

Izvirni znanstveni prispevek  
Original scientific paper

## IZOLACIJA TIOESTERAZNEGA GENA (*btsT*) *Bacillus Licheniformis* IN PRIPRAVA VEKTORJA ZA NJEGOVO INSERCIJSKO MUTAGENEZO \*

Gordan SLADIČ<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> KRKA, tovarna zdravil, d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, SI-8000 Novo mesto, Slovenija,  
e-pošta: [gordan.sladic@krka.si](mailto:gordan.sladic@krka.si).

Delo je prispelo 06. oktobra 2000, sprejeto 16. oktobra 2000.

Received October 6, 2000, accepted October 16, 2000.

### IZVLEČEK

V bližini skoraj vseh prokariotskih operonov, ki kodirajo peptidne sintetaze, so geni, katerih zaporedje je zelo podobno tioesterazam. Mehanizem delovanja in funkcija tioesteraz v sintezi peptidnih antibiotikov še nista znani. Bakterija *Bacillus licheniformis* sintetizira antibiotik bacitracin na multiencimskih kompleksih, ki so sestavljeni iz treh peptidnih sintetaz (BA1, BA2, BA3). Geni, ki kodirajo peptidne sintetaze, so združeni v operonu *bac*, pred katerim je gen *btsT*, ki kodira tioesterazo. Da bi lahko proučevali vpliv tioesteraze na biosintezo bacitracina, smo z verižno reakcijo s polimerazo DNK iz kromosomske DNK *B. licheniformis* izolirali odsek v velikosti 1,2 kb. Ta odsek je vključeval skoraj celoten gen *btsT* in promotorsko regijo operona *bac*. Odsek 1,2 kb smo hibridizirali s kromosomsko DNK bakterije *B. licheniformis* BA1. V gen *btsT* na odseku 1,2 kb smo vstavili tudi gen za odpornost proti tetraciklinu (*tetM*) in tako sestavili vektor za insercijsko mutagenozo gena *btsT*.

Ključne besede: mikrobiologija / bakterije / *Bacillus licheniformis* / peptidni antibiotiki / sinteza / encimi / bacitracinske peptidne sintetaze / tioesteraza / molekularna genetika / vektor za insercijsko mutagenozo

### ISOLATION OF THE *btsT* GENE ENCODING THIOESTERASE AND CONSTRUCTION OF VECTOR FOR ITS INSERTION MUTAGENESIS IN *Bacillus licheniformis* †

#### ABSTRACT

Next to almost all prokaryotic operons encoding peptide synthetases, which are involved in the synthesis of peptide antibiotics, distinct genes have been detected that encode proteins with strong sequence similarity to thioesterases. The mechanism and function of thioesterases in peptide synthesis is not known. Antibiotic bacitracin, produced by *Bacillus licheniformis*, is synthesised by a large multienzyme complex composed of the three bacitracin synthetases BA1, BA2 and BA3. Genes encoding bacitracin synthetases are organised in the *bac* operon. Upstream of the *bac* operon is *btsT* gene encoding thioesterase. In order to investigate the influence of thioesterase on bacitracin biosynthesis 1.2 kb fragment was isolated from chromosomal DNA *B. licheniformis* by using PCR. This fragment consists of almost entire *btsT* gene and complete promoter region of *bac* operon. Fragment has been hybridised with *B. licheniformis* BA1 chromosomal DNA. In addition the Tc resistance gene (*tetM*) was inserted into the fragment to construct vector for insertion mutagenesis of the *btsT* gene.

Key words: microbiology / bacteria / *Bacillus licheniformis* / peptide antibiotics / synthesis / enzymes / bacitracin peptide synthetases / thioesterases / molecular genetics / vector for insertion mutagenesis

---

\* Prispevek je del diplomske naloge (zagovor 02. novembra 1999), mentorica doc.dr. Blagajana Herzog Velikonja.

† The paper is a part of graduation thesis (justification November 2, 1999), supervisor ass.prof. Blagajana Herzog Velikonja, Ph.D.

