

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

ФЕДОРЕНКО Віктор Олександрович

УДК 575.224+577.21

**ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ СТІЙКОСТІ АКТИНОМЦЕТІВ
ДО АНТИБІОТИКІВ ТА ЙОГО РОЛЬ У БІОСИНТЕЗІ АНТИБІОТИКІВ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2004

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Малюта Станіслав Станіславович,

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
завідувач відділу молекулярної генетики (м. Київ);

доктор біологічних наук,

Кучук Микола Вікторович

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
(м.Київ),

головний науковий співробітник;

доктор біологічних наук, професор

Позур Володимир Костянтинович,

Київський національний університет імені Тараса
Шевченка,

завідувач кафедри мікробіології та загальної імунології.

Провідна установа: Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України (м.Київ)

Захист дисертації відбудеться “27” січня 2005 р. о 10 годині

на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.202.01. в

Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

за адресою: 03143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148.

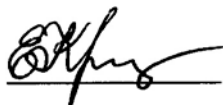
З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148.

Автореферат разісланий “24” грудня 2004 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук



Кравець О.А.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Антибіотики належать до числа головних продуктів сучасної біотехнології та активно застосовуються в медицині та ветеринарії. Більшість відомих сьогодні антибіотиків продукують актиноміцети - одні з найчисельніших і найбільш розповсюджених ґрунтових бактерій. Антибіотики, продуценти яких вивчалися у цій роботі - еритроміцин, канаміцин, спіраміцин, доксорубіцин і данорубіцин, є важливими та широко вживаними медичними препаратами [Hutchinson, 1997; Piepersberg, Distler, 1997; Staunton, Weissman, 2001]. Однак, багато аспектів генетичного контролю їх біосинтезу є слабо вивченими. Вимагає вдосконалення й система селекції промислових продуцентів цих антибіотиків. У той же час вивчення генетичного контролю біосинтезу ландоміцинів – високоактивних протипухлинних антибіотиків, які розглядаються як перспективні для застосування в хіміотерапії раку, розпочалося лише в кінці 90-років минулого століття [Мацелюх і співавт., 1998; Westrich et al., 1999; Федоренко і співавт., 2001].

Промислові продуценти антибіотиків отримані головню за допомогою багатьох етапів індукованого мутагенезу та селекції клонів з підвищеною антибіотичною активністю [Normansell, 1986; Berdy, 1995]. Зараз є очевидним, що традиційна селекція актиноміцетів великою мірою вичерпала себе. Це, насамперед, стосується штамів, які тривалий час були об'єктами селекції, зокрема тих, що досліджувалися у цій роботі. Тому важливим та актуальним завданням є опрацювання раціональних підходів до вдосконалення промислових актиноміцетів, що ґрунтується як на вивченні генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, так і спеціальної генетики штамів-продуцентів, а також розробки стосовно кожного з них методів генетичної інженерії. Сьогодні показана перспективність застосування методів генної інженерії для конструювання продуцентів нових антибіотиків - так званий „комбінаторний” біосинтез [Khosla, Zawada, 1996; Horwood, 1997, Mendez, Salas, 2001; Rix et al., 2002]. Для використання цих методів необхідне розуміння генетичного контролю кожного з етапів синтезу антибіотиків.

Актиноміцетам властива природна множинна стійкість до антибіотиків [Даниленко и др., 1977; Федоренко и др., 1985]. У більшості описаних випадків детермінанти стійкості актиноміцетів до власного антибіотика та гени його біосинтезу зчеплені та координуються [Horwood, 1999]. Ідентифікація та клонування генів резистентності до власного антибіотика є, зазвичай, першим кроком у дослідженні генів біосинтезу антибіотиків [Kieser et al., 2000]. Одним із головних чинників, що лімітують біосинтез антибіотика, є ступінь резистентності штаму як до власного токсичного продукту, так і до інших антибіотиків. Встановлення закономірностей генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків та його ролі у біосинтезі антибіотиків має важливе значення для глибшого розуміння механізмів цих явищ, а також для розробки методів

конструювання і селекції промислових продуцентів антибіотиків. Крім того, досліджуючи стійкість актиноміцетів до антибіотиків можна краще зрозуміти походження, еволюцію і шляхи розповсюдження генетичних детермінантів антибіотикорезистентності серед бактерій, зокрема, збудників інфекцій, покращити антибіотикотерапію та створення нових, ефективніших хіміотерапевтичних препаратів. Однією з особливостей актиноміцетів є їх висока спонтанна мінливість [Baltz, 1986; Leblond et al., 1990; Даниленко, 1991]. Гени стійкості до антибіотиків стали зручною моделлю для вивчення механізмів нестабільності генома актиноміцетів [Федоренко, Даниленко, 1980; Cullum et al., 1994]. Їх дослідження допомагає краще зрозуміти закономірності організації генома актиноміцетів та його мінливості. Воно має також важливе практичне значення, оскільки найчастіше нестабільними є ознаки, за якими проводиться селекція актиноміцетів. Вказані проблеми особливо актуальні для України, де у даний час відсутнє промислове виробництво субстанцій антибіотиків за допомогою їх біосинтезу та стоїть завдання його організації.

Зв'язок роботи з науковими програмами організації, де виконувалась дисертація.

Дисертаційна робота виконувалась у рамках наукової тематики кафедри генетики та біотехнології а також НДЛ-45 генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів антибіотиків ЛНУ ім.І.Франка, зокрема держбюджетних та госпдоговірних тем, науковим керівником яких був здобувач: БГ20-87 “Генетичний контроль продукції еритроміцину” (номер держреєстрації - 01.8700.17789), БГ162Б „Вивчення генетичного контролю біосинтезу канаміцину та одержання промислових штамів-продуцентів канаміцину з підвищеною активністю” (номер держреєстрації - 0193U009889), БГ523Б „Генетичне та генно-інженерне конструювання штамів актиноміцетів та дріжджів – продуцентів біологічно активних речовин” (номер держреєстрації – 0193V03292), БГ162Б „Клонування і вивчення генів актиноміцетів, які контролюють біосинтез антибіотика канаміцину з метою конструювання його продуцентів” (номер держреєстрації - 0193V0033289), БГ573Б „Створення рекомбінантних штамів – продуцентів антибіотика еритроміцину” (номер держреєстрації - 0198V033287), БГ701Б „Вивчення механізмів генетичного контролю біосинтезу антибіотиків та стійкості до них в актиноміцетів” (номер держреєстрації - 0196V002133), БГ260Б „Конструювання штамів – продуцентів антибіотика канаміцину *Streptomyces kanamyceticus* за допомогою методів клітинної та генної інженерії” (номер держреєстрації – 0197U018080), БГ365Д “Конструювання і селекція штаму *Streptomyces peucetius* – продуцента протипухлинного антибіотика рубоміцину” (номер держреєстрації – 0197V015671), БГ12Б “Розробка методів генетичного та генноінженерного конструювання штамів – продуцентів протиракових антибіотиків” (номер держреєстрації – 0100U001442), БГ117Б „Генетичний контроль біосинтезу актиноміцетами протипухлинних антибіотиків групи ландоміцинів” (номер держреєстрації – 0103U001916), БГ203Н „Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка” (номер держреєстрації – 0103U008453), а також

двох міжнародних проєктів: INTAS – Україна 95-20 “Біотехнологічне вдосконалення продуцента нового потенційного протипухлинного антибіотика” та ВМБФ 0311308 „Резистентність до власних антибіотиків у продуцентів полікетидів” (здобувач – співкерівник проєктів). Робота також підтримана двома індивідуальними грантами Міжнародного фонду „Відродження” (APU054103 та APU074110).

Мета та завдання дослідження. Метою цієї роботи є встановлення закономірностей генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків, визначення його ролі у біосинтезі антибіотиків, а також створення на цій основі підходів до конструювання та селекції штамів - продуцентів цих сполук.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1) охарактеризувати актиноміцети – продуценти полікетидних антибіотиків *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces peucetius subsp. caesius*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces coelicolor A3(2)* та продуцент аміноглікозидного антибіотика канаміцину *Streptomyces kanamyceticus* за ознаками стійкості до антибіотиків;

2) вивчити мутаційні зміни ознак стійкості до антибіотиків у вказаних штамів;

3) картувати мутації генів, що змінюють антибіотикорезистентність та біосинтез антибіотиків у досліджуваних штамів;

4) дослідити вплив мутацій стійкості актиноміцетів до антибіотиків на біосинтез полікетидів та канаміцину та оцінити перспективність їх використання у селекції продуцентів;

5) провести генетичний аналіз синтезу канаміцину та розробити методи перенесення рекомбінантних ДНК у *S. kanamyceticus*;

6) клонувати та секвенувати генетичний детермінант стійкості *S. kanamyceticus* до аміноглікозидів;

7) клонувати і вивчити кластер генів біосинтезу ландоміцину E (lnd-генів) *S. globisporus* 1912, розробити методи клонування ДНК у цьому штамі та спрямованої інактивації lnd-генів;

8) на основі отриманих даних про генетичний контроль біосинтезу антибіотиків та стійкості до них опрацювати способи генетичного та генно-інженерне конструювання штамів з підвищеним синтезом антибіотиків та зміненим спектром синтезованих сполук.

Об'єкт дослідження: генетичний контроль стійкості актиноміцетів до антибіотиків та синтезу антибіотиків. У роботі використано штами актиноміцетів – продуценти антибіотиків медичного призначення еритроміцину – *Sacch. erythraea*, канаміцину – *S. kanamyceticus*, доксорубіцину та даунорубіцину – *S. peucetius subsp. caesius*, спіраміцину – *S. ambofaciens*, *S. globisporus* - продуцент протипухлинного антибіотика ландоміцину E, а також *S. coelicolor A3(2)* та *S. lividans 66*, які є модельними об'єктами генетики актиноміцетів.

Предмет дослідження: гени, що контролюють стійкість актиноміцетів до антибіотиків та гени біосинтезу цих сполук.

Методи дослідження: мікробіологічні (культивування штамів актиноміцетів та аналіз їхніх ознак), біохімічні (очищення, кількісний та якісний аналіз антибіотиків), генетичні (отримання та генетичне картування мутацій, генетична трансформація клітин *Escherichia coli* та протопластів актиноміцетів, кон'югаційні схрещування між *E. coli* та актиноміцетами), генно-інженерні (виділення та рестрикційний аналіз сумарної та плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, гель-електрофорез ДНК, ДНК-ДНК гібридизація, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування ДНК).

Наукова новизна отриманих результатів. Показано, що актиноміцетам притаманна множинна зміна ознак резистентності до антибіотиків. У геномі модельного об'єкту генетики актиноміцетів *S. coelicolor A3(2)* вперше виявлено послідовності ДНК, здатні до ампліфікації. Отримано та вивчено колекції мутантів продуцента еритроміцину *Sacch. erythraea*, стійких до рифампіцину (Rif^R), хлорамфеніколу (Cml^R), тіострептону (Tsr^R) та стрептоміцину (Str^R) та вивчено вплив цих мутацій на біосинтез еритроміцину. Показано хромосомну локалізацію мутацій стійкості *Sacch. erythraea* до рифампіцину та хлорамфеніколу. Виділено та вивчено колекцію мутантів продуцента даунорубіцину та доксорубіцину *S. peucetius subsp. caesius*, стійких до власних антибіотиків (Dnr^R та Dxr^R). Досліджено вплив цих мутацій на біосинтез антрациклінових антибіотиків та здатність мутантів до перетворення екзогенного даунорубіцину у доксорубіцин. Створено бібліотеку геному продуцента протипухлинного антибіотика ландоміцину E *S. globisporus* 1912, клоновано та секвеновано кластер генів біосинтезу ландоміцину E (Ind-кластер), в якому ідентифіковані 30 генів та визначено їхні ймовірні функції. Виявлено регуляторний ген *IndI*, що кодує активатор транскрипції структурних генів біосинтезу ландоміцинів. На основі кон'югативної інтегративної плазмиди pSET152 створено векторну систему для „нокаутів” генів *IndI*-кластера або ж заміщення цих генів їх мутантними алелями. У досліджах з інактивації гена *IndA* отримано прямі докази участі *IndI*-генів у контролі синтезу ландоміцину E у *S. globisporus* 1912. Сконструйовано штами *S. globisporus* 1912, що синтезують нові ландоміцини F, G та H зі змінами у агліконовій частині молекули та показано залежність протипухлинної активності ландоміцинів від їх структури.

