

УДК 637.127.576.8

Хмель Ю.І., аспірант ©**Буцяк В.І.**, д. с.-г. наук, професор*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького*

СТВОРЕННЯ ПРОДУЦЕНТА ТІОПЕПТИДНОГО АНТИБІОТИКА – СІОМІЦИНУ

В огляді літературивкладено дані літератури, які вказують на значне зростання, в умовах глобалізації, множинної стійкості патогенних збудників до відомих лікарських препаратів. Саме тому актуальною проблемою є пошук нових антибіотичних речовин. Особливу увагу привертають антибіотики тіопептидного ряду, зокрема, сіоміцин. Умовою успішного вивчення закономірностей біосинтезу сіоміцину, а також отримання його біотехнологічних продуцентів із високим рівнем антибіотичної активності, є створення системи селекції мутантів *Streptomyces sioyaensis*.

Ключові слова: *Streptomyces sioyaensis*, сіоміцин, тіопептидні антибіотики, протопластування, злиття протопластів.

Актуальною проблемою сучасної гуманної та ветеринарної медицини є значне зростання частоти поширення явища множинної стійкості патогенних мікроорганізмів до лікарських препаратів. Спектр застосування сучасних препаратів обмежений, більшість з них характеризуються високою токсичністю у відношенні до органів організму. Найперспективнішими продуцентами природних біологічно активних речовин є актиноміцети – прокаріотичні міцеліальні грампозитивні мікроорганізми, природною нішею існування яких є ґрунт. Актиноміцети є продуцентами більшості відомих антибіотиків, серед яких важливе місце займають протипухлинні агенти. Як ґрунтові мікроорганізми актиноміцети відіграють важливу екологічну роль. Однак, увагу дослідників вони привернули, насамперед, як одні з важливих об'єктів біотехнології [7].

Більшість описаних антибіотиків продукуються актиноміцетами роду *Streptomyces*. Недоліком природних штамів є низький рівень синтезу активних речовин. У результаті численних пошуків отримано багато цінних препаратів, що застосовуються в ветеринарній медицині та сільському господарстві. Природні штами актиноміцетів характеризуються відносно низькою антибіотичною активністю, що зумовлює їхню високу вартість. Саме тому існує потреба у розробці методів конструювання і селекції стабільних високоактивних штамів – продуцентів, які б утворювали необхідні цільові продукти антибіотичної природи. Такі дослідження становлять основу для розвитку біотехнологічного виробництва [2, 10].

Штам *Streptomyces sioyaensis* LV81, продукує комплекс тіопептидних антибіотиків, головним з яких є сіоміцин. Сіоміцин і найближчий за його структурою тіострептон володіють низкою дуже важливих біологічних активностей. Даний антибіотик пригнічує синтез білка у грампозитивних бактерій,

активний проти збудника малярії *Plasmodium falciparum*, а також діє як імунносупресант і протипухлинний агент. Значне розповсюдження резистентності збудників інфекцій та пухлинних клітин до антибіотиків зумовлює необхідність пошуку та використання нових антибактерійних та протипухлинних агентів. Тіопептиди привертають увагу дослідників, оскільки на їхню мішень у бактерійній клітині, а саме комплекс рибосомного білка L11 і 23S рРНК, не діють інші, широко вживані антибіотики [23].

Незважаючи на великий біотехнологічне зацікавлення, яке становлять тіопептиди і, зокрема, сіоміцин, закономірності їхнього біосинтезу, а також його генетичний контроль вивчені недостатньо. Лише нещодавно клоновані кластери генів біосинтезу тіострептону та сіоміцину і доведено, що їхній пептидний попередник синтезується на рибосомах, а також створено систему клонування генів у клітинах *Streptomyces sioyaensis* LV81. Умовою успішного вивчення закономірностей біосинтезу сіоміцину, а також отримання його біотехнологічних продуцентів з високим рівнем антибіотичної активності, є створення системи селекції мутантів *Streptomyces sioyaensis* LV81. На сьогодні опрацьовано методи клонування генів у клітинах *S. sioyaensis*, вивчено мінливість продуцента сіоміцину за рівнем антибіотичної активності, а також вплив мутагенів на життєздатність штаму і синтез антибіотика [1, 3, 9]. Цим зроблено перші кроки у створенні ефективної системи селекції продуцента сіоміцину й отримання штамів, здатних до посиленого синтезу цього антибіотика.