## UVOD

Peptidi, ki se sintetizirajo na peptidnih sintetazah, predstavljajo strukturno raznoliko skupino kratkih peptidov. Delujejo protibakterijsko, protitumorsko ali protivirusno in so zato zanimivi za industrijo zdravil. Zanimivi so tudi zato, ker je sinteza peptidov na peptidnih sintetazah prisotna tako pri glivah kot pri bakterijah. Način sinteze teh peptidov je pri vseh mikroorganizmih zelo podoben in poteka po tako imenovanem mehanizmu tiomatrice. (Marahiel in sod., 1997, Vater in sod., 1997, Dohren in sod., 1997)

Bakterija *Bacillus licheniformis* sintetizira s pomočjo peptidne sintetaze antibiotik bacitracin, ki se uporablja v humani medicini in v veterini kot rastni promotor. Bacitracinska peptidna sintetaza je multiencimski kompleks modularne zgradbe. Sestavljen je iz treh različnih peptidnih sintetaz (BA1, BA2, BA3). Geni, ki kodirajo te sintetaze, so združeni v operonu *bac*. Pred njim je gen *btsT*, ki kodira tioesterazo. (Konz in sod., 1997, Szabo in sod., 1998).

Pogosto se v bližini operonov za peptidne sintetaze pojavljajo geni za tioesteraze. Te pa se pojavljajo tudi v peptidnih sintetazah kot regije na C-terminalnem delu modulov, ki v nastajajoči peptid dodajajo zadnjo aminokislino (Krätzschar in sod., 1989, De Ferra in sod., 1997). Vloga tioesteraz ali tioesteraznih regij pri sintezi peptidnih antibiotikov ni znana. Pri sintezi peptidnega antibiotika lihenizina inaktivacija ene izmed tioesteraz zmanjša sintezo, v primeru inaktivacije obeh tioesteraz pa sinteze lihenizina ni (Konz in sod., 1999, Schneider in sod., 1998). V virih omenjajo tri možne vloge tioesteraz. Prva je cepitev tioesterske vezi in s tem sprostitve zrelega peptida s peptidne sintetaze. To so sklepali na osnovi primerjav pri sintezi poliketidov in pa sintezi maščobnih kislin. Druga je vloga aciltransferaze. Ta razveja ali pa ciklizira peptide. Katalizni center je namreč podoben aciltransferaznim. Tretja možna vloga je recikliranje 4' fosfopanteinila, če se nanj veže napačna aminokislina. Povečanje koncentracije tioesteraze do določene meje spodbudi *in vitro* sintezo peptida, prevelika koncentracija le-to zmanjša. (Marahiel in sod., 1997).

Pri sintezi antibiotika bacitracina vloga tioesteraze sicer ni znana, menimo pa, da lahko okrepljeno oz. oslABLjeno delovanje tioesteraze vpliva na višjo oz. nižjo raven biosinteze bacitracina. Druga skupina v našem laboratoriju je na sintezo bacitracina vplivala z regulacijskimi geni (Dular, 1999, Gasparič in sod., 1998, Grošel, 1999).

## MATERIAL IN METODE

Kromosomsko DNK iz sevov *B. licheniformis* (ATCC 9945, ATCC 10716, BA1-krkin proizvodni sev) smo izolirali po metodi z gvanidin izotiocianatom (Podlesek, 1991). Za manipulacije z molekulo DNK in elektroforezo smo uporabili klasične metode iz literature (Sambrook in sod., 1989). Gen *btsT* smo izolirali s pomočjo verižne reakcije s polimerazo DNK in oligonukleotidnih začetnikov, katerih zaporedje smo določili s pomočjo znanih zaporedij (preglednica 1).