Вперше отримано і досліджено колекції генетично маркованих штамів продуцента канаміцину *S. kanamyceticus* та його мутантів з порушеннями різних етапів біосинтезу канаміцину, а також зі зміненою стійкістю до аміноглікозидних антибіотиків. Ідентифіковано п'ять класів мутацій окремих генів, що контролюють продукцію канаміцину. Продемонстровано генетичну рекомбінацію після злиття протопластів *S. kanamyceticus* та показано зчепленість мутацій, що порушують різні етапи синтезу канаміцину з мутаціями стійкості *S. kanamyceticus* до деяких

антибіотиків. Клоновано та секвеновано ген ймовірної метилази 16S рПНК kmrB, що визначає стійкість штаму *S. kanamyceticus* до канаміцину, гентаміцину, тобраміцину та сизоміцину. Визначено розміри хромосомної ДНК *S. kanamyceticus* та виявлено її перебудови у мутантів, стійких до аміноглікозидів. Розроблено систему перенесення реплікативних та інтегративних плазмід у клітини продуцента канаміцину *S. kanamyceticus* за допомогою кон'югаційних схрещувань з *E. coli*. Клоновано та секвеновано ділянки хромосоми *S. kanamyceticus*, що прилягають до сайтів інтеграції кон'югативної векторної плазмиди pSET152.

Практичне значення отриманих результатів полягає у можливості їх використання у конструюванні та селекції актиноміцетів – продуцентів антибіотиків. Показано, що отримання мутантів, резистентних до антибіотиків (Rif^R-, Cml^R-, Tsr^R- та Str^R- мутантів у *Sacch. erythraea*, Dnr^R- та Dxr^R-мутантів *S. peucetius subsp.caesius*, гентаміцин-стійких мутантів *S. kanamyceticus*) є ефективним методом селекції цих продуцентів. Визначено класи стійких мутантів, найбільш перспективні для селекції, та способи їх підтримуючої селекції. Показано, що злиття протопластів та відбір рекомбінантів, що поєднують мутації стійкості до антибіотиків рифампіцину, стрептоміцину та тіострепону може використовуватися в селекції штамів *Sacch. erythraea*. Встановлено, що мутанти з порушеною глюкозною репресією є перспективними для селекції *S. peucetius subsp.caesius* та *S. kanamyceticus*, що скерована на підвищений синтез антрациклінів та канаміцину, відповідно. Отримані у роботі Dnr^R – мутанти а також рекомбінантні штами *S. peucetius subsp.caesius* з клонованими генами dnrI та srx можуть бути використані для трансформації даунорубіцину в більш цінний протипухлинний антибіотик –доксорубіцин (на цей спосіб отриманий патент України на винахід 50047А, здобувач – співавтор винаходу). Штами *S. globisporus*, в яких клоновані додаткові копії регуляторного гена lndI можуть використовуватися як надпродуценти ландоміцинів (на цей спосіб отриманий патент України на винахід 62200А, здобувач – співавтор винаходу). Клоновані lnd-гени *S. globisporus* та розроблена у роботі система їх спрямованої інактивації, може бути використана у комбінаторному біосинтезі нових ландоміцинів та інших ангуциклінів з поліпшеними протипухлинними властивостями. Розрахункова модель виробництва ландоміцину Е на основі отриманих в роботі штамів, опрацьована спільно із спеціалістами НУ „Львівська політехніка” [Сидоров та ін., 2003], показала високу рентабельність цього виробництва та значно меншу вартість продукту порівняно з імпортними аналогами протипухлинних ароматичних полікетидних антибіотиків.

Штами актиноміцетів та інших бактерій, які були об'єктами дисертаційної роботи, стали основою Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ ім. І.Франка (здобувач – науковий керівник Колекції). Згідно розпорядження Кабінету міністрів України від 19 серпня 2002 року за №472-р вона включена до Державного реєстру наукових об'єктів, що становлять національне надбання України. Розроблені у ході виконання роботи методи, сконструйовані штами

та плазміді використовуються у навчальному процесі на кафедрі генетики та біотехнології на великому практикумі з генетики та генетичної інженерії бактерій, а також під час виконання студентами дипломних та курсових робіт.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота була спланована та виконана автором в основному самостійно. Ідеї, гіпотези та теоретичні концепції роботи належать здобувачеві. Ряд штамів та плазмід, використаних у роботі, сконструйовано автором самостійно, або ж отримано іншими співробітниками та аспірантами за схемами, запропонованими автором. Дослідження генетичного контролю біосинтезу еритроміцину у *Sacch. erythraea* та стійкості його до антибіотиків проводилось у співпраці з співробітниками НДЛ-45, кандидатами біологічних наук Настасяком І.М., Басілією Л.І. та Кириченко Н.В., генетичної нестабільності у *S. coelicolor* A3(2) та *Sacch.erythraea* – з асп. (тепер – канд.біол.наук) Заворотною С.А., генетичного контролю біосинтезу канаміцину у *S. kanamyceticus* – зі здобувачем (тепер – канд.біол.наук) Голець Л.М., генетичного контролю стійкості *S. kanamyceticus* до антибіотиків – з асп. (тепер – канд.біол.наук) Демидчук Ю.О., генетичного конструювання та селекції продуцента антибіотиків доксорубіцину та даунорубіцину *S. peucetius subsp.caesius* - з асп. (тепер – канд.біол.наук) Дубицькою Л.П., генетичного контролю синтезу ландоміцину E у *S.globisporus* та його стійкості до антибіотиків – з асп. (тепер – канд.біол.наук) Осташем Б.О., м.н.с. Громиком О.М., асп. Панькевич К.О, та асп. Ребцем Ю.В., з розробки систем клонування генів у штаммах *S. kanamyceticus* та *S. globisporus* – з асп. (тепер – канд.біол.наук) Лужецьким А.М. Дослідження генетичної нестабільності у *S. coelicolor* A3(2) та *Sacch. erythraea* проводилося у співпраці з проф. Даниленком В.М. (ДНЦ антибіотиків, Москва, Росія). Секвенування генів біосинтезу ландоміцину E *S. globisporus* проводилося у співпраці з д-ром Крюгелем Г. (Ганс Кноль Інститут дослідження природних сполук, Іена, ФРН), проф. Бехтольдом А. (Фрайбурзький університет, ФРН) та проф. Саласом Х.А. (Університет м.Ов'єдо, Іспанія). Структурний аналіз та визначення протипухлинної активності ландоміцинів здійснювався у співпраці з проф. Рором Ю. (Університет штату Кентуккі, США).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на таких вітчизняних та міжнародних конференціях, симпозіумах, з'їздах та конгресах: Всесоюзній конференції “Новые направления биотехнологии” (Пушино-на-Оці, 1984), V, VI та VII з'їздах Українського товариства генетиків і селекціонерів ім.М.Вавилова (Умань, 1986; Полтава, 1992; Пісочне, АРК, 2002), Всесоюзному семінарі „Современные проблемы антибиотикорезистентности” (Москва, 1988); Всесоюзній конференції „Результаты и перспективы научных исследований по биотехнологии и фармакологии” (Ленінград, 1989); Міжнародному симпозіумі “Genetics and product formation in *Streptomyces*” (Ерфурт, 1990); 7 Національній конференції з виробництва та застосування антибіотиків (Разград, 1990); VI та VII Міжнародних симпозіумах з генетики промислових мікроорганізмів (Страсбург, 1990; Монреаль, 1994); VIII, IX, X та XII Міжнародних

симпозіумах з біології актиноміцетів (Медисон, 1991; Москва, 1994; Пекін, 1997; Ванкувер, 2001); I та II Всесоюзній планово-звітній конференції “Генная и клеточная инженерия” (Пушино-на-Оці, 1991,1992); Конференціях виконавців НТП Держкомітету СРСР з народної освіти „Новая медицинская техника и медицинские препараты” (Ленінград, 1990, Харків, 1990, Львів, 1991), I Установчому (VIII) та II з’їздах Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993; Чернігів, 2000), VII та VIII Європейських біотехнологічних конгресах (Ніцца, 1995; Будапешт, 1997); Конференції “Beijerinck centennial microbial physiology and gene regulation: emerging principles and application” (Гаага, 1995), VAAM Workshop “Biologie der Actinomyceten” (Іена, 1994; Мюнстер, 1995; Дрезден, 1998); Конференції керівників наукових проєктів, що входять до координаційного плану Міністерства освіти України (Харків, 1999); Науково-практичній конференції „Проблеми винахідництва та раціоналізаторства в Україні” (Львів, 2001), 36 Загальнопольському симпозіумі „Aktywność drobnoustrojów w ryńnych ńrodowiskach” (Краків, 2001); VAAM Workshop “Biologie bacteriellen Naturstoffproduzenten” (Фрайбург, 2002), VIII Українському біохімічному з’їзді (Чернівці, 2002); I Всеукраїнській науково-практичній конференції „Біотехнологія. Наука. Освіта” (Київ, 2003); Міжнародній Вейглівській конференції „Microorganisms in pathogenesis and their drug resistance” (Львів, 2003), II Крайовому біотехнологічному конгресі (Лодзь, 2003), 16 Мікробіологічному симпозіумі “Advance of microbial science and control of infectious diseases” (Кіото, 2003), 76 Конференції Японського біохімічного товариства (Йокогама, 2003), Наукових конференціях ЛНУ ім.І.Франка.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 91 роботу, у тому числі 38 статей в фахових наукових журналах, 3 статті в збірниках наукових праць, 3 патенти України та 48 тез доповідей на конгресах, конференціях, симпозіумах та з’їздах.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини (матеріалів і методів досліджень, результатів та їх обговорення) та списку використаних джерел (490 найменувань). Робота викладена на 512 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 109 рисунками та 73 таблицями. Основна текстова частина включає 254 сторінки.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури дається характеристика актиноміцетів як об’єктів генетичних досліджень, висвітлюється сучасний стан проблеми генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, зокрема, полікетидів та аміноглікозидів. Розглядаються основні механізми стійкості актиноміцетів до антибіотиків актиноміцетів та їх генетичний контроль. Аналізуються дані про взаємозв’язок між стійкістю до антибіотиків та їх синтезом а також шляхи використання генетичних детермінантів антибіотикорезистентності у селекції актиноміцетів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використали штами *Escherichia coli* DH5 α , KW251, ET12567 та 180 штамів актиноміцетів, у тому числі мутантних, що належать до 19 видів *Streptomyces*, *Saccharopolyspora* та *Micromonospora* а також 50 плазмід. Вони отримані автором та його співпрацівниками з кафедри генетики та біотехнології ЛНУ ім.І.Франка, де виконувалась робота, а також люб'язно надані колегами з інших установ.

