



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 91725

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12Q 1/00

C12Q 1/02

C12Q 1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ АНТИБІОТИКІВ ТІОСТРЕПТОНОВОГО РЯДУ

1

(21) a200806265

(22) 12.05.2008

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл. № 16, 2010 р.

(72) МИРОНОВСЬКИЙ МАКСИМ ЛЕОНІДОВИЧ,
ОСТАШ БОГДАН ОМЕЛЯНОВИЧ, ОСТАШ ІРИНА
СТЕПАНІВНА, ФЕДОРЕНКО ВІКТОР ОЛЕКСАНД-
РОВИЧ(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-
ТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

(56) UA U 26679, 10.10.2007.

UA C1 6967, 31.03.1995.

UA C1 6965, 31.03.1995.

Nancy L. McKenzie and Justin R. Nodwell
"Phosphorylated AbsA2 negatively regulates
antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*
through interactions with pathway-specific regulatory
gene promoters", *Journal of Bacteriology*, July 2007,
Vol. 189, No. 14, p. 5284-5292.

2

Jianqiang Huang et al.: "Cross-regulation among
disparate antibiotic biosynthetic pathways of
streptomyces coelicolor", *Molecular Microbiology*
(2005) 58(5), 1276-1287.Weijing Xu et al.: "Autoregulation of AbsB (RNase III)
expression in *Streptomyces coelicolor* by
endoribonucleolytic cleavage of absB operon
transcripts", *Journal of Bacteriology*, Aug. 2008, Vol.
190, No. 15, p. 5526-5530.Yun BS et al.: "Microbial metabolites with tipA promoter
inducing activity. II. Geninthiocin, a novel thiopeptide
produced by *Streptomyces* sp. DD84 (ABSTRACT).(57) Спосіб виявлення антибіотиків тіострептоно-
вого ряду, що базується на індукції експресії гена
канаміциностійкості нео у *Streptomyces lividans*,
який відрізняється тим, що як векторну молекулу
ДНК використовують інтегративну плазмиду
pIJ6902.

Винахід стосується генетики бактерій та біоте-
хнології і може бути використаний для виявлення
продуцентів тіопептидних сполук тіострептонової
родини та їхніх похідних, що містять у своїй струк-
турі бісдегідроаланіновий ланцюг.

Тіопептидні антибіотики - природні, сірковмісні,
високомодифіковані, макроциклічні пептиди, пере-
важна більшість яких пригнічує білковий синтез у
грампозитивних бактерій [Bagley M.C., Dale J.W.,
Merritt E.A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // *Chem*
Rev. - 2005. - vol. 105. - P. 685-714; Lentzen G.,
Klinck R., Matassova N., Aboul-ela F., Murchie A.I.
Structural basis for contrasting activities of ribosome
binding thiazole antibiotics // *Chem Biol.* - 2003. - vol.
10. - P. 769-778]. Протималарійні, протипухлинні та
імуносупресивні властивості також характерні
представникам тіострептонової родини [Sullivan
M., Li J., Kumar S., Rogers M.J., McCutchan T.F.
Effects of interruption of apicoplast function on
malaria infection, development, and transmission //
Mol Biochem Parasitol. - 2000. - vol. 109. - P. 17-23;
Radhakrishnan S.K., Bhat U.G., Hughes D.E., Wang
I.C., Costa R.H., Gartel A.L. Identification of a

chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor
forkhead box M1 // *Cancer Res.* - 2006. - vol. 66. - P.
9731-9735; Ueno M., Furukawa S., Abe F., Ushioda
M., Fujine K., Johki S., Hatori H., Ueda H.
Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody
production // *J Antibiot.* - 2004. - vol. 57. - P. 590-
596].

Виявлення продуцентів нових тіопептидів тіос-
трептонової родини дозволило б отримати нові
сполуки з покращеними біологічними чи фармако-
логічними властивостями.

Виявлення нових мікроорганізмів, що продуку-
ватимуть вже відомі тіопептиди, також становить
практичний інтерес, оскільки вони можуть бути
більш зручними ніж наявні штами.