Здатність актиноміцетів продукувати більшість відомих антибіотиків визначила те, що в генетиці актиноміцетів основною є проблема генетичного контролю біосинтезу антибіотиків. Встановлено, що гени які контролюють біосинтез антибіотиків локалізовані, як правило, в хромосомі і утворюють кластери. В усіх добре вивчених випадках гени біосинтезу антибіотиків і гени стійкості до власного антибіотика зчеплені і координовано експресуються. Для генів біосинтезу антибіотиків та генів антибіотикорезистентності актиноміцетів характерний високий рівень нестабільності [12, 18]. Біосинтез антибіотиків контролюють також гени резистентності як до власного, так і до інших антибіотиків. Успіх у виділенні суперпродуцентів антибіотиків може залежати від здатності штаму залишатися продуктивним при наявності високих концентрацій власного антибіотика. У ряді випадків доведено, що високо резистентні штами актиноміцетів часто є суперпродуцентами і, навпаки, втрата резистентності супроводжується втратою високого рівня антибіотичної активності [11, 19]. Високий рівень стійкості до власного антибіотика, що важливо для його суперпродуктивності, може досягатися декількома шляхами: зміною експресії наявних у клітині генів стійкості; направленим введенням мутацій, які ведуть до підвищення резистентності (наприклад, рибосомальних мутацій); активацією «мовчазних» генів; введенням додаткових генів стійкості у складі рекомбінантних ДНК. Слід відзначити, що генетична нестабільність у актиноміцетів у більшості випадків пов'язана з перебудовами нуклеотидних послідовностей (делеціями, ампліфікаціями, дезампліфікаціями, інерціями мобільних генетичних елементів) [12].

Для вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків важливе значення мають ідентифікація способів генетичного обміну у штамів-продуцентів та дослідження їх закономірностей. Розуміння особливостей генетичної

рекомбінації у актиноміцетів дозволяє використовувати її в генетичному картуванні та конструюванні цих культур. Найкраще серед шляхів генетичного обміну в актиноміцетів вивчена кон'югація, яка контролюється конюгативними плазмідами. У більшості випадків кон'югація в актиноміцетів характеризується низькою частотою утворення рекомбінантів і утворенням мериплоїдів внаслідок неоднакового вкладу частин геномів обох батьків. Незважаючи на ці труднощі, за допомогою методів генетичної рекомбінації на сьогодні картовані хромосоми ряду видів актиноміцетів [4, 22]. Інші природні способи передачі спадкової інформації вивчені у стрептоміцетів гірше, ніж кон'югація. Хоча встановлено, що загальна трансдукція є дуже зручним способом для генетичного аналізу бактерій, її механізми для роду *Streptomyces* досліджені дуже слабо [4, 22].

У культур, що позбавлені природних систем генетичного обміну, рекомбінанти отримують методами генної та клітинної інженерії. Одним з таких є злиття протопластів. Цей процес є зручною моделлю для здійснення внутрі- і міжвидової генетичної рекомбінації шляхом трансформації плазмідної ДНК і трансфекції фагової ДНК [5, 14, 22]. Протопласти актиноміцетів утворюються в результаті дії лізоциму на клітинну стінку міцеліальних клітин у гіпертонічному розчині. Стресовий фізіологічний стан, викликаний утворенням, злиттям і регенерацією протопластів, може викликати суттєві перебудови геному стрептоміцетів, що призводить до змін антибіотичної активності [4, 6], до змін регуляції експресії генів, змін основних метаболічних шляхів у клітині, виведення плазмід, до експресії «мовчазних» генів [8, 10] в різних видів стрептоміцетів. Злиття протопластів має ряд переваг над іншими методами генетичного обміну: висока частота рекомбінантів, обмін великими ділянками ДНК і, ймовірно, однакова роль батьків у цьому процесі. Щоб відбулося утворення рекомбінантних форм у результаті злиття протопластів, повинні відбуватися такі процеси: цитоплазматична взаємодія, взаємодія ДНК-ДНК, регенерація клітинної стінки. Для відбору рекомбінантів у процесі злиття протопластів як маркери використовують ауксотрофність і стійкість до антибіотиків [20, 22]. Для індукції злиття протопластів найчастіше використовуюється поліетиленгліколь (ПЕГ) певної молекулярної маси і концентрації. ПЕГ сильно знижує величину вільної енергії клітинної поверхні, що сприяє злиттю протопластів [21]. Hranueli із співавторами в досліджах на *S. rimosus* довели, що при нестачі ПЕГ або його відсутності, злиттю протопластів сприяє наявність іонів Ca^{2+} [16]. Деякі автори [6, 14] відзначають, що УФ-опромінення протопластів, їх нагрівання перед злиттям сприяє значному зростанню кількості множинних кросинговерів. Завдяки злиттю протопластів стало можливим проведення міжвидових схрещувань і побудова генетичних карт.