Стійкість штамів актиноміцетів до антибіотиків визначали, як описано в роботах [Федоренко и др., 1989; Настасяк и др., 1990; Демидчук и др., 1996].

Антибіотичну активність досліджуваних штамів визначали методом дифузії в агар із використанням тест-культур *Bacillus mycoides* HB2 та *Streptomyces albus* CEST113.

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) та кількісне визначення антибіотиків проводили за такими методиками: канаміцинів [Голец и др., 1997], еритроміцинів [Weber et al., 1985], спіраміцинів [Richardson et al., 1990], антрациклінів [Segura et al., 1997]. ТШХ, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) та спектральний аналіз ландоміцинів проводили згідно [Henkel et al., 1990; Мацелюх та співавт., 1999].

Визначення ефективності перетворення екзогенного даунорубіцину в доксорубіцин проводили згідно [Dickens et al., 1996].

Концентрацію білку визначали за методом Лоурі [Lowry, 1951].

Утилізацію глюкози штамами актиноміцетів визначали ферментативним методом за допомогою діагностичного набору „Діаглюк” виробництва Львівського заводу лікарських препаратів.

Штами актиноміцетів обробляли ультрафіолетом (УФ), N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (НГ), N-етил-N-нітросечовиною, N-метил-N-нітросо-сечовиною (МНС), 5,8-динітробензпериленом за методиками [Norwood et al., 1985; Настасяк и др., 1990; Голец и др., 1995].

Виділення й аналіз ауксотрофних мутантів актиноміцетів та мутантів з порушеннями біосинтезу антибіотиків проводили за методиками [Norwood et al., 1985; Kieser et al., 2000], а здатність мутантів до косинтезу антибіотиків перевіряли за методам [Weber et al., 1985]. Мутанти актиноміцетів зі зміненою стійкістю до антибіотиків виділяли за методами, описаними в роботах [Федоренко, Даниленко, 1980; Настасяк и др., 1990, Заворотная и др., 1990]. Мутанти актиноміцетів, стійкі до 2-дезоксид-глюкози, виділяли за методом [Hodgson, 1982].

Виділення, регенерацію та злиття протопластів актиноміцетів проводили за методами [Norwood et al., 1985; Kieser et al., 2000]

Кон'югаційні схрещування актиноміцетів, їх схрещування за допомогою злиття протопластів та аналіз отриманих рекомбінантів проводили за методиками [Norwood et al., 1985; Kieser et al., 2000].

Кон'югаційні схрещування між *E. coli* та штамами *Streptomyces* проводили згідно методики, описаної в роботі [Лужецький та співавт., 2000].

Трансформацію протопластів актиноміцетів виконували за методикою [Norwood et al., 1985; Kieser et al., 2000].

Отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформацію проводили за методикою [Sambrook et al., 1999].

Генно-інженерні маніпуляції з ДНК (виділення сумарної та плазмідної ДНК, електрофорез ДНК в агарозному гелі та елюювання фрагментів ДНК, рестрикційний аналіз ДНК та обробку ДНК фрагментом Кленова, лужною фосфатазою та Т4-ДНК-полімеразою а також лігування ДНК-лігазою фага Т4, ДНК-ДНК гібридизацію, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), визначення послідовності нуклеотидів у ДНК проводили згідно методик [Norwood et al., 1985; Kieser et al., 2000; Sambrook et al., 1999]. Пульс-електрофорез хромосомної ДНК штамів *S. kanamyceticus* проводили, як описано в роботі [Федоренко и др., 1998]. Аналіз нуклеотидних та ймовірних амінокислотних послідовностей виконували за допомогою комп'ютерних програм BLAST 2.0, CODONPREFERENCE, REFLECTION, NEBCUTTER, TRANSLATE, PILEUP BOXSHADE та CLUSTAL W [Altschul et al., 1997].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми STATGRAFIC та електронних таблиць Microsoft Excel 2000. Кореляційний аналіз виконували, як описано [Жукова и др., 1978; Лакин, 1980].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Генетичний контроль стійкості до антибіотиків та його вплив на антибіотикоутворення в актиноміцетів – продуцентів полікетидів. Визначено спектри та рівні стійкості до антибіотиків 16 штамів актиноміцетів - продуцентів полікетидних антибіотиків актинородину (*S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* 66), макролідів (*Sacch. erythraea* NRLL2338, *S. ambofaciens* ATCC23877, *S. fradiae* B-45, *S. antibioticus* OL71), антрациклінів (*S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952, *S. peucetius* ATCC29050, *S. nogalater* IMET43360 та *S. galilaeus* НКІ022), ангуциклінів (*S. globisporus* 1912, *S. cyanogenus* S136 та *S. fradiae* Tu2717), тетрациклінів (*S. rimosus* 183, *S. aureofaciens* 019(8) та мітоміцину С (*S. caespitosus* IMET43411). Більшості з них властива природна стійкість як до власного, так і інших антибіотиків переважно у невисоких концентраціях. Для кожного виду актиноміцетів характерний певний спектр множинної

антибіотикорезистентності. Виявлено спільні особливості спектрів резистентності, властиві для переважної більшості вказаних штамів. Вони стійкі до β -лактамних антибіотиків та поліміксину, помірно чутливі до тетрацикліну та макролідів. Найбільшу чутливість актиноміцети виявляють до аміноглікозидів, антрациклінів, тіострептону та ристоміцину. Великою є різниця між дослідженими штамми за стійкістю до рифампіцину (у 40 – 100 разів) та хлорамфеніколу (у 10 – 20 разів). Серед штамів виявлено як стійкі до високих концентрацій власного антибіотика (наприклад, *Sach. erythraea*), так і чутливі до власних антибіотиків (наприклад, *S. peucetius subsp.caesius*) (рис.1). У різних похідних одного виду, що отримані у результаті селекції на підвищену продукцію антибіотиків, або ж мутантів, що їх не синтезують, а також у морфологічних варіантів одного виду спостерігаються відміни у вияві ознак стійкості як до власного, так і до інших антибіотиків (різниця у рівнях стійкості, зміна конститутивного характеру вияву антибіотикорезистентності на індукцибельний). Це вказує на важливість індивідуального аналізу ознак резистентності до антибіотиків кожного з досліджуваних штамів актиноміцетів.

Показано, що для *S. coelicolor* A3(2) та *S. ambofaciens* характерна множинна зміна ознак резистентності до антибіотиків, асоційована з нестабільністю фенотипу природної хлорамфенікол-стійкості (Cml^R). Визначено особливості генетичної нестабільності ознак стійкості до антибіотиків у досліджених актиноміцетів. Мутанти за однією ознакою (хлорамфенікол-чутливі, Cml^S) та Cml^SRmn^S –мутанти (чутливі також й до ристоміцину) можуть виявлятися з близькими частотами. Незалежні Cml^S - та Cml^SRmn^S -мутанти значно різняться між собою за рівнем чутливості до антибіотиків та частотою утворення резистентних ревертантів. У ревертантів повернення до вихідного фенотипу резистентності не спостерігається (Cml^{R*} -фенотип). У спонтанних Cml^S -мутантів *S. coelicolor* A3(2) підвищена нестабільність зчепленого детермінанта стійкості до ристоміцину (мутанти Cml^SRmn^S виникають з частотою 5-7%). Це властиве й для Cml^{R*} -ревертантів. Нестабільність може виявлятися також й в появі з високою частотою спонтанних мутантів із підвищеною стійкістю, які отримуються за допомогою ступінчастого відбору на середовищах із зростаючими концентраціями антибіотика. Опромінення ультрафіолетом (УФ) індукує нестабільність генетичного детермінанта хлорамфенікол-резистентності *S. coelicolor* A3(2). У присутності кофеїну – інгібітора систем репарації бактерій, схильних до помилок [Coyne et al., 1984; Hromic, Kirby, 1989] значно знижується частота появи Cml^S -мутантів. Ці факти свідчать про те, що системи репарації УФ-пошкоджень можуть бути складовою частиною механізмів генетичної нестабільності актиноміцетів. Отримано дані про стабілізацію рівня синтезу спіраміцину в Cml^R -мутантів і перспективність їх використання у селекції *S. ambofaciens*.

Рестрикційний аналіз сумарної ДНК дозволив виявити в геномах Cml^{R*} -мутантів *S. coelicolor* A3(2) (наприклад *cmIR103*, рис.2) дві послідовності, здатні до ампліфікації: AUD-ScI (близько 15 т.п.н. та 50 копій на геном) й AUD-ScII (близько 20 т.п.н. та 40 копій на геном). Вісім

ампліфікованих послідовностей ДНК розміром від 2,8 до 25 т.п.н. виявлено в геномах штамів *S.ambofaciens*. Ці дані показують, що нестабільність ознак резистентності актиноміцетів до антибіотиків може супроводжуватися значними перебудовами їхніх геномів.

Отримано та охарактеризовано великі колекції мутантів продуцента еритроміцину *Sacch. erythraea*, стійких до рифампіцину, хлорамфеніколу, тіострептону та стрептоміцину. Визначено частоти їх виникнення. Показано, що кожна з цих груп мутантів є гетерогенною за рівнем стійкості до вказаних антибіотиків (рис.3). Значна частина вивчених мутантів мають зміни інших ознак, що, очевидно, є виявом плейотропного ефекту *rif*-, *cml*-, *tsr*- та *str*- мутацій. Показано, що *rif*- та *cml*- мутації мають хромосомну локалізацію: *rifR5* та *rifR8* - між маркерами *ura1* і *phe1*, а *cmlR45* – між *ura1* та *met1*. У той же час зростання стійкості *Sacch.erythraea* до стрептоміцину корелює із ампліфікацією плазмиди *pSE201*. Серед кожної групи мутантів виявлена значна частка таких, що перевищують вихідний штам за рівнем синтезу еритроміцину. Найкращим є відбір *Rif^R*-мутантів, індукованих НГ, на середовищі з 10 мкг/мл антибіотика. За цих умов досягається максимальні середній рівень (\bar{X}) синтезу еритроміцину (126,7±5,9% до рівня синтезу у вихідного штаму *Sacch. erythraea* 5) та частка (11,3%) „плюс”-варіантів з рівнем синтезу, вищим від $\bar{X} + 2\sigma$. Порівняно з окремими клонами штаму 5, незалежні *Str^R*-мутанти мають вищий (на 22,7%) середній рівень біосинтезу. Значно зросла (на 12%) частка "плюс"-варіантів серед *Str^R*-мутантів. 57% досліджених *Cml^R*-мутантів (стійкі переважно до 20-40 мкг/мл хлорамфеніколу) синтезують більше еритроміцину, ніж вихідний штам. Натомість найвищий середній рівень синтезу еритроміцину (140,6±8,9%) та найбільша частка „плюс”-варіантів (20,0%) спостерігається у спонтанних *Tsr^R* – мутантів, відібраних на середовищі з 2,5 мкг/мл тіострептону (табл.1).

Це свідчить, що отримання *Rif^R*-, *Cml^R*-, *Tsr^R*- та *Str^R*- мутантів може бути одним з етапів селекції *Sacch. erythraea*. Лише певні класи стійких мутантів перспективні для селекції. Важливе значення має те, що відбір таких резистентних мутантів ефективний стосовно тих продуцентів еритроміцину, які вже проходили численні мутагенні обробки та етапи селекції на підвищений синтез антибіотика, як, наприклад, штам *Sacch. erythraea* 5. Фенотипи *Cml^R*-, *Tsr^R*- та *Str^R* є нестабільними. Існує кореляція між втратою у неселективних умовах ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та підвищеного синтезу еритроміцину. Визначені умови підтримуючої селекції *Rif^R*-, *Cml^R*-, *Tsr^R*- та *Str^R* – мутантів з високим рівнем синтезу антибіотика.

