

**ПОШУК І ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРІВ БІОСИНТЕЗУ
ЛАНДОМІЦИНУ Е У *STREPTOMYCES GLOBISPORUS***

*Проведено пошук позитивних регуляторів біосинтезу ландоміцину Е серед екзогенних метаболітів музейних і свіжовиділених штамів стрептоміцетів за допомогою тесту на косинтез із використанням мутантного штаму *Streptomyces globisporus* 1912-Б2. Показано здатність біля 10 % досліджених стрептоміцетів утворювати екзогенні метаболіти, які відновлюють біосинтез ландоміцину Е штамом Б2. Регуляторні сполуки, очищені методом тонкошарової хроматографії, відрізняються між собою хроматографічною рухливістю (Rf) і максимумами поглинання в УФ-світлі. На підставі попередніх досліджень вони віднесені до 4-х типів позаклітинних регуляторів біосинтезу ландоміцину Е.*

К л ю ч о в і с л о в а: стрептоміцети, регулятори біосинтезу ландоміцину Е.

Ландоміцин Е – протипухлинний антибіотик полікетидної природи, який синтезується штамом *Streptomyces globisporus* 1912 і викликає типовий апоптоз у ракових клітинах людини в дослідях *in vitro* [4]. Регуляція біосинтезу полікетидних антибіотиків у стрептоміцетів, за даними літератури, здійснюється на різних рівнях структурної організації і диференціації клітин великою кількістю генів, які відносяться до різних родин за своєю будовою і функцією [2, 3]. Нижчий (базовий) рівень регуляції представлений білками родини SARP, які відіграють роль позитивних факторів транскрипції шлях-специфічних плейотропних генів пучків біосинтезу антибіотиків і підлягають контролю з боку систем вищого рівня регуляції – bldA і A-факторзалежних каскадних регуляцій і двокомпонентних систем передачі сигналів – AfsK/R, AbsA1/A2, AfsQ1/Q2, DasR та інші.

Крім перерахованих систем регуляції на рівні специфічних білків, які зв'язуються із відповідними регуляторними ділянками ДНК, є багато низькомолекулярних сполук, які відіграють важливу роль у регуляції вторинного метаболізму. Сюди можна віднести А-фактор (γ -бутиролактон), N-ацетил-D-глюкозамін, циклічний АМФ, гуанозилтетрафосфат (ppGpp), S-аденозил-метіонін та інші [2].

На сьогоднішній день секвеновано геноми 8-ми різних представників роду *Streptomyces* (*S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. clavuligerus*, *S. pristinaeae*, *S. scabies*, *S. svicensis*, *S. sp. MGI*) і показано наявність у кожному із них принаймні 20 наборів визнаних біосинтетичних генів для вторинного метаболізму, більшість із яких ще не досліджена [5]. Взагалі учені вважають, що тільки представники одного роду *Streptomyces* здатні синтезувати більше 100 тисяч різних молекул, але їх виявлення в лабораторних умовах становить труднощі із-за мовчазного стану пучків генів і відсутності необхідних умов їх функціонування.

Пошуки нових регуляторів і з'ясування механізмів їх взаємодії в процесі біосинтезу антибіотиків становить важливу фундаментальну і прикладну проблему мікробіологічної науки і біотехнології. Для вирішення цієї складної проблеми вчені використовують різні експериментальні підходи. Генетичний підхід полягає в інактивації генів невідомих регуляторів біосинтезу за допомогою інсерційного мутагенезу, дослідження їх структури і порівняння з відомими регуляторними генами.