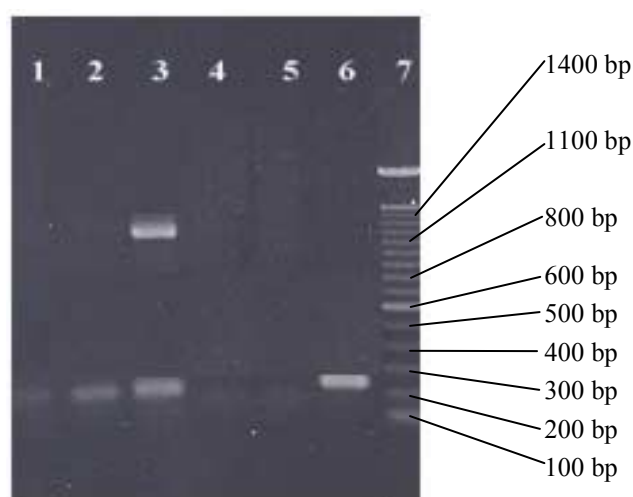
Pomnoženi odsek smo klonirali v plazmid pSPORT1 in njegovo ustreznost preverili z restriksijsko analizo (Horton, 1994). Ta odsek smo hibridizirali z rezano kromosomsko DNK seva *B. licheniformis* BA1. Hibridizacijo smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca (Amersham life science, 1995). Gen za odpornost proti tetraciklinu (*tetM*), v velikosti 3 kb, smo izolirali iz plazmida pCTC 5 in ga vstavili v naš izoliran odsek. Plazmid pCTC 5 nam je priskrbel dr. Hrvoje Petković (University of Wales, Aberystwyth).

Preglednica 1. Zaporedje začetnih oligonukleotidov  
Table 1. Sequence of primer used in PCR

Začetni oligonukleotid / Primer	Zaporedje nukleotidov / Nucleotide sequence
BTST58 <i>Bam</i> HI	5'-ATGGATCCTATGTCCGATTCAGCTGAAG-3'
BTST87 <i>Bam</i> HI	5'-ATGGATCCTAGCGTTTCAACGAGCCTTGTTACGA-3'
BTA1197 <i>Bam</i> HI	5'-ATGGATCCTATCATTGAGCTCTCTGTAGGTCATG-3'
BTA1311 <i>Bam</i> HI	5'-ATGGATCCTATACCGATGATGCCGATGATC-3'
BTA1346 <i>Bam</i> HI	5'-ATGGATCCTATCGATCGGCAGATACGCAC-3'

## REZULTATI IN RAZPRAVA

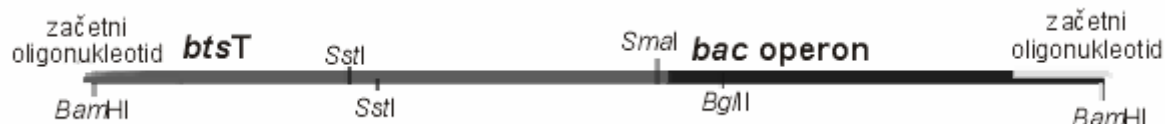
Vektor smo pripravili tako, da smo z verižno reakcijo s polimerazo DNK pomnožili odsek kromosomske DNK vseh treh sevov *B. licheniformis*, ki naj bi vseboval gen *btsT*. Ugotovili smo, da je najboljša kombinacija oligonukleotidnih začetnikov BTST58*Bam*HI in BTA1197*Bam*HI in temperatura prileganja 45° C (slika 1). Prišlo je do pomnoževanja dveh odsekov genoma *B. licheniformis* BA1 (slika 1; stolpec 3). Glede na podatke iz znanih sekvenc je bil za nas zanimiv odsek v dolžini 1,2 kb, zato smo ta odsek tudi izolirali, ga klonirali in tako dobili plazmid pSPORT1+1,2.



