. V. 46. P. 11-24.
- 34. *Pegg A.E.* // Chem. Res. Toxicol. 2013. V. 26. № 12. P. 1782–1800.
- Kramer D.L., Diegelman P., Jell J., Vujcic S., Merali S., Porter C.W. // J. Biol. Chem., 2008. V. 283. № 7. P. 4241–4251.
- Shi L., Tu B.P. // Curr. Opin. Cell Biol. 2015. V. 33. P. 125–131.

том 55 № 6 2019

Role of LaeA and LovE Regulators in Lovastatin Biosynthesis with Exogenous Polyamines in *Aspergillus terreus*

A. A. Zhgun^{*a*,*}, G. K. Nuraeva^{*a*}, and M. A. Eldarov^{*a*}

^aResearch Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia *e-mail: Zzhgun@mail.ru Received February 27, 2019; revised May 06, 2019; accepted June 20, 2019

The filamentous fungus *Aspergillus terreus* is the main industrial producer of cholesterol-lowering drug lovastatin, also used as initial substance for simvastatin production. Lovastatin biosynthesis in *A. terreus* is under the control of two major positive regulators, the pathway-specific regulator LovE and the global regulator of fungi secondary metabolism LaeA. We have shown that *laeA* expression can be negatively regulated by LovE, the Zn_2Cys_6 transcription factor of lovastatin biosynthesis. Overexpression of *lovE* under the control of constitutive gpdA promoter from *Aspergillus nidulans*, resulting in a 10–30 fold increase of lovastatin production, is accompanied by a decrease in *laeA* expression. The proposed negative feedback control with LovE and LaeA also involves the downregulation of resistance and transport *lov*-genes and can be characterized phenotypically by the toxicity of polyamines for lovastatin production in *A. terreus OE::lovE*. The exogenous introduction of polyamines during the fermentation of *A. terreus OE::lovE* decreases the lovastatin production (by 30–40%), the expression of *lov*-genes and *laeA*.

Keywords: Aspergillus terreus, lovastatin, fungi secondary metabolism, polyamines, spermidine, LovE, LaeA