В даній роботі ми використали інший підхід – пошук низькомолекулярних позаклітинних сполук, які синтезуються музейними і свіжовиділеними ґрунтовими стрептоміцетами, за допомогою модельної тест-системи – штаму *S. globisporus* 1912-Б2 з генетичним блоком на шляху біосинтезу невідомого регулятора – стимулятора утворення ландоміцину Е.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був вихідний штам *S. globisporus* 1912 і одержані від нього похідні мутанти за ознакою біосинтезу ландоміцину Е та його регулятора [1], а також продуценти відомих антибіотиків і свіжовиділені ґрунтові стрептоміцети. Для первинного відбору штамів стрептоміцетів, здатних відновлювати біосинтез ландоміцину Е у штаму 1912-Б2, використовували кукурудзяно-соєве середовище (г/л): кукурудзяна мука – 20,0, соєва мука – 10,0, NaCl – 5,0, рН – 7,2, стерилізація при 1,0 атмосфері 30 хв. На свіжоприготовлені газони культури 1912-Б2 в чашках Петрі підсівали по периферії досліджувані стрептоміцети у вигляді плями діаметром до 1,0 см і після 2-3 днів росту при 28 °С враховували результати

© Б.П. Мацелюх, С.Г. Тимошенко, О.І. Бамбура, О.П. Копейко, 2011

тестування – наявність або відсутність зони утворення ландоміцину Е коричнево-червоного кольору навколо плям вирощених стрептоміцетів.

З метою накопичення і виділення регуляторів використовували мінімальне середовище (г/л): аспарагін – 1,0, гліцин – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, $MgSO_4$ – 0,5, NaCl – 4,0, гліцерин – 10,0, агар – 10,0, рН 7,2, стерилізація при 0,75 атмосфери 30 хв. Чашки з мінімальним середовищем засівали газом відібраними культурами стрептоміцетів і інкубували 4-5 днів при 28 °С. Агаризоване середовище з культурами нарізали на квадратики розміром 1,0 см і метаболіти екстрагували сумішшю хлороформу і ацетону (2:1) при кімнатній температурі протягом 24 годин. Одержані екстракти випарювали у вакуумному роторному випарникові при 42 °С і висушені сирці розчиняли в етанолі. Метаболіти розділяли за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках Silica gel 60 F254 фірми Merck з використанням системи розчинників бензол – етилацетат – ацетон – етанол (4 : 2 : 1 : 0,5). Окремі смуги метаболітів, які поглинають УФ-світло, знімали із хроматографічних пластинок разом із силікагелем, розчиняли в етанолі і носій осаджували центрифугуванням при 10 тис. об/хв.

Одержані спиртові розчини метаболітів перевіряли на здатність відновлювати біосинтез ландоміцину Е у тест-штама 1912-Б2 та у випадку позитивної реакції знімали спектри їх поглинання в УФ-світлі за допомогою спектрофотометра Beckman DU-8.

Результати та їх обговорення. Попередні дослідження ландоміцинонедостатніх мутантів *S. globisporus* 1912 за допомогою тесту на косинтез виявили здатність екзогенних метаболітів групи мутантів відновлювати синтез ландоміцину Е штамом Б2 [1]. Становило науковий інтерес з'ясування природи цих невідомих сполук, а також можливість їх синтезу представниками інших видів стрептоміцетів. Кількісне співвідношення внесених метаболітів у мікрограмах до синтезованого ландоміцину Е в міліграмах скоріше вказувало на їх регуляторну роль, а не на функцію проміжних сполук на шляху біосинтезу антибіотика.

Колекція із 25 ізогенних штамів – похідних *S. globisporus* 1912 перевірена на здатність синтезувати невідомий регулятор при вирощуванні газом на твердому мінімальному середовищі в чашках Петрі. Екстракти 5-добових культур після випарування розчинника розчиняли в етанолі і вносили в кількості 20 мкл в лунки на свіжоприготовлених газонах культури штаму Б2 на кукурудзяно-соєвому середовищі. Усі штами, які синтезують ландоміцин Е (1912, 3-1, 2LV, RS2, K3, RV, 4Crt, 7Crt), продукують також регулятор біосинтезу останнього. Натомість мутанти, які не утворюють антибіотика, розділено на дві групи: більша кількість із них синтезує регулятор (A2, Б1, 3-1К, K3, 141, 27S, BL, LP45, RS1), а решта (A1, Б2, 2-2, 142, 3-1Б) втратила цю ознаку в процесі мутагенезу (таблиця).