Виділено та вивчено колекцію мутантів продуцента даунорубіцину та доксорубіцину *S. peucetius subsp.caesius*, стійких до власних антибіотиків. Серед них є мутанти, що перевищують вихідний штам за рівнем біосинтезу антибіотиків, а також й такі, в яких змінений спектр утворюваних антрациклінів. Отримані дані свідчать про можливість використання мутантів,

Мінливість рівня синтезу еритроміцину у мутантів *Sacch. erythraea*, стійких до тіострептону

Конц. тіострептон у середовищі для відбору мутантів, мкг/мл	Обробка НГ	Середній рівень синтезу антибіотику ($\bar{X} \pm S_x$), %	Середнє квадратичне відхилення (σ)	Коефіцієнт варіації (CV),%	Частка, %	
					“плюс”-варіантів, $>(\bar{X} + 2\sigma)$	“мінус”-варіантів, $<(\bar{X} - 2\sigma)$
Контроль	–	100,0	3,9	36,1	0,9±0,02	0,3±0,03
Контроль	+	88,1±3,0	4,0	40,6	2,9±0,8	16,2±3,5
2,5	–	140,6±8,9	3,8	26,7	20,0±3,7	0
2,5	+	113,9±2,9	3,6	31,3	3,2±0,4	1,9±0,1
5,0	+	125,7±6,9	3,2	25,8	4,0±0,9	0

стійких до даунорубіцину (Dnr^R) і доксорубіцину (Dxr^R), у селекції *S. peucetius subsp. caesius*. Встановлено, що серед Dnr^R -мутантів доцільно вести пошук штамів із підвищеною продукцією доксорубіцину, а Dxr^R -мутанти перспективні для відбору продуцентів обох антибіотиків.

2. Клонування і вивчення кластера генів біосинтезу ландоміцину E *S. globisporus* 1912.

Для конструювання геномної бібліотеки *S. globisporus* 1912 його сумарну ДНК піддали частковому розщепленню ендонуклеазою рестрикції BamHI. Отримані фрагменти клонували у вектор λ Gem11, а рекомбінантні ДНК пакували *in vitro* у фагові частинки, якими інфікували штам *E. coli* KW251. Скринінг бібліотеки за допомогою гібридизації з зондом (250 п.н., отриманий як продукт ПЛР - фрагмент гена β -кетоацилсинтази *S. globisporus* 1912), „прогулянки” по хромосомі та „short-gun” – секвенування дозволили виявити кластер генів біосинтезу ландоміцину E (Ind-генів). У ньому ідентифіковано 30 генів та визначені їх ймовірні функції (рис.4). Виходячи з даних множинного порівняння нуклеотидних послідовностей, ми припустили, що гени мінімальної ПКС IndA, IndB, IndC та ген голо-АПБ-синтази IndZ6 контролюють синтез лінійного полікетидного ланцюга. Гени IndF та IndL кодують полікетидциклази, що забезпечують згортання та циклізацію полікетиду. Гени редуктаз IndD, IndN, IndO, IndV, IndZ4 контролюють відновлення ландоміцинону. Гени оксигеназ IndE, IndM та IndZ5 контролюють окиснення циклізованого попередника ландоміцинону, а гени

IndG, IndH, IndQ, IndR, IndS, IndT, IndZ1 та IndZ3 кодують білки біосинтезу дезоксицукрів. Приєднання цукрів до ландоміцинону контролюється генами IndGT1, IndGT2, IndGT4. Ген IndJ кодує ймовірний детермінант стійкості до ландоміцину E, а IndI – транскрипційний активатор Ind-генів. Ген IndP кодує декарбоксілазу, що може брати участь у декарбоксілюванні залишків малоніл-КоА під час кетосинтазної реакції, або відщепленні карбоксильної групи ландоміцинону. Роль генів IndU та IndX у синтезі ландоміцину не зрозуміла. Кластер фланкований генами *tmk1*, *prx1*, *stk1*, які, очевидно, беруть участь у процесах первинного метаболізму. Повністю секвеновані гени IndI, IndF, IndM і IndGT4. Ген IndI ідентифікований як ORF розміром 783 п.н. Його ймовірний продукт IndI подібний до ряду білків - транскрипційних регуляторів, що входять до родини SARP. У мутантів *S. globisporus* LND900 та LND901 із делеціями, що захоплюють ген IndI, повністю припиняється синтез антибіотика. Крім того, спрямована його інактивація має такий самий ефект, а комплементация отриманих мутантів клонованим IndI або ж його гомологом *lanI* з *S. cyanogenus* S136 відновлює біосинтез. Ген IndF локалізований між генами IndE та IndA як *orf* завдовжки 330 п.н. Його продуктом є циклаза 3-го та 4-го кілець ландоміцинону. Виявлено дуже висока подібність (більше 80%) білка IndF до гомологічних циклаз, задіяних у біосинтезі інших ангуциклічних антибіотиків. Стартовий кодон гена IndM (ATG) відділений від стоп-кодону гена IndL лише 1 п.н. Перший “стоп”-кодон у рамці зчитування (TGA) локалізований на віддалі 1539 п.н. у 3’-напрямі від ініціаторного кодону. З результатів множинного порівняння з генами інших оксигеназ впливає, що його продукт гідрокслює карбон C6 третього кільця попередника ландоміцинону. Кодуюча частина гена IndGT4 розпочинається “старт”-кодомом ATG, якому передують ймовірний рибосомозв’язуючий сайт (AGAA), за 5 п.н. до “старт”-кодону. Перший “стоп”-кодон у рамці зчитування (TGA) локалізований на віддалі 1251 п.н. в 3’-напрямі від ініціаторного кодону. Продуктом гена є родинозил-трансфераза, що каталізує приєднання залишку L-родинози під час синтезу ландоміцину E. Цей висновок підтверджений даними отриманими за допомогою заміщення гена IndGT4 на його мутантний алель IndGT4::*aadA* (*aadA* - ген стійкості до спектиноміцину). На основі кон’югативної інтегративної плазмиди pSET152 розроблена векторна система для заміщення чи інсерційної інактивації генів Ind-кластера. Сконструйовано плазмиду pNKN, що містить дві ділянки гомології до Ind-генів розміром по 2,7 т.п.н., які оточують ген канаміцин-стійкості *aphII*. Цю плазмиду перенесли у штаб *S. globisporus* та виділили похідні із заміщенням гена IndA на *aphII*. Це призвело до припинення синтезу ландоміцину E. У такий спосіб отримано прямі докази участі клонованого кластера у контролі біосинтезу ландоміцину E (рис.5).

3. Генетичне та генно-інженерне конструювання актиноміцетів – продуцентів полікетидів. Результати, наведені вище, дозволили розробити ряд генетичних та генно-інженерних підходів до конструювання актиноміцетів – продуцентів полікетидів, які були об’єктами нашого дослідження. До них належать: а) отримання генетичних рекомбінантів *Sacch. erythraea* з

підвищеним рівнем синтезу еритроміцину за допомогою злиття протопластів; б) виділення та використання у селекції продуцента доксорубіцину *S. peucetius subsp. caesius* мутантів з порушеною глюкозною репресією; в) отримання штамів *S. peucetius subsp. caesius* з підвищеною здатністю до перетворення даунорубіцину в доксорубіцин; г) виділення штамів *S. globisporus* - продуцентів нових ландоміцинів за допомогою спрямованого руйнування певних генів їхнього біосинтезу.

Ми порівняли утворення генетичних рекомбінантів у кон'югаційних схрещуваннях та після злиття протопластів двох штамів *Sacch. erythraea*: 1346 *leu1 ura1* та 2407 *met1 trp3 phe1*. Частота гаплоїдних рекомбінантів, отриманих у кон'югаційних схрещуваннях, варіює від $(6,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ до $(2,1 \pm 0,5) \times 10^{-3}$. Частота рекомбінантів усіх виділених класів, які виникли внаслідок злиття протопластів, значно вища (в 10 - 460 разів для різних класів рекомбінантів), порівняно з кон'югацією. Більшою є й різноманітність їхніх генотипів. Як генетичні маркери для схрещування штамів *Sacch. erythraea*, які вже пройшли селекцію на підвищений синтез еритроміцину, ми використали мутації стійкості до антибіотиків рифампіцину (*rif*), тіострептонону (*tsr*) та стрептоміцину (*str*). Показано, що злиття протопластів та відбір рекомбінантів, що поєднують *rif*-, *str*- та *tsr*-мутації є ефективним методом селекції штамів *Sacch. erythraea* з підвищеним рівнем синтезу еритроміцину. Найбільша мінливість за рівнем синтезу еритроміцину спостерігається серед рекомбінантів, отриманих після злиття протопластів мутантів, що походять від штамів, які пройшли незалежну селекцію – *strR31* та *rifR621*. Серед них й найбільша частка клонів із високим рівнем ($\geq 180\%$ від контролю) синтезу еритроміцину - 40%.

Ріст продуцента доксорубіцину *S. peucetius subsp. caesius* ATCC 27952-2 пригнічується у присутності 2% глюкози в повноцінних середовищах, що містять альтернативні джерела вуглецю. Виділені та досліджені мутанти цього штама, здатні рости в повноцінних середовищах з 2% глюкози (*glr*-мутанти). Ці мутанти утилізують глюкозу повільніше, ніж вихідний штам, а біосинтез антрациклінів у них менше підлягає глюкозній репресії. Показано, що виділення *glr*-мутантів може бути одним з етапів селекції *S. peucetius subsp. caesius*, скерованої на підвищений синтез антрациклінів.

Отримані трансформанти та *S. peucetius subsp. caesius* ATCC 27952-2, що містять у висококопійній плазміді pIJ486 гени *dnrI* (гомолог гена - активатора біосинтезу антрациклінів у *S. peucetius*) та *srx* (гомолог гена *doxA* *S. peucetius*, що кодує цитохром P450-вмісну гідроксилазу даунорубіцину) з іншого продуцента антрациклінів *S. griseus* IMET3339. Ці трансформанти синтезують більше антрациклінів та мають підвищену здатність до перетворення екзогенного даунорубіцину в доксорубіцин. Така здатність властива також й *Dnr^R*-мутантам *S. peucetius subsp. caesius*. Показано, що ці мутанти, як й трансформанти pIJ486 *dnrI**srx*⁺, можуть використовуватися для перетворення даунорубіцину у більш цінний у терапевтичному відношенні доксорубіцин.