Відомий спосіб виявлення антибіотиків тіос-
трептонового ряду, що включає ферментацію про-
дуцентів тіопептидів, їхнє очищення з клітин і хімі-
чний аналіз кінцевого продукту [Nishimura H.,
Okamoto S., Mayama M., Ohtsuka H., Nakajima K.,
Tawara K., Shimohira M., Shimaoka N. Siomycin, a
new thiostrepton-like antibiotic // *J Antibiot.* - Ser.
A14. - P. 255-263].

(13) C2

(11) 91725

(19) UA

Однак цей спосіб передбачає використання складних мікробіологічних та хімічних процедур, є тривалим і трудомістким.

Найбільш близьким за технічною сутністю - прототипом - є спосіб виявлення тіострептоноподібних тіопептидних антибіотиків за допомогою репортерного штаму *Streptomyces lividans*, що містить у своїй хромосомі ген *tipA* та рекомбінантну плазмиду, в якій безпромоторний ген канаміцин-стійкості нео злитий з промотором гена *tipA* [Yun B.S., Hidaka T., Furihata K., Seto H. Microbial metabolites with *tipA* promoter inducing activity. II. Geninithiocin, a novel thiopeptide produced by *Streptomyces* sp. DD84 // J. Antibiot. - 1994. - vol. 47. - N 9. - P. 969-975]. Промотор гена *tipA* клонували у вектор pIJ486 так, що транскрипція гена нео підпадає під його контроль [Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. - 2000. - 613 pages]. Скоonstrувану плазмиду вводили у *S. lividans* шляхом трансформації протопластів. Відбір трансформантів проводили на регенераційному середовищі R2YE за стійкістю до тіострептону, яка визначалась маркерним геном вектора. Рекомбінантний штам *S. lividans* вирощували на середовищі R2YE з тіострептоном 5 днів для отримання спорової суспензії. Одночасно розливали чашки з середовищем Беннета, що містить 50 мкг/мл канаміцину, на яке засівали спорову суспензію рекомбінантного штаму *S. lividans*. Екстракти з клітин різних мікроорганізмів наносили на паперові диски, підсушували, та ставили на попередньо засіяний газон репортерного штаму. Суміш сполук дифундувала з дисків у клітини репортерного штаму. Якщо у суміші були тіострептоноподібні тіопептиди, то вони зв'язувались з білком TipA, і той, у свою чергу, набував здатності зв'язуватися з промотором *tipA* та запускати транскрипцію гена нео. Ті екстракти, що містили тіопептидні антибіотики тіострептонового ряду, індукували ріст рекомбінантного штаму *S. lividans* навколо відповідних дисків на середовищі Беннета з канаміцином.

Проте, цей спосіб вимагає селективного тиску - постійного додавання тіострептону до середовища, в якому росте репортерний штам, для підтримання реплікативної плазмиди, що має ряд недоліків. Зокрема, тіострептон є дорогим антибіотиком, і він індукує експресію сторонніх генів у *S. lividans*, що може спотворити результати дослідів.

В основу винаходу покладено завдання удосконалити спосіб експрес-виявлення антибіотиків тіострептонової родини шляхом конструювання покращеної тіострептоно-специфічної репортерної системи, що дасть змогу оптимізувати виявлення продуцентів цієї групи тіопептидів.

Поставлене завдання вирішується так, що у способі виявлення антибіотиків тіострептонового ряду, який базується на індукції експресії гена канаміцин-стійкості нео у *Streptomyces lividans*, як векторну молекулу ДНК використовують інтегративну плазмиду pIJ6902.