Slika 1. Verižna reakcija s polimerazo DNK. (1)-(3) začetna oligonukleotida BTST58*Bam*HI in BTA1197*Bam*HI; (1) matrica je *B. licheniformis* ATCC10716; (2) *B. licheniformis* ATCC9945; (3) *B. licheniformis* BA1; (4)-(6) začetna oligonukleotida BTST58*Bam*HI in BTA1346*Bam*HI; (4) matrica je *B. licheniformis* ATCC10716; (5) *B. licheniformis* ATCC9945; (6) *B. licheniformis* BA1; (7) standard "100 bp DNA ladder"

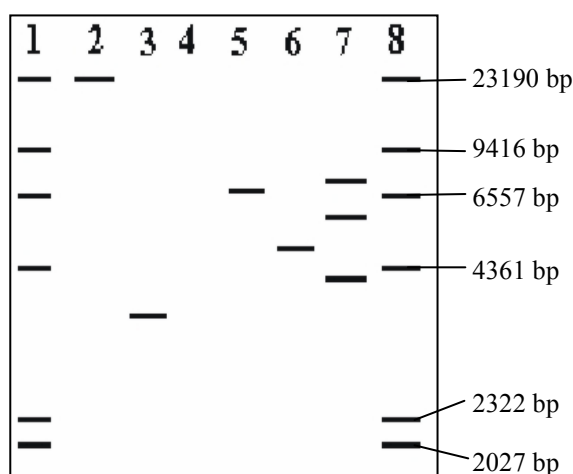
Figure 1. PCR results. (1)-(3) primers BTST58*Bam*HI in BTA1197*Bam*HI; (1) template *B. licheniformis* ATCC10716; (2) *B. licheniformis* ATCC9945; (3) *B. licheniformis* BA1; (4)-(6) primers BTST58*Bam*HI in BTA1346*Bam*HI; (4) template *B. licheniformis* ATCC10716; (5) *B. licheniformis* ATCC9945; (6) *B. licheniformis* BA1; (7) 100 bp DNA ladder

Z restrikcijsko analizo odseka 1,2 kb smo ugotovili, da smo pomnožili skoraj celoten gen *btsT* in pa celotno promotorsko regijo operona *bac* (slika 2). Tako je ta odsek uporaben tako za študijo vpliva gena *btsT* na sintezo bacitracina kot za študijo delovanja promotorja gena *bacA*, ki kodira prvo bacitracinsko sintetazo.



Slika 2. Restriksijska mapa odseka 1,2 kb.  
Figure 2. Restriction map of 1.2 kb fragment.

Odsek 1,2 kb smo hibridizirali z razrezano kromosomsko DNK *B. licheniformis* BA1. Slika 3 podaja rezultat hibridizacije odseka 1,2 kb s kromosomsko DNK *B. licheniformis* BA1. Zaradi slabe kakovosti fotografije smo rezultate hibridizacije prerisali. Tako smo odsek 1,2 kb uporabili kot sondo za gen *btsT*.



Slika 3. Hibridizacija odseka 1,2 kb s kromosomsko DNK *B. licheniformis* BA1. (1) in (8)  $\lambda$ /HindIII; (2) krom. DNK *B. licheniformis* BA1; (3)/ClaI; (4) /HindIII, (5) /EcoRI; (6) /BamHI; (7) pSPORT 1+1,2

Figure 3. Hybridization of 1.2 kb fragment with chromosomal DNA *B. licheniformis* BA1. (1), (8)  $\lambda$ /HindIII; (2) chromosomal DNA *B. licheniformis* BA1; (3) /ClaI; (4) /HindIII, (5) /EcoRI; (6) /BamHI; (7) pSPORT 1+1.2

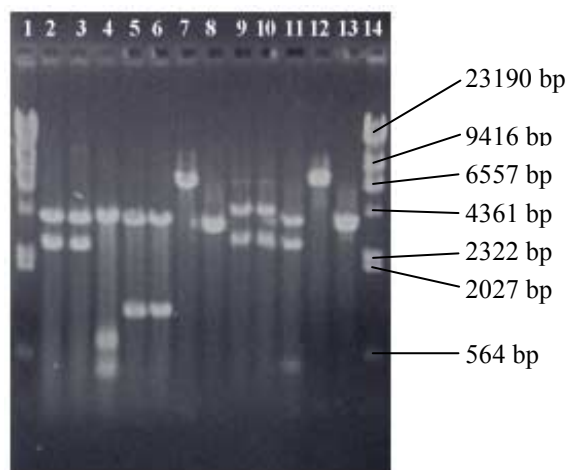
Pri hibridizaciji je bila pozitivna kontrola pSPORT 1+1,2, negativna pa  $\lambda$ /HindIII. Hibridizacijo smo namreč izvedli dvakrat ločeno na isti membrani in pri enakih pogojih z razliko, da je bila sonda v prvem primeru odsek 1,2 kb, v drugem pa DNK bakteriofaga  $\lambda$ . Odseki, ki so smo jih s sondo hibridizirali, po vsej verjetnosti vsebujejo gen *btsT*.