Стрептоміцети інших видів також виділяють у живильне середовище метаболіти, які відновлюють утворення ландоміцину Е мутантом Б2. Найбільш відомий модельний штам генетики стрептоміцетів *S. coelicolor* A3(2), а також штами *S. avermitilis* Ac-2177-10 і *S. lividans* TK24 синтезують регулятори типу гамма-бутиролактонів, в той час як 8 представників інших видів стрептоміцетів не дають позитивної відповіді у тесті косинтезу із штамом Б2. Стрептоміцети, свіжовиділені із різних ґрунтів України, утворюють позитивні регулятори біосинтезу ландоміцину Е з частотою біля 10 % із 200 перевірених культур (таблиця).

Таблиця

Відновлення біосинтезу ландоміцину Е мутантом Б2 під впливом метаболітів стрептоміцетів

Стрептоміцети	Синтез антибіотика	Синтез регулятора
<i>S. antibioticus</i> 7116	олеандоміцин	-
<i>S. aureofaciens</i> 019	хлортетрациклін	-
<i>S. avermitilis</i> Ac-2177	аверміктини	+
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	4 антибіотики	+
<i>S. cyanogenus</i> Tü S136	ландоміцин А	-
<i>S. glaucescens</i> Tü 49	тетраценоміцин	-
<i>S. fradiae</i> Tü 2717	урдоміцин	-
<i>S. levoris</i> 165	-	-
<i>S. lividans</i> TK24	-	+
<i>S. olivaceus</i> Tü 2353	елораміцин	-
<i>S. reciffiensis</i>	-	-
<i>S. globisporus</i> 1912	ландоміцин Е	+
25 похідних штаму 1912	« 8+, 17-	20+, 5-
200 свіжовиділених штамів стрептоміцетів	НД	20+, 180-

НД – не досліджували

З метою очистки і попередньої характеристики метаболітів, здатних відновлювати біосинтез ландоміцину Е у мутанта Б2, проведена тонкошарова хроматографія екстрактів агарових культур стрептоміцетів, вирощених газомом на мінімальному середовищі. Всі індивідуальні фракції (окремі смуги) метаболітів, розділені на силікагелевій пластинці і візуалізовані в УФ-світлі, перевіряли на біологічну активність за допомогою штаму Б2. Як видно на рис. 1, очищені метаболіти штамів 2LV, ДЛ207 і К70 відновлюють синтез ландоміцину Е (темні зони) штамом Б2.

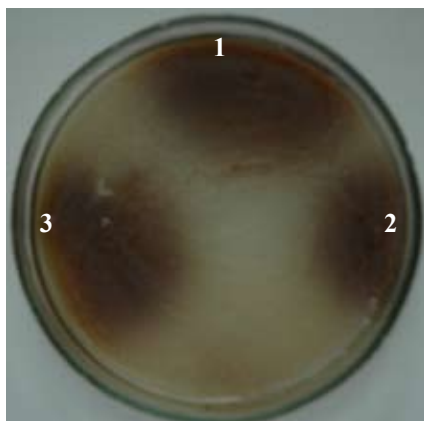


Рис. 1. Зони ландоміцину Е, синтезованого штамом Б2 під впливом регуляторів 2LV (1), ДЛ207 (2) і К70 (3).

Таким чином нами виявлено чотири типи позитивних регуляторів, які синтезуються різними стрептоміцетами. Перший тип регулятора синтезують вихідний штам дикого типу *S. globisporus* 1912 та похідні від нього мутанти. Він представлений на хроматограмі двома смугами з різними показниками Rf (0,78-0,80 і 0,49-0,50) (рис. 2). Мажорна сполука з хроматографічною рухливістю 0,8, виділена на четверту добу вирощування культури, інтенсивніше поглинає УФ-світло і стимулює утворення антибіотика. Дана сполука виділяється в значно меншій кількості після шести діб росту культури, в той час як сполука з Rf 0,5, навпаки, збільшує свій вихід. Можна припустити, що в динаміці росту культури перша сполука перетворюється в другу із збереженням біологічної активності. Ці сполуки повинні мати подібність у частині структури, що відповідає за біологічну активність. Другий тип регулятора синтезує штам ДЛ207, виділений із зразка ґрунту із Долини нарцисів біля м. Хуст. Він характеризується показником Rf 0,76, близьким до регулятора першого типу.