На основі нереплікативного вектора рТНК сконструйована плазміда рТGT4.3, що несе зруйнований алель гена *IndGT4::aadA* (*aadA* – ген стійкості до спектиноміцину) та ділянки гомології, що його фланкують, розміром 4,7 та 4,4 т.п.н. За допомогою кон'югації рТGT4.3 ввели в клітини *S. globisporus* 1912 та виділили штам GT4.1 в якому ген *IndGT4* заміщений на його мутантний алель. Інактивація гена *IndGT4* зумовлює продукцію рекомбінантним штамом нових ландоміцинів F та H (містять, відповідно, моно- та дисахаридний залишки). Експресія генів *IndGT4* або *IanGT4* у мутанті GT4.1 призвела до продукції ландоміцину G (містить трисахаридний залишок) (рис.6). У цих сполуках відсутня гідроксильна група у положенні C11. У 3'-напрямі від *IndGT4* розташовані гени редуктази *IndZ4*, гідроксилази *IndZ5* та голо-АПБ-синтази *IndZ6*. У комплементарних тестах з'ясовано, що експресія генів *IndGT4Z4Z5* є достатньою для відновлення синтезу мутантом GT4.1 ландоміцину E. Експресія генів *IndZ4Z5* в ньому відновлює синтез ландоміцину D (містить лише два залишки D-оливози). Експресія *IndZ5* у GT4.1 не змінює спектру синтезованих ним сполук. Отже, у мутанті GT4.1 пошкоджена експресія також й генів *IndZ4*, *IndZ5* (очевидно, за рахунок полярного ефекту мутації в *IndGT4*). Зроблено висновок, що ген *IndGT4* контролює приєднання залишку L-родинози, а гени *IndZ4Z5* – гідроксилювання першого кільця ландоміцинів. Ландоміцини G, F та H є першими ландоміцинами зі зміненим агліконом. Ці нові сполуки відрізняються за антибактерійними та протипухлинними властивостями від раніше відомих ландоміцинів. Проведені дослідження закладають основу для розвитку комбінаторного біосинтезу ландоміцинів та встановлення взаємозв'язків між їх структурою та біологічною дією.

Розроблені підходи доповнюють традиційні схеми селекції вказаних продуцентів і дозволяють більш раціонально проводити селекцію, враховуючи особливості генетичного контролю біосинтезу антибіотиків та стійкості продуцентів до них.

4. Генетичний контроль біосинтезу канаміцину та стійкості до аміноглікозидних антибіотиків (АГ) у *S. kanamyceticus*. Нами створено колекцію генетично маркованих штамів *S. kanamyceticus*, яка нараховує 43 мутанти, з яких 14 мають по два генетичних маркери ауксотрофності та стійкості до антибіотиків рифампіцину, еритроміцину та гентаміцину. Це дозволило розпочати генетичний аналіз *S. kanamyceticus*. Для ідентифікації генів, які контролюють біосинтез канаміцину, отримані мутанти *S. kanamyceticus* з порушеннями цього процесу (Kan^-). Проаналізовано 19555 незалежних клонів *S. kanamyceticus*, що пройшли різні мутагенні обробки та виділено 44 Kan^- -мутанти. Їх розділили на три групи: 1) нестабільні мутанти (65% від загальної кількості отриманих), які у наступних генераціях розщеплюються, утворюючи Kan^- та Kan^+ -клони; 2) мутанти, які починають синтезувати незначні кількості канаміцину (до 24 мкг/мл) на 8-12 добу, на відміну від вихідної культури, яка починає продукувати його на 3-4 добу (10%); 3) стабільні Kan^- -мутанти (25%). За результатами тестів на косинтез Kan^- -мутанти віднесено до 4 груп: *kanA* (I

група), *kanB* (II група), *kanC* (III група), *kanD* (IV група). У всіх досліджених парах *kanD*-мутанти є секреторами, тобто шлях біосинтезу канаміцину у них пошкоджений на пізніших етапах, ніж у їхніх партнерів. Мутанти *kanC* є секреторами для мутантів I і II груп, *kanB* - для мутантів I групи. Мутанти *kanA* виступають як конвертори стосовно всіх інших *Kan^r*-штамів. У них порушені більш ранні етапи біосинтезу антибіотика, ніж в інших мутантів. Біосинтез канаміцину відновлюється у мутантів *kanB781*, *kanC782*, *kanB47*, якщо додавати у середовище 2-дезоксистрептамін (2-ДОС), а у *kanA472* і *kanA106* - D-глюкозамін. У решти штамів біосинтез канаміцину не відновлюється після додавання обох попередників. У цих мутантів пошкоджені стадії біосинтезу після утворення 2-ДОС. Хроматографічний аналіз показав, що стабільні *Kan^r*-штами дійсно не продукують канаміцину А. Мутант *kanC782* не синтезує 2-ДОС, тоді як *kanB47* і *kanA106*, утворюють його у слідових кількостях. Мутанти *kanD131*, *kanD581* і *kanD38* синтезують в 1,7 - 2,4 разів більше 2-ДОС, ніж штам дикого типу 1375. Отже, нагромаджуючи 2-ДОС, вони не здатні перетворювати його у метаболіти, що володіють антибіотичною активністю. Підтверджено висновок про те, що *Kan^r*-фенотип мутанта *kanA106* зумовлений порушенням синтезу D-глюкозаміну. На відміну від усіх досліджених *Kan^r*-штамів, у культуральній рідині мутанта *kan7* не виявлено D-канозаміну. На основі отриманих результатів ідентифіковано п'ять класів мутацій, які виникли в генах, що контролюють продукцію канаміцину (рис.7). Мутації *kanA* порушують здатність культури синтезувати D-глюкозамін, *kanB* та *kanC* – 2-ДОС, *kanD* - перетворювати 2-ДОС у метаболіти, що мають антибіотичну активність, ймовірно, паромамін, а *kanG* – синтезувати D-канозамін.

Виділені та вивчені мутанти *S. kanamyceticus* зі зміненою регуляцією біосинтезу канаміцину джерелами вуглецю. Штам *S. kanamyceticus* 1, якому властивий підвищений синтез антибіотика та мутант *dgr1*, стійкий до 2-деокси-D-глюкози, використовують глюкозу з поживного середовища повільніше, ніж низькопродуктивний штам 1375. Біосинтез канаміцину у штама 1 менше підлягає глюкозній репресії, ніж у штаму дикого типу 1375. Такі ж властивості, але більшою мірою, властиві мутанту *dgr1*, який, як й штам 1, має високий рівень синтезу антибіотика. Ці дані свідчать про перспективність використання мутантів із порушеною катаболітною репресією у селекції штамів *S. kanamyceticus* з підвищеним синтезом канаміцину (рис.8)

У *S. kanamyceticus* не виявлено природних систем генетичного обміну. Ми отримали рекомбінанти *S. kanamyceticus* за допомогою злиття протопластів. Визначено оптимальні умови утворення та регенерації протопластів 6 штамів цієї культури – вирощування їхнього міцелію протягом 60 год у середовищі ST або STM з 0,1-1% гліцину, використання 2% лізоциму для лізису міцелію та середовища R2YE для регенерації протопластів. Частоти утворення гаплоїдних рекомбінантів після злиття протопластів коливалися від $0,4 \cdot 10^{-4}$ до $6,7 \cdot 10^{-3}$. Проаналізовані схрещування: 1) 781met10 *cys2 kanB781* × 92 *ade1 eryR1* (232 гаплоїдні рекомбінанти, що належать

до 10 генотипових класів); 2) 781met10 cys2 kanB781 Ч 21ilv1 genR1 (241 рекомбінант, 11 класів); 3) 131his1 tyr1 kanD131 × 4thr1 rifR1 (176 рекомбінантів, 10 класів). Аналіз рекомбінації між маркерами та сегрегації неселективних алелів дозволив встановити їх взаємне розташування на генетичній карті. Спостерігається позитивна кореляція між сегрегацією маркерів kan та ecy⁺ ($r_A=0,75$), kan та rif⁺ ($r_A=0,80$), kan та gen⁺ ($r_A=0,70$). Отримані дані вказують на зчепленість мутацій kanB781 та kanD131, що порушують синтез канаміцину, з мутаціями стійкості до еритроміцину, гентаміцину та рифампіцину.

Штами *S. kanamyceticus* 1375 (дикий тип), 1 (з підвищеним синтезом канаміцину) та 5 Kan⁻ мутантів досліджені за ознаками стійкості до антибіотиків. Їх резистентність до канаміцину є значно вищою, ніж до інших АГ. Рівень АГ-стійкості штамів корелює з рівнем синтезу антибіотика та є найвищим у штаму 1. Резистентність *S. kanamyceticus* до канаміцину зростає під час росту культури в повноцінних середовищах за умов, сприятливих для біосинтезу антибіотика. Екзогенні АГ у концентраціях 10-250 мкг/мл не викликають індукції стійкості *S. kanamyceticus* до АГ. Не виявлено глюкозної репресії вияву ознак резистентності штамів *S. kanamyceticus* до АГ. Водночас мутанти з порушеною глюкозною репресією більш чутливі до АГ, ніж вихідний штам 1375.

Створено колекцію АГ-резистентних мутантів *S. kanamyceticus* 1, індукованих МНС. Вона нараховує 115 штамів, відібраних як канаміцин-стійкі (Kan^R), 105 – як неоміцин-стійкі (Neo^R), 100 – як гентаміцин-стійкі (Gen^R) та 90 - як апраміцин-стійкі (Apr^R) мутанти. Незалежно від способу відбору всі досліджені мутанти мають збільшену перехресну резистентність й до інших АГ, зокрема, до канаміцину. Стійкість до гентаміцину Gen^R-мутантів є конститутивною. Порівняно з штамом 1 у мутантів змінений вияв стійкості до АГ залежно від концентрації глюкози у середовищі. Варіабельність рівня синтезу канаміцину у Gen^R-, Neo^R-, Apr^R-мутантів вища, ніж у клонів штаму 1, отриманих після обробки МНС без відбору за ознакою резистентності до АГ. Для Gen^R-штамів, на відміну від інших груп АГ-резистентних мутантів, характерний найвищий середній рівень синтезу канаміцину (108,2% від рівня штаму 1), найбільша частка (60,6%) таких, що синтезують більше антибіотика, ніж вихідний штам 1, а також "плюс"-варіантів (9,5%). Досліджені АГ-резистентні мутанти відрізняються від штаму 1 динамікою біосинтезу канаміцину.

Ген канаміцин-резистентності з штаму *S. kanamyceticus* 1 та його Gen^R-мутанта genR10 був клонований у висококопійному векторі pIJ702 у *S. lividans* 66. У результаті отримали два штам *S. lividans* з рекомбінантними плазмідами: а) pIJK12, що несе фрагмент ДНК штаму 1; б) pIJG31 - ДНК genR10. Рестрикційне картування показало, що обидві плазміди містять гомологічні гени, позначені як kmrB, у ділянках ДНК розмірами 4,2 та 6,1 т.п.н., відповідно (рис.9). Ген kmrB зумовлює стійкість до канаміцину, гентаміцину, тобраміцину та сизоміцину (табл.2) За рівнем

АГ-резистентності трансформанти перевищують штам-донор *S. kanamyceticus* 1. Секвенування гена *kmrB* показало, що він складається з 831 п.н. (стартовий кодон – АТГ, термінуючий кодон – ТГА). Стартовому кодону передуює потенційна RBS – послідовність (GAGGA), комплементарна 3'-кінцю 16S рРНК *S. lividans*. Частка G+C пар у першій, другій та третій позиціях кодонів у гені становить, відповідно, 70, 52 та 92%. Ймовірним продуктом гена *kmrB* є метилаза 16S рРНК, оскільки він має високий рівень гомології з відомими генами метилаз з інших актиноміцетів – продуцентів АГ. Порівняння ймовірної амінокислотної (ак) послідовності продукту гена *kmrB* із вже відомими білками показало, що найвищий ступінь гомології є з метилазою 16S рРНК продуцента небраміцинового комплексу *S. tenebrarius* (ступінь ідентичності ак-послідовностей становить 53,9%, а подібності - 77,9%). Спостерігається подібність визначеної ймовірної ак-послідовності з метилазами 16S рРНК інших актиноміцетів - продуцентів АГ. Експерименти з ДНК-ДНК гібридизації за Саузерном клонованого гена *kmrB* та сумарної ДНК різних штамів *S. kanamyceticus* виявили ампліфікації ділянки ДНК, що містить ген *kmrB*, у геномі мутантів *genR10*, *genR8*, *genR8.1*. Рівні ампліфікації та рівні стійкості корелюють. Ампліфікація гена *kmrB* виявлена також й в одного з нестабільних Kan^r -мутантів - *kan12* (рис.10). Отже, однією з причин підвищеної резистентності мутантів *S. kanamyceticus* до АГ є ампліфікація гена *kmrB*. Ділянки ДНК, що оточують цей ген, мають гомологію з фрагментами сумарної ДНК продуцента неоміцину *S. fradiae* та продуцента сизоміцину *Micromonospora zionensis*.