Sledila je priprava vektorja za insercijsko mutagenozo gena *btsT*. V polilinkerski regiji plazmida pSPORT 1+1,2 smo uničili restriksijska mesta za restriksijska encima *SstI* in *SmaI*. Iz plazmida pCTC 5 smo izolirali gen *tetM*. Plazmid pSPORT 1+1,2 pa smo rezali v insertu z restriksijskima encimoma *SstI* in *SmaI*. Nato smo v ta plazmid vključili gen *tetM* in tako pripravili plazmid p $\Delta$ BTST. Vključitev gena *tetM* smo preverjali z restriksijsko analizo z restriksijskima encimoma *BamHI* in *BglIII* (slika 4).

Klona 2 in 12 sta ustrezna, saj je tu prišlo do vključitve *tetM* v odsek 1,2 kb vektorja (slika 4; stolpci 7, 8, 12, 13). *BglIII* je celoten konstrukt rezal le enkrat in tako smo lahko preverili velikost p $\Delta$ BTST (8 kb). *BamHI* pa izreže iz p $\Delta$ BTST celoten insert (3,9 kb - odsek 1,2 + *tetM*; 4,1 kb pSPORT 1).

Naslednji koraki:

1. Vnos odseka 1,2 kb z *tetM* v protoplaste *B. licheniformis* in izolacija transformant, odpornih proti tetraciklinu. Pri teh transformantah bomo ugotavljali zmožnost sinteze bacitracina in ga primerjali s divjim sevom *B. licheniformis*. Pričakujemo, da bodo izolirane transformante sintetizirale bistveno manj bacitracina. Za popolno prekinitev biosinteze bacitracina bomo morali po vsej verjetnosti inaktivirati še tioesterazno regijo v modulu, ki dodaja zadnjo aminokislino bacitracina.
2. Gen *btsT* bomo klonirali v integracijski vektor in ga vnesli v protoplaste *B. licheniformis* ter opazovali vpliv povečanega števila kopij gena za tioesterazo na biosintezo bacitracina.



Slika 4. Plazmidna DNK klonov 2, 3, 12 rezana z *Bam*HI in *Bg*III. (1) in (14)  $\lambda$ /*Hind*III; (2) pSPORT 1+*Tet* M/*Bam*HI/*Bg*III (3) pSPORT 1+*Tet* M/*Bam*HI; (4) pSPORT 1+1,2 /*Bam*HI/*Bg*III; (5) in (6) pSPORT 1+1,2 /*Bam*HI; (7) 2/*Bg*III; (8) 2/*Bam*HI; (9) in (10) 3/*Bg*III; (11) 3/*Bam*HI; (12) 12/*Bg*III; (13) 12/*Bam*HI

Figure 4. Plasmid DNA of clones 2, 3, 12 digested with endonucleases *Bam*HI and *Bg*III. (1), (14)  $\lambda$ /*Hind*III; (2) pSPORT 1+*Tet* M/*Bam*HI/*Bg*III (3) pSPORT 1+*Tet* M/*Bam*HI; (4) pSPORT 1+1.2 /*Bam*HI/*Bg*III; (5) in (6) pSPORT 1+1.2 /*Bam*HI; (7) 2/*Bg*III; (8) 2/*Bam*HI; (9) in (10) 3/*Bg*III; (11) 3/*Bam*HI; (12) 12/*Bg*III; (13) 12/*Bam*HI

## ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Alešu Gaspariču, ki se je kljub obveznostim vedno posvetil tudi meni in mojim bolj ali manj strokovnim problemom.