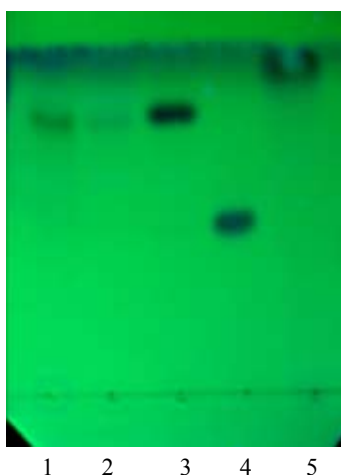


Рис. 2. Тонкошарова хроматографія регуляторів біосинтезу ландоміцину Е.
Штами: 1 – К70, 2 – ДЛ207, 3, 4 – 2LV, 5 – РК20-12.

Третій тип регуляторів продукує штам К70, виділений із ґрунту Київської області. Хрома-

тографічна рухливість (Rf) цієї сполуки становить 0,78. Четвертий тип регулятора утворюють багато стрептоміцетів, який рухається на хроматографічній пластинці майже разом із фронтом розчинника (Rf 0,9) і його можна віднести до найменш специфічних регуляторних сполук.

Наступним етапом досліджень виділених і очищених позаклітинних метаболітів стрептоміцетів – стимуляторів біосинтезу ландоміцину Е було встановлення спектрів поглинання цих сполук. На рис. 3 наведено спектри поглинання регуляторів, які синтезують штами 2LV і Дл207. Як видно з рисунку, максимуми поглинання мажорної сполуки з Rf 0,85 і мінорної сполуки з Rf 0,49 становлять 285 і 240 нм відповідно. Отже, ці два метаболіти відрізняються хроматографічною рухливістю і максимумами поглинання в УФ-світлі. Регуляторна сполука штаму Дл207 має максимуми поглинання при 216 і 259 нм, відрізняючись від двох попередніх сполук. Сполука штаму К70 має Rf 0,79 і максимум поглинання 204,2 нм, який подібний до відповідних показників більшості досліджених метаболітів 4-го типу (рис. 4).

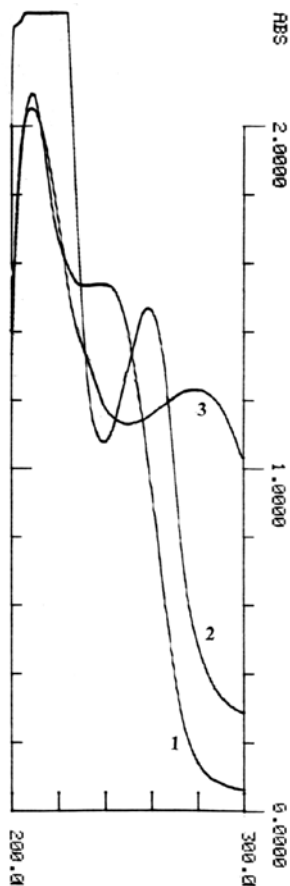


Рис. 3. Спектри поглинання регуляторів.

Штами: 2LV (1, 3), Дл207 (2).

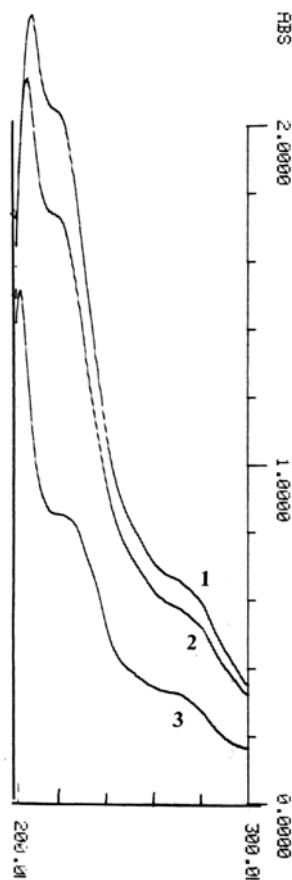


Рис. 4. Спектри поглинання регуляторів.

Штами: 51 (1), 2177-10 (2), К70 (3).