Проведено аналіз макрофрагментів хромосомної ДНК 5 штамів *S. kanamyceticus* за допомогою пульс-електрофорезу. Показана доцільність використання протопластів *S. kanamyceticus* у приготуванні препаратів ДНК для пульс-електрофорезу. Ідентифіковані 16 *AseI*- та 12 *DraI*-фрагментів хромосомної ДНК штаму 1, розміри яких коливаються від 40 до 1800 т.п.н. Розміри хромосомної ДНК вивчених штамів *S. kanamyceticus* становлять від 7715 до 8217 т.п.н.. Виявлені перебудови нуклеотидних послідовностей у хромосомах мутантів *kan12*, *genR8* та *genR10*. Порівняно з ДНК вихідного штаму 1 у *kan12* відсутні два *AseI*-фрагменти – D (98 т.п.н.) та J (220 т.п.н.), натомість є фрагменти J'(297) та K'(450 т.п.н.). У мутантів *genR10* та *genR8* відсутній фрагмент K (420 т.п.н.), але з'являється фрагмент K'. У мутантів *kan12*, *genR10* та *genR8* більші розміри хромосомної ДНК (8217 та по 7818 т.п.н., відповідно), порівняно з штамом 1 (7788 т.п.н.), що узгоджується з даними про ампліфікацію в них гена *kmrB*. Ці результати є вихідними для подальшого фізичного картування хромосоми *S. kanamyceticus*, а також вивчення механізмів нестабільності генома цієї культури.

Стійкість штамів-донорів *S. kanamyceticus* та штамів-реципієнтів *S. lividans* до аміноглікозидних антибіотиків

Штам	Плазм-мі да	Концентрація антибіотика у середовищі, до якої стійкий штам, мкг/мл							
		Km	Gm	Tm	Sn	Nm	Ap	Sm	Pm
<i>S. kanamyceticus</i> 1	-	100	2	15	5	50	<1	10	2
genR10	-	1000	100	40	100	50	<1	5	5
<i>S. lividans</i> 66	-	<5	2	10	5	<10	<1	2	<2
<i>S. lividans</i> 66	pIJ702	<5	<2	10	5	10	<1	2	<2
<i>S. lividans</i> 66	pIJK12	1000	100	20	100	<10	<1	<2	2
<i>S. lividans</i> 66	pIJG31	>1000	>100	40	>100	<10	<1	<2	<2

Примітка: Km -канаміцин, Gm-гентаміцин, Tm-тобраміцин, Sn-сизоміцин, Nm-неоміцин, Ap-апраміцин, Sm-стрептоміцин, Pm-паромоміцин.

Спроби трансформувати протопласти штаму *S. kanamyceticus* 1 та його мутантів за допомогою ДНК плазмід pIJ702, pWHM4, pTO1 та pSET152 виявилися невдалими. Тому ми розробили систему пренесення ДНК реплікативних (pSOK101, pSOK201 та pCHZ101) та інтегративних (pSET152 та pVWB) плазмід у *S. kanamyceticus* за допомогою кон'югаційних схрещувань з *E. coli* ET12567(pUB037). Частота появи транскон'югантів, що містили перелічені вище плазмиди становила від $2,2 \times 10^{-5}$ до $2,5 \times 10^{-4}$. Інтегративні плазмиди pSET152 (з геном інтегрази та attP-сайтом фага ϕ C31) та pVWB (з геном інтегрази та attP-сайтом фага VWB) успадковувались у неселективних умовах з ефективністю 100%. За таких умов менше 20% клонів успадковували реплікативні плазмиди. Спостерігається пригнічення синтезу канаміцину у pSET152⁺-транскон'югантів. Якщо ж використовувати вектор pVWB з відмінною системою інтеграції у хромосому, то синтез антибіотика в екскон'югантів є на рівні вихідного штаму. Досліди з гібридизації фрагментів сумарної ДНК pSET152⁺-екскон'югантів з міченим PstI-фрагментом pSET152 (800 п.н.) показали, що в хромосомі *S. kanamyceticus* є два сайти інтеграції цієї плазмиди (attB1 та attB2). Клоновано та секвеновано ділянки хромосоми *S. kanamyceticus*, що прилягають до цих сайтів. У них виявлено 4 ORF, з яких одна – ORF1, ймовірним продуктом якої є білок, що бере участь у конденсації хромосоми штаму, зруйнована інтеграцією pSET152. Розроблена система пренесення реплікативних та інтегративних векторів у *S. kanamyceticus* та дані про сайти інтеграції

pSET152 у хромосому дозволяють застосовувати методи генної інженерії для вивчення та конструювання *S. kanamyceticus*.

Виконаний комплекс досліджень *S. kanamyceticus* - одного з найважливіших промислових стрептоміцетів, дозволяє застосувати до нього сучасні генетичні та генно-інженерні підходи і розробити на цій основі раціональні підходи до його конструювання й селекції, а також використовувати його як модель для вивчення інших актиноміцетів, що утворюють 2-дезоксистрептамінові аміноглікозидні антибіотики.

ВИСНОВКИ

У результаті виконаної роботи встановлено закономірності генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків та вивчено вплив генетичних детермінантів антибіотикорезистентності на біосинтез полікетидних антибіотиків еритроміцину в *Sacch. erythraea*, спіраміцину в *S. ambofaciens*, даунорубіцину та доксорубіцину в *S. peucetius subsp. caesius*, а також аміноглікозидного антибіотика канаміцину в *S. kanamyceticus*. Обґрунтовано перспективність використання мутацій, що змінюють стійкість актиноміцетів до антибіотиків у селекції штамів з підвищеним синтезом антибіотиків. Показано, що ознаки природної стійкості до антибіотиків можуть розглядатися як модельні для вивчення генетичної нестабільності актиноміцетів а їх виявлення та аналіз є необхідною складовою частиною конструювання та селекції цих бактерій. На основі отриманих результатів опрацьовано підходи до селекції високоактивних продуцентів антибіотиків та створено Колекцію культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ ім.І.Франка, що включена до Державного реєстру об'єктів, що становлять національне надбання.

Головні наукові та практичні результати викладені у таких висновках:

1. Дослідженням штамам актиноміцетів - продуцентам полікетидних антибіотиків та канаміцину властива природна стійкість як до власного, так і інших антибіотиків. Для кожного виду актиноміцетів характерний відмінний спектр множинної антибіотикорезистентності. У різних похідних одного виду, що отримані у результаті селекції на підвищену продукцію антибіотиків, або ж мутантів, що їх не синтезують, а також у морфологічних варіантів одного виду спостерігаються відміни у вияві ознак стійкості як до власного, так і до інших антибіотиків.

2. Охарактеризовано спонтанні та індуковані мутагенами множинні зміни ознак резистентності досліджених штамів актиноміцетів до антибіотиків. У геномі нестабільних мутантів *S. coelicolor* A3(2) та *S. ambofaciens* виявлено й охарактеризовано послідовності ДНК, здатні до ампліфікації.

3. Отримано та вивчено колекції мутантів продуцента еритроміцину *Sacch. erythraea*, стійких до рифампіцину, хлорамфеніколу, тіострептону та стрептоміцину, мутантів продуцента даунорубіцину та доксорубіцину *S. peucetius subsp. caesius*, стійких до власних антибіотиків, а також мутантів *S. kanamyceticus*, стійких до аміноглікозидних антибіотиків. Кожна з груп мутантів є гетерогенною за рівнем стійкості до вказаних антибіотиків, а у значної їх частини змінені інші ознаки, зокрема, синтез антибіотиків.

4. Створено бібліотеку генома продуцента ландоміцину *E. S. globisporus* 1912, клоновано та частково секвеновано кластер генів біосинтезу ландоміцину *E.* У кластері виявлено 30 генів та визначено ймовірні функції 28 з них. Гени *IndE*, *IndF*, *IndA*, *IndB*, *IndC*, *IndD*, *IndL*, *IndM*, *IndN*, *IndO*, *IndP*, *IndV*, *IndZ4*, *IndZ6*, *IndZ5* контролюють синтез полікетидної частини ландоміцину *E.*, *IndG*, *IndH*, *IndQ*, *IndR*, *IndS*, *IndT*, *IndZ1*, *IndZ3* – синтез дезоксицукрів, *IndGT2*, *IndGT1*, *IndGT4* – їхнє приєднання до аглікону, ген *IndJ* є імовірним детермінантом стійкості до ландоміцину *E.*, а *IndI* – регулятором структурних *Ind*-генів.

5. Отримано і досліджено колекцію мутантів *S. kanamyceticus*, в яких порушені різні етапи біосинтезу канаміцину та ідентифіковано п'ять класів мутацій генів, що контролюють утворення канаміцину (*kanA*, *kanB*, *kanC*, *kanD* та *kanG*). Вперше продемонстровано генетичну рекомбінацію після злиття протопластів *S. kanamyceticus*. Показано зчепленість мутацій *kanB* та *kanD* з мутаціями стійкості до еритроміцину, гентаміцину та рифампіцину.

6. Із штаму *S. kanamyceticus* 1 та його мутанта *genR10* клоновано та секвеновано ген *kmrB*, що кодує ймовірну метилазу 16S рРНК та зумовлює стійкість до канаміцину, гентаміцину, сизоміцину та тобраміцину. Ділянки ДНК, що оточують ген *kmrB*, виявляють високий рівень гомології з фрагментами сумарної ДНК продуцента неоміцину *S. fradiae* та продуцента сизоміцину *M. zionensis*.

7. За допомогою аналізу макрофрагментів із використанням пульс-електрофорезу визначено розміри хромосомної ДНК п'яти штамів *S. kanamyceticus* - 7715-8217 т.п.н. Перебудови нуклеотидних послідовностей, а також ампліфікації гена *kmrB* виявлено у геномах нестабільного Kan^r - мутанта *kan12* та мутантів *genR8* та *genR10*, стійких до гентаміцину.

8. Створено систему клонування генів у штамх *S. kanamyceticus* та *S. globisporus* за допомогою кон'югаційного перенесення плазмід з *E. coli*. Показано ефективність розробленої системи для спрямованої інактивації *Ind*-генів *S. globisporus*.

9. Доведено, що отримання Rif^r -, Cml^r -, Tsr^r - та Str^r -мутантів *Sacch. erythraea*, Cml^r -мутантів *S. ambofaciens*, Dnr^r та Dxr^r –мутантів *S. peucetius subsp. caesius*, Gen^r -мутантів *S. kanamyceticus* може бути одним з етапів селекції відповідних штамів. Злиття протопластів та відбір рекомбінантів, що поєднують *rif*-, *str*- та *tsr*-мутації є ефективним методом селекції штамів *Sacch. erythraea*.

10. Показано, що у селекції *S. kanamyceticus* та *S. peucetius subsp.caesius* можуть використовуватися мутанти з порушеною глюкозною репресією.