## VIRI

- Dohren, H./ Keller, U./ Vater, J./ Zocher, R. Multifunctional peptide synthetases. *Chem. Rev.*, 97(1997), 2675-2705.
- Dower, W.J./ Miller, J.F./ Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage elektorporation. *Nuc. Acid. Res.*, 16(1988), 6127-6145.
- Dular, T. Študij vpliva povečane koncentracije beljakovin SinI in SinR na raven biosinteze bacitracina pri bakteriji *Bacillus licheniformis*. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 74(1999)2, 67-72.
- ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems. Buckinghamshire, Amersham Life Science, 1995, 51.
- De Ferra, F./ Rodriguez, F./ Tortora, O./ Tosi, C./ Grandi, G. Engineering of peptide synthetases - Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.*, 272(1997), 25304-25309.
- Froyshov, O. Biosynthesis of bacitracin on a protein thiotemplate. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 22(1975), 427-432.

- Gasparič, A./ Grošel, A./ Dular, T./ Sladič, G./ Radež, I./ Mandič Mulec, I. The influence of *Bacillus subtilis* proteins DegU, SinR and SinIR on bacitracin biosynthesis in *Bacillus licheniformis*. Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 72(1998), 37-42.
- Gokhale, R.S./ Hunziker, D./ Cane, D.E./ Khosla, C. Mechanism and specificity of terminal thioesterase domain from the erythromycin polyketide synthetase. Chem. Biol., 6(1999), 117-125.
- Grošel, A. Študij vpliva beljakovine Deg U bakterije *Bacillus subtilis* na biosintezo bacitracina pri bakteriji *Bacillus licheniformis*. Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 74(1999)2, 73-81.
- Horton, M.E. Cloning vector pSPORT1, complete CDS. Direct submission. Gaithersburg, LifeTechnologies, GI=53182, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utils/qmap.cgi?form=6&Do pt=g&uid=531828&db=Nucleotide>, 1994, 18. 10. 1999, 3 s.
- Kleinkauf, H./ Döhren, H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. Eur. J. Biochem., 192(1990), 1-15.
- Konz, D./ Doekl, S./ Marahiel, M.A. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. J. Bacteriol., 181(1999), 133-140.
- Konz, D./ Klaus, A./ Schörgendorfer, K./ Marahiel, A.M. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: Molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. Chem. Biol., 4(1997), 927-937.
- Krätzschmar, J./ Krause, M./ Marahiel, A.M. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. J. Bacteriol., 171(1989), 5422-5429.
- Marahiel, A.M./ Stachelhaus, T./ Mootz, D.H. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev., 97(1997), 2651-2673.
- Marahiel, A.M. Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. FEBS Letters, 307(1992), 40-43.
- Mootz, H.D./ Marahiel, A.M. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. Cur. Opin. Chem. Biol., 1(1997), 543-551.
- Podlesek, Z. Biosinteza antibiotika bacitracina in rezistenca nanj pri bakteriji *Bacillus licheniformis*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 1991, 54-55.
- Sambrook, J./ Fritsch, E.F./ Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Vol. 1, Vol 2, Vol 3. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Laboratory Press, 1989, loč. pag.
- Schneider, A./ Marahiel, M.A. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Arch. Microbiol., 169(1998), 404-410.
- Szabo, L./ Tran, P.L.S./ Pragai, Z/ Holzinger A. *Bacillus licheniformis* putative thioesterase (*btsT*) gene, complete cds. Direct submission. Godollo, Godollo University of Agricultural Science, GI=2952321, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?uid=2952321&form=6&db=n &Dopt=g>, 1998, 18. 10. 1999, 1 s.
- Turgay, K./ Marahiel, M. A. A general approach for identifying and cloning peptide synthetase genes. Peptide Res., 7(1995), 238-241.
- Vater, J./ Stein, T./ Vollenbroich, D./ Kruft, V. The modular organization of multifunctional peptide synthetases. J. Prot. Chem., 16(1997), 557-564.