Hranueli, Pigas із співавторами [16] провели порівняльний аналіз рекомбінантів після кон'югаційних схрещувань і злиття протопластів у *S. rimosus*. Частота рекомбінації в першому випадку становила $4 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-4}$, в другому - $8 \cdot 10^{-2}$, що вказує про більшу ефективність методу злиття протопластів для отримання генетичних рекомбінантів число множинних кросинговерів при кон'югації – 1,5%, що в 10 разів менше, ніж при злитті протопластів (13,3%) [21].

Техніка протопластування розроблена для ряду штамів актиноміцетів. Доведено, що на ефективність регенерації протопластів впливають такі фактори, як склад поживного середовища, на якому вирощують міцелій, концентрація

гліцину в середовищі, вік міцелію, взятого для протопластування, спосіб лізису міцелію. Слід підкреслити, що даних про отримання, злиття протопластів і отримання при цьому рекомбінантів *Streptomyces sioyaensis*, у літературі немає.

Вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків дало можливість отримати важливі дані про організацію геному актиноміцетів, експресію їх генів, зокрема в процесі морфогенезу. Очевидно, що вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків має важливе практичне значення, адже вдосконалення існуючих та створення нових штамів-продуцентів антибіотиків можливе лише в процесі глибокого дослідження їх генетичного контролю і розробки на цій основі нових генетичних та генно-інженерних підходів до конструювання промислових штамів-продуцентів.

Література

1. Аравіцька О. Вплив ультрафіолетового опромінення на антибіотичну активність продуцента сіоміцину *Streptomyces sioyaensis* Lv81 // Аравіцька О., Грубський Я., Мироновський М. та ін. - Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 50. С. 11–17.
2. Громико О. Мутанти *S. nogalater* ІМЕТ 43360 з підвищеним рівнем синтезу протипухлинного антибіотика ногаламіцину // Громико О., Кириченко Н., Федоренко В. - Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 35. С. 121–127.
3. Жукова Р. А. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. Жукова Р. А., Коммунарская А. Д., Пронина М. И. и др. // Л.: Медицина, 1978. 160 с.
4. Захаров І.А. Генетические карты микроорганизмов // Захаров І.А., Мацелюх Б.П. -К: Наукова думка. -1986. -С.3-150.
5. Маланичева І.А. Изменение способности образовывать антибиотики в результате межвидового слияния протопластов стрептомицетов – продуцентов мономицина и канамицина // Маланичева І.А., Новоженев М.Ю. -Антибиот. И химиотер.-1989.-Т.34.-Т12.-С.121-126.
6. Орлова Т.И. Использование протопластов *Streptomyces* sp.26-115, инактивированных нагреванием в экспериментах по слиянию // Орлова Т.И., Куроедов А.А., Волкова Е.И. -Антибиотики и химиотер.-1989.Т.34.-№2.-С.94-98.
7. Федоренко В. О. Генетичний контроль стійкості актиноміцетів до антибіотиків тайого роль у біосинтезі антибіотиків // Федоренко В. О. - Дис. ... д-ра біол. наук. Львів, 2004. 512 с.
8. Фурс А.Р. Методы протопластирования и трансформации штаммов *Streptomyces*. // Фурс А.Р., Орехов А.В. - Антибит. и химиотер.-1988.-Т.33, №3.-С.-180-189.
9. Bagley M. C. Thiopeptide antibiotics // Bagley M. C., Dale J. W., Merritt E. A., Xiong X. -Chem. Rev.2005. Vol. 105. P. 685–714.
10. Blanco M. G. Resistance in inhibitors of RNA polymerase in actinomycetes which produce them // Blanco M. G., Hardisson C., Salas J. A. -Gen.Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 2883–2891.
11. Chater K.C. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. // Chater K.C., Bruton C.J. - EMBO J. 1985.-№4.-P.1893-1900.
12. Cundliff E. How antibiotic-producing organism avoid suicide. // Cundliff E. - Annu. Rev. Microbiol.-1989.-Vol.45.-P.207-233.
13. Cundliffe E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea* // Cundliffe E. - Gene. 1992. Vol. 115. P. 75–84.