11. Клонування генів *dnrI* та *srx* у *S. peucetius subsp.caesius* дозволяє виділити штами з підвищеною здатністю до перетворення даунорубіцину в доксорубіцин.

12. Спрямована інактивація гена *IndGT4* продуцента ландоміцину *E. S. globisporus* 1912 зумовлює продукцію нових ландоміцинів F та H, а комплементация генетичних порушень у ньому – синтез ландоміцину G. Нові ландоміцини мають змінені антибактерійні та протипухлинні властивості.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Федоренко В.А., Стародубцева Л.И., Заворотная С.А., Ломовская Н.В., Даниленко В.Н. Характеристика множественного изменения признаков устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Генетика.–1989.–Т.25. №4.–С.626-634.
2. Настасьяк И.Н., Федоренко В.А., Кириченко Н.В., Даниленко В.Н. Получение и характеристика рифампицин-устойчивых мутантов у *Streptomyces erythraeus* // Антибиот. и химиотер. – 1990. – Т.35,№12.-С.11-13.
3. Заворотная С.А., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Генетическая нестабильность признака стрептомицин-устойчивости у *Streptomyces erythraeus* // Антибиот. и химиотер. – 1990. – Т.35,№12.-С.18-21.
4. Заворотная С.А., Федоренко В.А., Стародубцева Л.И., Даниленко В.Н. Амплифицирующаяся последовательности в геноме *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Антибиот. и химиотер. – 1990. – Т.35,№12.-С.21-23.
5. Настасьяк И.Н., Заворотная С.А., Кириченко Н.В., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Получение и изучение свойств мутантов *Streptomyces erythraeus* с измененной устойчивостью к антибиотикам // Труды ВНИИА.-1992.-Вып.21.-С.39-45.
6. Кириченко Н.В., Настасьяк И.Н., Базилия Л.И., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Получение и характеристика генетических рекомбинантов при слиянии протопластов *Saccharopolyspora erythraea* // Антибиот. и химиотер. – 1993. – Т.38,№1.-С.24-28.
7. Кириченко Н.В., Настасьяк И.Н., Базилия Л.И., Захарова Г.М., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Использование слияния протопластов в селекции продуцента эритромицина *Saccharopolyspora erythraea* // Антибиот. и химиотер. – 1993. – Т.38,№6.-С.3-8.
8. Голец Л.М., Базилия Л.И., Мазепа А.И., Федоренко В.А. Получение и изучение свойств мутантов *Streptomyces kanamyceticus* с нарушениями биосинтеза канамицина // Антибиот. и химиотер. – 1995. – Т.40,№1.-С.3-7.

9. Голец Л.М., Демидчук Ю.А., Федоренко В.А. Биосинтез канамицина и резистентность к аминогликозидам у мутантов *Streptomyces kanamyceticus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе // Антибиот. и химиотер. – 1996. – Т.41,№6.-С.10-14.
10. Демидчук Ю.А., Голец Л.М., Федоренко В.А. Характеристика мутантов *Streptomyces kanamyceticus*, устойчивых к аминогликозидным антибиотикам // Антибиот. и химиотер. – 1996. – Т.41,№6.-С.15-20.
11. Голец Л.М., Есипов С.Е., Федоренко В.А. Метаболиты, образуемые мутантами *Streptomyces kanamyceticus* с нарушенным биосинтезом канамицина // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т.42,№4.-С.8-12.
12. Настасьяк И.Н., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Получение и характеристика мутантов штамма *Saccharopolyspora erythraea*, устойчивых к тиострептону // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т.42,№1.-С.7-11.
13. Настасьяк И.Н., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Локализация детерминантов устойчивости к рифампицину на генетической карте *Saccharopolyspora erythraea* // Антибиот. и химиотер. – 1997. – Т.42,№8.-С.14-20.
14. Федоренко В.А., Голец Л.М., Демидчук Ю.А., Крюгель Г. Анализ перестроек генома у мутантов *Streptomyces kanamyceticus* // Антибиот. и химиотер. – 1998. – Т.43,№4.-С.14-19.
15. Demydchuk J., Oliynyk Z., Fedorenko V. Analysis of a kanamycin resistance gene (k_{mr}) from *Streptomyces kanamyceticus* and a mutants with increased aminoglycoside resistance // J.Basic Microbiol. – 1998. – Vol.38, N4.- P.231-239.
16. Настасьяк И.Н., Заворотная С.А., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Получение и характеристика мутантов *Saccharopolyspora erythraea*, устойчивых в хлорамфениколу // Антибиот. и химиотер. – 1999. – Т.44,№3.-С.5-10.
17. Федоренко В.О. Конструювання штамів-продуцентів антибіотика канаміцину *Streptomyces kanamyceticus* за допомогою методів клітинної та генної інженерії // Биол. вестник – 1999.–Т.3.№1-2.–С.111-117.
18. Дубицька Л., Заворотна С., Осташ Б., Громико О., Басілія Л., Федоренко В. Характеристика ознак стійкості до антибіотиків у продуцентів протипухлинних антибіотиків *Streptomyces globisporus* 1912, *Streptomyces peucetius* ATCC29050 та *Streptomyces peucetius subsp.caesius* ATCC27952 // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2000.-Вип.25.-С.49-60.
19. Федоренко В.О. Генетична нестабільність стійкості *Streptomyces ambofaciens* до хлорамфеніколу // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2000.-Вип.25.-С.67-73.
20. Громико О., Басілія Л., Кириченко Н., Федоренко В. Отримання і характеристика стрептоміцин-резистентних мутантів продуцента протипухлинного антибіотика ландоміцину *Streptomyces globisporus* // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2000.-Вип.26.-С.46-53.

21. Мар'їна О., Заворотна С., Федоренко В. Вплив кофеїну на вияв генетичної нестабільності у *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2000.-Вип.26.-С.63-67.
22. Федоренко В.О., Басілія Л.І., Панькевич К.О., Дубицька Л.П., Остах Б.О., Лужецький А.М., Громико О.М., Крюгель Г. Генетичний контроль біосинтезу актиноміцетами протиракових антибіотиків-полікетидів // Бюл. ін-ту сільськогосп. мікробіол.-2000.-№8.-С.27-31.
23. Лужецький А.Н., Остах Б.Е., Федоренко В.А. Межродовая конъюгация *Escherichia coli* – *Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 // Генетика.-2001.-Т.37,№10.-С.1340-1347.
24. Ostash V., Basiliya L., Gromyko O., Rebets Yu., Fedorenko V. *Streptomyces globisporus* 1912 mutants with altered landomycin biosynthesis // Вісн. Львів. ун-ту. Сер.біол.-2001.-Вип.27.-С.106-112.
25. Pankevych K., Kruegel H., Fedorenko V. Cloning and sequencing of a putative positive transcription regulator gene of landomycin biosynthetic cluster of *Streptomyces globisporus* 1912 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер.біол.-2001.- Вип.27.-С.97-105.
26. Ostash V., Luzhetskyy A., Gromyko O., Fedorenko V. Transfer of plasmid from *Escherichia coli* to mutant strain *Streptomyces globisporus* LND900 with altered biosynthesis of antitumor antibiotic landomycin E // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер.біол.–2001.-№10.-С.147-149.
27. Дубицька Л.П., Федоренко В.О. Характеристика мутантів *Streptomyces peucetius subsp.caesius* ATCC27952, стійких до антрациклінових антибіотиків // Мікробіол.журн.-2001.-Т.63,№4.-С.53-61.
28. Федоренко В.О., Басілія Л.І., Заворотна С.А., Голець Л.М., Кириченко Н.В., Настасяк І.М., Демидчук Ю.О., Дубицька Л.П., Мазепа А.Й., Мар'їна О.В., Панькевич К.О., Остах Б.О., Лужецький А.М., Громико О.М., Самбір М.В. Генетичний контроль біосинтезу антибіотиків та стійкості до антибіотиків у актиноміцетів // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. У 4 т. / Редкол.: В.В.Моргун (головн. ред.) та ін.–К.:Логос,2001.–Т.1.-С.469-476.
29. Федоренко В.О., Заворотна С.А., Голець Л.М., Настасяк І.М., Мар'їна О.В., Басілія Л.І., Кириченко Н.В., Демидчук Ю.О. Механізми генетичної нестабільності ознак актиноміцетів // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. У 4 т. / Редкол.: В.В.Моргун (головн. ред.) та ін.– К.:Логос, 2001.–Т.1.-С.462-468.
30. Дубицька Л.П., Федоренко В.О. Характеристика мутантів *Streptomyces peucetius subsp.caesius* ATCC27952-2, стійких до хлорамфеніколу // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2002.-Вип.28.-С.105-113.
31. Дубицька Л.П., Федоренко В.О. Конструювання штамів *Streptomyces peucetius subsp.caesius* ATCC27952-2 з підвищеною здатністю перетворювати даунорубіцин в доксорубіцин // Біополімери і клітина-2002.-Т.18,№2.-С.91-95.

32. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Hoffmeister D., Bechthold A., Fedorenko V. Gene cloning system for *Streptomyces cyanogenus* S136 // Вісн. Львів.ун-ту.Сер.біол.-2002.-Вип.29.-С.62-68.
33. Дубицкая Л.П., Федоренко В.А. Влияние глюкозы на антиботическую активность и резистентность к антибиотикам у *Streptomyces peucetius subsp. caesius* ATCC 27952-2 и его мутантов // Антибиот. и химиотер. – 2002. – Т.47,№6.-С.7-11.
34. Сидоров Ю.І., Федоренко В.О., Громико О.М., Новіков В.П., Влязло Р.Й., Верес.Р.М. Розрахункова модель виробництва протипухлинного антибіотика “Ландоміцин Е” // Вісн. Націонал. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2002.-№461.-С.204-208.
35. Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A., Hoffmeister D., Brana A., Salas J.A., Bechtold A., V.Fedorenko. Production of landomycins in *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators // FEMS Microbiol. Let.-2003.-Vol. 222, Is.1. –P.149 – 153.
36. Ostash B., Rebets Y., Yuskevich V., Luzhetskyy A., Tkachenko V., V.Fedorenko. Targeted disruption of *Streptomyces globisporus* IndF and IndL cyclase genes involved in landomycin E biosynthesis // Folia Microbiol.-2003.-Vol.48.-P.484-488.
37. Ostash B., Rebets Yu., Samborsky M., Salas J.A., Fedorenko V. Sequencing and analysis of putative 3D-4H ring cyclase gene IndF of *Streptomyces globisporus* 1912 landomycin E biosynthetic gene cluster // Вісн. Львів. ун-ту. Сер.біол.-2003.-Вип.32.-С.84-91.
38. Rebets Yu., Ostash B., Gromyko O., Mik U., Basiliya L., Fedorenko V. Resistance of recombinant *Streptomyces albus* CEST 114 and *Streptomyces globisporus* strains to landomycin E // Вісн. Львів. ун-ту. Сер.біол.-2003.-Вип.33.-С.47-54.
39. Громико О.,Басілія Л.,Федоренко В. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces globisporus* 1912 - продуцента протипухлинного антибіотика ландоміцину Е // Наук.вісн. Львів. держ. акад. вет. мед.-2003.- Т.5, (№2).-Ч.3. – С.45-52.
40. Ostash B., Rix U., Remsing Rix L.L., Tao Liu, Lombo F., Luzhetskyy A., Gromyko O., Wang C., Brana A.F., Mendez C., Salas J.A., Fedorenko V., Rohr J. Generation of novel landomycins by combinatorial biosynthetic manipulation of the IndGT4 gene of the landomycin E cluster in *S.globisporus* // Chemistry and Biology-2004.-Vol.11.-N.4.-P.547-555.
41. Gromyko O., Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A., Fukuchara M., Bechthold A., Nakamura T., Fedorenko V. Generation of *Streptomyces globisporus* SMY622 strain with increased landomycin E production and it's initial characterization // J.Antibiot.-2004.-Vol.57.-N.6-P.383-389.
42. Спосіб отримання штамів *Streptomyces peucetius subsp.caesius* ATCC27952-2 з підвищеним біосинтезом доксорубіцину та здатністю до перетворення даунорубіцину в доксорубіцин.