Авторами вперше запропоновано використати інтегративну плазмиду, у якій експресія гена нео підпадає під транскрипційний контроль з боку P_{tipA} , штам *Streptomyces lividans* TK24 та агарові блоки

культур мікроорганізмів для експрес-виявлення антибіотиків тіострептонової групи. Спосіб базується на використанні векторної молекули ДНК pIJ6902 [Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J., Cohen S.N. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor* // Mol Microbiol. - 2005. - vol. 58. - P. 1276-1287], що містить промотор гена *tipA*, та pIJ486 [Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. - 2000. - 613 pages]. Ген *tipA* кодує MerR-подібний транскрипційний регуляторний білок TipAL, який, за індукції клітин *Streptomyces lividans* тіострептоном, незворотно зв'язується з ним [Chiu M.X., Folcher M., Griffin P., Holt T., Klatt T., Thompson C.J. Characterization of the covalent binding of thiostrepton to a thiostrepton-induced protein from *Streptomyces lividans* // Biochemistry. - 1996. - vol. 35. - P. 2332-2341]. Білок TipAL, зв'язаний з тіострептоном, здатний активувати транскрипцію генів з *tipA* промотора. Окрім тіострептонової родини і активувати експресію генів [Chiu M.L., Folcher M., Katoh T., Puglia A.M., Vohradsky J., Yun B.S., Seto H., Thompson C.J. Broad spectrum thiopeptide recognition specificity of the *Streptomyces lividans* TipAL protein and its role in regulating gene expression // J Biol Chem. - 1999. - vol. 274. - P. 20578-20586]. Промотор гена *tipA* може бути використаний для конструювання репортерного штаму на основі *S. lividans* TK24, де наявність чи відсутність антибіотиків тіострептонової родини у його клітинах може бути спряжена з ростом чи відсутністю росту *S. lividans* TK24, відповідно, на селективних середовищах.

Фіг.1 Структурні формули представників родини тіострептонової, де 1 - тіострептон А; В, 2 - сіоміцин А; В, 3 - тіопептин, 4 - Sch 18640.

Фіг. 2 Схема рекомбінантної плазмиди pMO16, де 1 - ген канаміцин-стійкості нео, 2 - промотор гена *tipA*, 3 - ділянка ініціації реплікації плазмиди pUC18, 4 - ген апраміцин-стійкості aac(3)IV, 5 - ген тіострептоно-стійкості *tsg*, 6 - ділянка ініціації кон'югаційного переносу плазмиди RK2, 7 - сайт інтеграції фага ϕ C31, 8 - ген інтегрази фага ϕ C31.

Фіг.3 Схема функціонування репортерної системи, що базується на плазміді pMO16, та штамі *S. lividans* TK24, де А - блокування експресії гена нео за відсутності тіопептидів в середовищі, Б - індукція експресії гена нео за наявності тіопептидів. Умовні позначення: Г - ген канаміцин-стійкості нео, П - промотор гена *tipA*, Р - білок-регулятор TipA, Л - ліганд, представник тіострептонової родини антибіотиків.

Фіг.4 Індукція росту *S. lividans* TK24 (pMO16) агаровими блоками, де 1 - агаровий блок, що був вирізаний з газону продуцента сіоміцинів *Streptomyces sioyaensis* на середовищі OM, 2 - агаровий блок, що був вирізаний з газону продуцента сіоміцинів *Streptomyces sioyaensis* на середовищі MC, 3 - агаровий блок, що був вирізаний з газону продуцента сіоміцинів *Streptomyces sioyaensis* на середовищі R2YE, 4 - агаровий блок,

що був вирізаний з газону контрольного штаму *Streptomyces coelicolor* на середовищі R2YE.

Спосіб можна проілюструвати прикладами:

Приклад 1. Конструюють плазмиду pMO16. 3 плазміди pIJ486 [Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. - 2000. - 613 pages] за допомогою праймерів neoNdel-up (5'-AAACATATGATTGAACAAGATGGATTGCACG) та neoEcoRI-rp (5'-AAAGAATTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC) ампліфікують фрагмент ДНК, що містить безпромоторний ген канаміцин-стійкості нео. Цей амплікон обробляють ендонуклеазами рестрикції Ndel та EcoRI. Вектор pIJ6902 [Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J., Cohen S.N. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor* // Mol Microbiol. - 2005. - vol. 58. - P. 1276-1287] обробляють ендонуклеазами рестрикції Ndel та EcoRI, та лігують з вищеописаним ампліконом. Лігасною сумішшю трансформують *E. coli* DH5 α та відбирають клони, що несуть рекомбінантні плазміди на середовищі LA з 25 мкг/мл апраміцину. Плазмідну ДНК із трансформантів аналізують рестрикційним картуванням ферментами Ndel та EcoRI [Гловер Д. Молекулярное клонирование ДНК. Методы. М., Мир - 1989 - т. 1 - 374с]. Як результат отримують плазмиду pMO16, що містить вставку ДНК з геном канаміцин-стійкості нео.