14. Hopwood D.A. Bacterial protoplast fusion Recombination in fusional protoplast of *Streptomyces coelicolor*.// Hopwood D.A., Wright H.M. - Mol. Gen. Genet.-1978.-Vol.62,№ 3.-P.307-317.
15. Hosoya Y. Acquisition of certain streptomycin-resistant (Str) mutations enhances antibiotic production in bacteria // Hosoya Y., Okamoto S. - Antimicrob. Ag. and Chemother. 1998. Vol. 42. N 8. P. 2041–2047.
16. Hranueli D. Genetic interaction in *Streptomyces rimosus* mediated by conjugation and by protoplast fusion// Hranueli D., Pigas J., Smokvina T., Alecevic H. - J. Gen. Microbiol.-1983.-Vol.129,№5.-P.1415-1422.
17. Hu H. Novel approach of improving the productivity of antibiotic producing strains by inducing combined resistant mutations // Hu H., Ochi K. - App. Env. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 1885–1892.
18. Malpartida S. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of *Streptomyces antibiotica*.// Malpartida S., Hopwood D. -Nature.-1984.-Vol.309.-P.462-464.
19. Nakano M. Expression of the kanamycin-resistance gene in kanamycin producing strain *Streptomyces kanamyceticus*.// Nakano M., Butsuya Y., Ogawara H. - J.Antibiot.-1988.-Vol.42.-№ 11.-P.423-430.
20. Okanishi M. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplast cultural conditions and morphological study.// Okanishi M., Suzuki R., Umerawa H. - I. Gen. Microbiol.-1974.-Vol.80.-P.389-400.
21. Pigas I. Optimal culture and physiological condition for handling *Streptomyces rimosus* protoplast.// Pigas I., Hranueli D., Smocvina T. - Appl. Microbiol.-1982.-Vol.44.-№5.-P.1178-1186.
22. Rhodes M. Genetic recombination and maps for *Streptomyces*. // Rhodes M.- In the book «The bacteria. The treatise on structure and function» in ed. Gunsalus I.C. – Academic press.-1986.-415pp.
23. Ueno M. Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody production // Ueno M., Furukawa S., Abe F. et al. - J. Antibiot. 2004. Vol. 57. P. 590–596.

Summary

Khmel Y.I., Butsyak V.I.

Lviv National University of Veterinary Medicine and biotechnology named after S.Z. Gzhytskyj

RECEIVING PRODUCER THIOPEPTIDE ANTIBIOTICS – SIOMYCIN

*The review states the facts of literature, which show the significant increase of multiple resistance of pathogenic agents to known pharmaceuticals. Therefore, searching for new antibiotic is an actual problem. Thiopeptide antibiotics, in particular siomycin, attract special attention. Creation of the system of *Streptomyces sioyaensis* mutants' selection is the condition for the successful study of siomycin's biosynthesis and getting its biotechnological producers with the high level of antibiotic activity.*

Key words: *Streptomyces sioyaensis, siomycin, thiopeptide antibiotics protoplasts, mergers protoplasts.*

Рецензент – д.вет.н., проф. Гуфрій Д.Ф.