- Патент UA50047A, МПК7C12N13/03 / Федоренко В.О., Дубицька Л.П. - Заявл.16.03.200; Опубл.15.10.2002.-Бюл.№10. - 10 с.
43. Спосіб отримання штамів *Streptomyces globisporus* з підвищеним рівнем біосинтезу ландоміцинів. Патент UA62200A, МПК7C12N15/00 / Федоренко В.О., Ребець Ю.В., Осташ Б.О., Лужецький А.М. – Заявл. 24.01.2003; Опубл.15.12.2003.- Бюл.№12. - 10 с.
44. Штам актиноміцетів *Streptomyces globisporus* Smu622 – продуцент протипухлинного антибіотика ландоміцину Е. Патент UA62200A, МПК7C12N15/00 / Громико О.М., Федоренко В.О., Басілія Л.І. - Заявл. 3.06. 2003; Опубл. 15.04.2004.-Бюл.№4.-4 с.
45. Zavorotna S., Fedorenko V. The pSE201 plasmid of *Saccharopolyspora erythraea*. // Abstr. 7th Int. Symp. Genet. Ind. Microorg., Montreal, June 26-July 1, 1994 – P.252.
46. Golec L., Basiliya L., Mazepa A., Kirichenko N., Esypov S., Fedorenko V. Identification of genes controlling the kanamycin biosynthesis in *Streptomyces kanamyceticus* // Abstr. VAAM Workshop “Biologie der Actinomyceten”, Мьнster, Sept.24-26, 1995.-P.30.
47. Golec L., Sambir M., Mazepa A., Fedorenko V. Genetic recombination during protoplast fusion *Streptomyces kanamyceticus* // Abstr. 10th Int. Symp. Biol. Actinom., Beijing, May 27-30, 1997.-10P1.
48. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Hoffmeister D., Bechtold A., Fedorenko V. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces kanamyceticus*: effects of chromosomal insertions on kanamycin production // Abstr. VAAM Workshop “Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten”, Freiburg, Sept.29-Oct.1, 2003.-V3.
49. Ostash B., Luzhetskyy A.,Yuskevich V., Hrek M., Salas J.A., Bechtold A., Rohr J., Fedorenko V. Generation of novel landomycin through genetic engineering // Abstr. Int. Weigl Conf. “Microorganisms in pathogenesis and their drug resistance”, Lviv, Sept.11-14, 2003.-P.126.

АНОТАЦІЇ

Федоренко В.О. Генетичний контроль стійкості актиноміцетів до антибіотиків та його роль у біосинтезі антибіотиків. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15.- генетика. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2004.

У дисертації вивчено закономірності генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків та вплив генетичних детермінантів антибіотикорезистентності на біосинтез полікетидних антибіотиків еритроміцину в *Sacch. erythraea*, спіраміцину в *S. ambofaciens*, даунорубіцину та доксорубіцину в *S. peucetius subsp.caesius*, а також аміноглікозидного антибіотика канаміцину в *S. kanamyceticus*. У досліджених штамів відбуваються спонтанні та індуковані мутагенами множинні зміни ознак резистентності до антибіотиків. Показано, що мутанти *Sacch. erythraea*, стійкі до рифампіцину, хлорамфеніколу, тіострептонону та стрептоміцину, мутанти *S.*

peucetius subsp.caesius, стійкі до даунорубіцину та доксорубіцину, а також мутанти *S. kanamyceticus*, стійкі до аміноглікозидів, перспективні для селекції штамів з підвищеним синтезом антибіотиків. З бібліотеки генома продуцента ландоміцину *E. S. globisporus* 1912, клоновано та секвеновано кластер генів біосинтезу цього антибіотика. У ньому виявлено 30 генів та визначено ймовірні функції 28 з них. Ідентифіковано п'ять класів мутацій генів, що контролюють утворення канаміцину в *S. kanamyceticus*. Клоновано та секвеновано ген *kmrB*, що кодує метилазу 16S рРНК та зумовлює стійкість *S. kanamyceticus* до канаміцину, гентаміцину, сизоміцину та тобраміцину. Опрацьовано системи клонування генів у штаммах *S. kanamyceticus* та *S. globisporus* за допомогою кон'югаційного перенесення плазмід з *E. coli* та розроблено генетичні та генно-інженерні підходи до створення штамів, які здатні до підвищеного синтезу еритроміцину, ефективною трансформації даунорубіцину в доксорубіцин та продукції нових ландоміцинів Н, F та G.

Ключові слова: *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, антибіотики, еритроміцин, канаміцин, спіраміцин, даунорубіцин, доксорубіцин, ландоміцин, стійкість до антибіотиків.

Федоренко В.А. Генетический контроль устойчивости актиномицетов к антибиотикам и его роль в биосинтезе антибиотиков. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.15.- генетика. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2004.

В диссертации изучены закономерности генетического контроля устойчивости актиномицетов к антибиотикам и влияние генетических детерминантов антибиотикорезистентности на биосинтез поликетидных антибиотиков эритромицина у *Sacch. erythraea*, спирамицина у *S. ambofaciens*, даунорубицина и доксорубицина у *S. peucetius subsp.caesius*, а также аминогликозидного антибиотика канамицина у *S. kanamyceticus*. У исследованных штаммов происходят спонтанные и индуцированные мутагенами множественные изменения признаков резистентности к антибиотикам. Показано, что мутанты *Sacch. erythraea*, устойчивые к рифампицину, хлорамфениколу, тиострептонину и стрептомицину, мутанты *S. peucetius subsp.caesius*, устойчивые к даунорубицину и доксорубицину, а также мутанты *S. kanamyceticus*, резистентные к аминогликозидам, перспективны для селекции штаммов с повышенным синтезом антибиотиков. Из библиотеки генома продуцента ландомицина *E. S. globisporus* 1912 клонирован и секвенирован кластер генов биосинтеза этого антибиотика. В нем обнаружены 30 генов и определены вероятные функции 28 из них. Идентифицированы пять классов мутаций генов, контролирующих продукцию канамицина у *S. kanamyceticus*. Клонирован та секвенирован ген *kmrB*, кодирующий метилазу 16S рРНК и определяющий устойчивость *S. kanamyceticus* к канамицину, гентамицину, сизоміцину и тобраміцину. Разработаны системы клонирования генов в штаммах *S. kanamyceticus* и *S.*

globisporus с помощью конъюгационного переноса плазмид из *E. coli*, а также генетические и генно-инженерные подходы к созданию штаммов, способных к повышенному синтезу эритромицина, эффективной трансформации даунорубицина в доксорубицин, а также продукции новых ландомицинов H, F и G.

Ключевые слова: *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, антибиотики, эритромицин, канамицин, спирамицин, даунорубицин, доксорубицин, ландомицин, устойчивость к антибиотикам.

Fedorenko V. O. Genetic control of actinomycete resistance to antibiotics and its role in the biosynthesis of antibiotics. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science degree on speciality 03.00.15 – Genetics. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2004.

The mechanisms underlying the genetic control of actinomycete resistance to antibiotics have been investigated together with the roles of the genetic determinants of antibiotic resistance in the biosynthesis of the polyketide antibiotics erythromycin by *Sacch. erythraea*, spiramycin by *S. ambofaciens*, daunorubicin and doxorubicin by *S. peucetius subsp. caesius* as well as of the aminoglycoside antibiotic kanamycin by *S. kanamyceticus*. The spontaneous and mutagen-induced multiple changes of the antibiotic resistance traits were shown to occur in the studied strains. The amplification-capable DNA sequences have been found and characterized in the genome of *S. coelicolor* A3(2) and *S. ambofaciens* unstable mutants.

The genomic library of landomycin E producer *S. globisporus* 1912 has been constructed and the landomycin E biosynthesis gene cluster has been cloned and sequenced. 30 genes have been identified, with the putative functions assigned to 28 of them. The *lndE*, *lndF*, *lndA*, *lndB*, *lndC*, *lndD*, *lndL*, *lndM*, *lndN*, *lndO*, *lndP*, *lndV*, *lndZ4*, *lndZ6*, *lndZ5* genes govern the biosynthesis of landomycine E polyketide moiety, *lndG*, *lndH*, *lndQ*, *lndR*, *lndS*, *lndT*, *lndZ1*, *lndZ3* are responsible for the deoxysugars synthesis, *lndGT2*, *lndGT1*, *lndGT4* – for sugar chain attachment to the aglycone structure; the *lndJ* gene is recognized as landomycin E resistance determinant, and *lndI* — as regulatory gene for *lnd*-cluster.

The collection of *S. kanamyceticus* mutant strains with deficiencies for the different kanamycin biosynthesis stages has been created and studied. The five classes of mutations within genes controlling the kanamycin biosynthesis (*kanA*, *kanB*, *kanC*, *kanD* та *kanG*) have been identified in these mutants. The genetic recombination events following the *S. kanamyceticus* protoplasts fusion have been shown. The linkage of the *kanB* and *kanD* mutations with the erythromycin, gentamycin and rifampicin resistance mutations has been revealed.

The *kmrB* gene which codes for 16S rRNA methylase and confers the kanamycin, gentamycin, sisomicin and tobramycin resistance to *S. kanamyceticus*, has been cloned and sequenced. By means of the PFGE-analysis of the restriction macrofragments, the chromosome sizes of five *S. kanamyceticus* strains have been determined and fall in the range of 7715–8217 kb. The nucleotide sequence rearrangements as

well as *kmrB* gene amplifications have been found in the genomes of the unstable *Kan⁻*-mutant *kan12* and gentamycin-resistant mutants *genR8* and *genR10*.

The gene cloning system for *S. kanamyceticus* and *S. globisporus* strains based on the conjugative plasmid transfer from *E. coli* has been developed. This system has been shown to work effectively for the targeted *lnd*-genes disruption in *S. globisporus*.

The rifampicin, chloramphenicol, thiostrepton and streptomycin resistant *Sacch. erythraea* mutant strains, as well as daunorubicin and doxorubicin resistant *S. peucetius subsp. caesius* mutant strains appeared to be promising for the selection of the strains with an elevated antibiotic biosynthesis levels. The protoplast fusion and the selection of the recombinants simultaneously containing *rif*-, *str*- and *tsr*-mutations is an effective technique for *Sacch. erythraea* strains selection. It has been demonstrated that mutants with impaired glucose repression can be used in the selection of *S. kanamyceticus* and *S. peucetius subsp. caesius*. The cloning of *dnrI* and *cpx* genes in *S. peucetius subsp. caesius* makes possible the isolation of the strains owing an increased ability of daunorubicin to doxorubicin transformation. The *lndGT4* gene knockout in landomycin E producer *S. globisporus* 1912 causes the appearance of novel landomycins F and G, and after the complementation of this deficiency — the synthesis of landomycin G. The novel landomycins possess an altered antibacterial and antitumor properties.

Keywords: *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, antibiotics, erythromycin, kanamycin, spiramycin, daunorubicin, doxorubicin, landomycin, antibiotic resistance.