Приклад 2. Плазмиду pMO16 трансформують штам *E. coli* ET12567 (pUZ8002), який за рахунок tra-генів плазмиди pUZ8002 забезпечує кон'югати́вне перенесення корезидентних плазмід [Flett F., Mersinias V., Smith C.P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl-DNA-restricting *Streptomyces* // FEMS Microbiol. Lett. - 1997. - vol. 155. - P. 223-229]. Одну колонію нічної культури *Escherichia coli* засівають у 5 мл середовища LB з 50 мкг/мл канаміцину. Культуру вирощують до оптичної густини OD₆₀₀=0,1, переносять у мікропробірки з об'ємом 1.5 мл та осаджують центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 1 хв. Зливають супернатант та клітини ресуспендують у 50 мкл середовища LB. Отриману суспензію клітин охолоджують у льоді 5 хв, додають 1 мл 0.1M розчину CaCl₂ та інкубують у льоді 1 год. Клітини осаджують центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 1 хв, зливають надосадову рідину та ресуспендують у 100 мкл 0.1M розчину CaCl₂. Інкубують 1 год. у льоді та додають розчин плазмідної ДНК. Інкубують 1 год. у льоді, після чого клітини піддають тепловому шоку протягом 1 хв. при 40°C, охолоджують та додають 1 мл середовища LB. Інкубують 2 год. при 37°C для індукції експресії генів стійкості та висівають на чашки з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину. Чашки інкубують при 37°C 16 год після чого трансформанти пересівають на свіже середовище LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину.

Приклад 3. Плазмиду pMO16 в *S. lividans* TK24 переносили шляхом міжродової кон'югації з відповідним штамом *E. coli* ET12567 (pUZ8002).

Суспензію спор штаму *S. lividans* TK24 висівають на середовище OM та вирощують 5 діб при 28°C для отримання спорової суспензії для кон'югаційних схрещувань. Штам *E. coli* ET12567 (pUZ8002) з плазмидою pMO16 висівають на чашку з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину та вирощують 18 год при 37°C. Готують суспензію клітин у 4 мл середовища LB. Одночасно готують суспензію спор штаму *S. lividans* TK24 у 4 мл стерильної води. Спори піддають тепловому шоку протягом 10 хв. при 50°C. Суспензію клітин та спор стрептоміцетів осаджують центрифугуванням 2 хв при 10000 об/хв., зливають надосадову рідину, розчиняють у 100 мкл середовища LB, змішують між собою та висівають на чашки з середовищем OM. Чашки інкубують 8-12 год при 28°C та заливають 1 мл водного розчину 25 мкг апраміцину та 50 мкг налідиксової кислоти.

Приклад 4. Отриманий штам *S. lividans* TK24 (pMO16) перевіряють на наявність плазмиди. Вирощують у 50 мл рідкого середовища YEME та виділяють сумарну ДНК. Зразки сумарної ДНК аналізують шляхом ПЛР з pSET152-специфічними праймерами [Stinchi S., Azimonti S., Donadio S., Sosio M. A gene transfer system for the glycopeptide producer *Nonomuraea* sp. ATCC39727 // FEMS Microbiol Lett. - 2003. - vol. 225. - P. 53-57]. Ампліфіковані фрагменти аналізують електрофоретично.