Максимуми поглинання досліджених в даній роботі метаболітів можна порівняти з такими ж характеристиками відомих низькомолекулярних сполук стрептоміцетів, які беруть участь у регуляції біосинтезу різних антибіотиків.

Сюди відносяться згадані у вступі даної роботи гамма-бутиролактони (А-фактор і подібні до нього регулятори), N-ацетил-D-глюкозамін, гуанозин-3,5-діфосфат (ppGpp), циклічний АМФ і S-аденозил-метіонін. Гамма-бутиролактони подібні до регуляторів четвертого типу, маючи максимуми поглинання 205-207 нм. Циклічний АМФ і S-аденозил-метіонін мають максимуми поглинання 258 і 260 нм відповідно, які дуже близькі до 259 нм – максимуму поглинання сполуки штаму Дл207.

Регуляторний фактор *S. globisporus* 1912 з максимумом поглинання 285 нм не має подібних аналогів, описаних в літературі, і, можливо, він представлятиме нову структуру позитивних

регуляторів біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів. Наступні дослідження молекулярної маси і структури сполук за допомогою ВЕРХ-МС і ЯМР аналізів дадуть змогу в'ясувати їх подібність або відмінність від відомих регуляторів біосинтезу антибіотиків стрептоміцетів.

Б.П. Мацелюх, С.Г. Тимошенко, О.И. Бамбура, О.П. Копейко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА ЛАНДОМИЦИНА E В *STREPTOMYCES GLOBISPORUS*

Резюме

Проведен поиск позитивных регуляторов биосинтеза ландомицина E среди экзогенных метаболитов музейных и свежовыведенных штаммов стрептомицетов с помощью теста на косинтез, используя мутантный штамм *Streptomyces globisporus* 1912-B2. Показано способность около 10 % исследованных стрептомицетов продуцировать экзогенные метаболиты, восстанавливающие биосинтез ландомицина E штаммом B2.

Регуляторные соединения, очищенные методом тонкослойной хроматографии, отличаются между собой хроматографической подвижностью (Rf) и максимумами поглощения в УФ-свете. На основании предварительных данных они отнесены к 4-м типам внеклеточных регуляторов биосинтеза ландомицина E.

К л ю ч е в ы е с л о в а: стрептомицеты, регуляторы биосинтеза ландомицина E.

B.P. Matselyukh, S.G. Tymoshenko, O.I. Bambura, O.P. Kopejko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

SCREENING AND CHARACTERISTIC OF REGULATORS OF LANDOMYCIN E BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS*

S u m m a r y

The screening of the positive regulators of landomycin E biosynthesis has been conducted among exogenous metabolites of the museum and freshly isolated Streptomycetes strains by means of cosynthesis test using mutant strain *Streptomyces globisporus* 1912-B2. The ability to produce the exogenous metabolites restoring landomycin E biosynthesis by B2 strain was shown. The regulatory compounds purified by thin-layer chromatography differed between themselves by chromatographic mobility (Rf) and maxima of absorption in UV-light. They were divided into four types of extracellular regulators of landomycin E biosynthesis on the basis of preliminary study.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: Streptomycetes, regulators of landomycin E biosynthesis

The author's address: B.P. Matselyukh, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, DO3680, Ukraine.

1. Мацелюх Б.П., Полищук Л.В., Лутченко В.А. та ін. Синтез даїдзеїну і геністеїну стрептоміцетами та їх вплив на утворення антибіотиків //Мікробіол. журн. – 2005. – 67. № 2. – С. 12-21.
2. Мацелюх Б.П. Регуляція біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів //Там само. – 2006. – 68. № 4. – С. 85-95.
3. Bibb M., Hesketh A. Analyzing the regulation of antibiotic production in Streptomycetes//Methods in Enzymology. – 2009. – 458. – P. 93-116.
4. Korynevska A., Heffeter P., Matselyukh B. et al. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E //Biochem. Pharmacol. – 2007. –74. N12. – P.1713-1725.
5. van Wezel G.P., McKenzie N.L., Nodwell J.R. Applying the genetics of secondary metabolism in model Actinomycetes to the discovery of new antibiotics // Methods in Enzymology. – 2009. – 458 – P. 117-141.

Отримано 20.10.2010