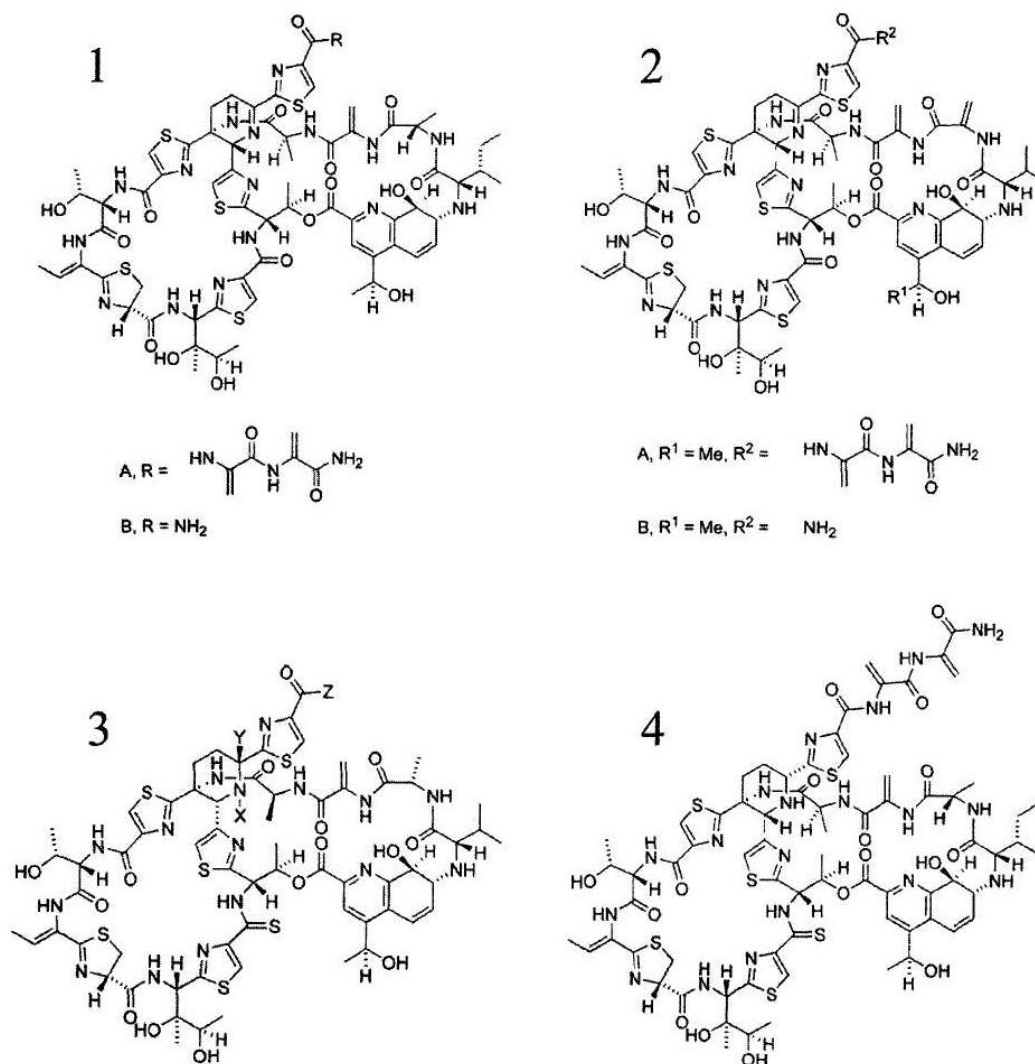
Перевіряють здатність репортерної системи *S. lividans* TK24 (pMO16) виявляти тіострептон. Штам *S. lividans* TK24 (pMO16) висівають на середовище OM з 25 мкг/мл апраміцину. Вирощують 5 діб при 30°C. Готують суспензію спор з 5-денної культури *S. lividans* TK24 (pMO16) у 1 мл води, яку висівають на середовище MMC з складом: L-аспарагін - 0.5 г, K₂HPO₄ - 0.5 г, MgSO₄·7H₂O - 0.2 г, FeSO₄·7H₂O - 0.01 г, казामीнові кислота - 3 г, agar - 15 г, дистильована вода - до 1000 мл. Після автоклавування у середовище додають 10 г/л глюкози та 50 мкг/мл канаміцину. Одночасно, на паперові диски Whatman діаметром 5 мм наносять розчини тіострептону у диметилсульфоксиді. Формула тіострептону та окремих представників тіострептонової родини - див. Фіг.1. Диски підсушують при 37°C у темряві протягом 1 години, а потім накладають на попередньо засіяний газон репортерного штаму. Чашки з дисками інкубують при 28-30°C протягом 4 діб. Навколо дисків з тіострептоном помітні чіткі зони росту *S. lividans* TK24 (pMO16). Це свідчить, що тіострептон по відношенню до TirAL є лігандом, що умовно відображений чорним квадратом позначеним літерою L на Фіг.3, і він був успішно виявлений репортерною системою.

За допомогою репортерної системи *S. lividans* TK24 (pMO16) виявляють сіоміцин у агарових блоках *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408. На середовище OM [Gromyko O., Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A., Fukuhara 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. - 383-389] висівають суспензію спор штаму

Streptomyces sioyaensis NRRL-B5408 - продуцента комплексу сіюміцинів A, B, C, D. Штам вирощують 6 діб при 28°C. Суспензію спор репортерного штаму *S. lividans* TK24 (pMO16) висівають на чашки MMC з 50 мкг/мл канаміцину, і на попередньо засіяний газон ставлять агарові блоки діаметром 5 мм, які вирізали з газону культури *S. sioyaensis* NRRL-B5408. Інкубують чашки з блоками 4 доби. Штам *S. sioyaensis* NRRL-B5408 індукує ріст *S. lividans* TK24 (pMO16), як показано на Фіг.4. Як результат, репортерна система дає змогу виявити ті агарові блоки, і, відповідно, продуценти, в яких накопичуються сполуки тіострептонової родини.

В іншому варіанті виконання цього експерименту можна засівати штами, що досліджуються, не на чашки, а у лунки 96-гніздового імунологічного планшета з об'ємом лунки 200 мкл, в які попередньо залили по 150 мкл середовища ОМ. Після вирощування штамів у планшеті, агарові блоки виймають з лунок та використовують, як описано вище. Цим досягається економія середовища та часу на проведення скринінгу.

Використання запропонованого способу експрес-виявлення антибіотиків тіострептонової групи дає змогу отримати передбачуваний технічний результат, який підтверджено Фіг.4.



Фіг.1.

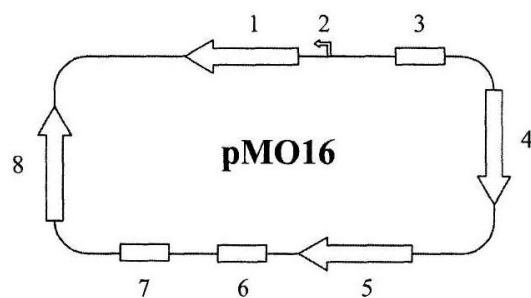
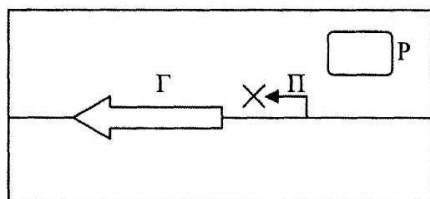


Fig.2.

А.



Б.

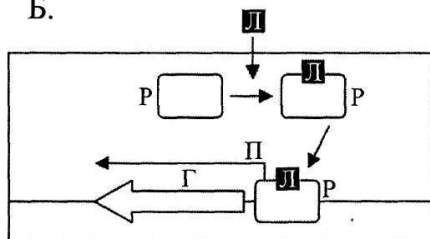


Fig.3.

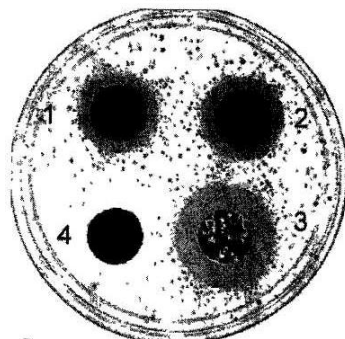


Fig.4.