



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79968** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**C12Q 1/00**  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 12537</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Макітринський Роман Павлович (UA),</b> <b>Осташ Богдан Омелянович (UA),</b> <b>Федоренко Віктор Олександрович (UA),</b> <b>Ципік Ольга Володимирівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>02.11.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>13.05.2013</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>13.05.2013, Бюл.№ 9</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b> <b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА,</b> вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000 (UA)

**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКЦІЇ АНТИБІОТИКІВ МОЕНОМІЦИНОВОГО РЯДУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб підвищення продукції антибіотиків моеноміцинового ряду, який базується на надекспресії генів плеiotропних регуляторів у актиноміцетах-продуцентах цих антибіотиків, крім того як регуляторний елемент використовують ген плеiotропного регулятора транскрипції *adrA<sub>gh</sub>* *S. ghanaensis*, клонований у складі інтегративної плазмиди *pTESaadrA-expr* у штаммах *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* M1152, *S. albus* J1074.

**UA 79968 U**



Корисна модель стосується генетики бактерій та біотехнології і може бути використана для створення штамів актиноміцетів-надпродуцентів антибіотиків моеноміцинового ряду та їхніх похідних.

Відомий спосіб отримання надпродуцентів моеноміцинів, за яким опромінюють ультрафіолетом чи обробляють хімічним мутагеном спорову суспензію одного із продуцентів цієї родини сполук, *Streptomyces ghanaensis*. Розсівають її на поживному агаризованому середовищі та відбирають клони із підвищеним рівнем біосинтезу антибіотика [Subramaniam-Niehaus B., Schneider T., Metzger J.W., Wohlleben W. Isolation and analysis of moenomycin and its intermediates from *Streptomyces ghanaensis* (ATCC14672) wildtype and selected mutants // Z. Naturforsch. - 1997. - vol. 52. - P. 217-226; Schuricht U., Hennig L., Findeisen M., Endler K., Welzel P., Arigoni D. The biosynthesis of moenocinol, the lipid part of the moenomycin antibiotics // Tetrahedron Lett. - 2001. - vol. 42. - P. 3835-3837].

Однак, цей спосіб передбачає використання складних мікробіологічних процедур, є тривалим і трудомістким. Крім того, набір корисних мутацій є унікальним для кожного отриманого штамів і їх неможливо точно відтворити в іншому штамі, що продукує структурно відмінний антибіотик моеноміцинового ряду.

Найближчим за технічною сутністю - прототипом є спосіб підвищення продукції моеноміцинів штамми *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. lividans* TK24moeno38-5<sup>+</sup> та *S. albus* J1074moeno38-5<sup>+</sup> за допомогою надекспресії у їхніх клітинах гена *bldA*, який кодує плейотропний регулятор біосинтезу антибіотиків - лейцил-тРНК<sup>UAA</sup>. Ця тРНК декодує найрідкісніший кодон у геномах стрепоміцетів - ТТА, який присутній у кількох ключових генах біосинтезу моеноміцинів. [Патент 63820 Україна, МПК (2011) C12Q1/00, 02, 04. Спосіб підвищення продукції фосфогліколіпідних антибіотиків / Осташ Б.О., Федоренко В.О., Громико О.М., Уокер-Кане С.; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. - № u201102624; заявл. 09.03.2011; опубл. 25.10.2011, Бюл. № 20.]. Реплікативну плазмиду pIJ584, що містить ген *bldA* *S. coelicolor*, переносять з клітин *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002, pIJ584) у клітини *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. lividans* TK24moeno38-5<sup>+</sup> та *S. albus* J1074moeno38-5<sup>+</sup> за допомогою кон'югації. Транскон'юганти вирощують у 30 мл рідкого середовища TSB протягом 5 діб при 30 °С. Моеноміцини екстрагують метанолом, екстракти випаровують і сухий залишок розчиняють у 100 мкл води. Кількість моеноміцинів у зразках визначають способом дифузії антибіотика в агар або високоефективної хроматографії, спряженої із мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС). Транскон'юганти продукують у 2-3 рази більше моеноміцинів, ніж контрольний штам.

Проте, у цьому способі використовують реплікативну плазмиду, що обмежує стабільність успадкування ознаки підвищеного антибіотикоутворення. Ген *bldA* контролює синтез моеноміцинів на рівні трансляції, що не є головним етапом регуляції продукції цієї родини сполук. Тому використання цього регулятора не дає змоги безпосередньо впливати на транскрипцію генів біосинтезу фосфогліколіпідних антибіотиків (мое-генів).

В основу корисної моделі покладено задачу удосконалити спосіб підвищення продукції антибіотиків моеноміцинового ряду шляхом конститутивної надекспресії гена *adrA<sub>gh</sub>*, що кодує плейотропний регулятор транскрипції *S. ghanaensis*, на основі інтегративної плазмиди, що дасть змогу стабільно успадковувати додаткову копію гена *adrA<sub>gh</sub>*, та підвищити продукцію антибіотика.

Поставлене завдання вирішується так, що у способі підвищення продукції антибіотиків моеноміцинового ряду, який базується на надекспресії регуляторних елементів, де як регуляторний елемент використовують ген плейотропного регулятора транскрипції (*adrA<sub>gh</sub>*) *S. ghanaensis* ATCC14672, клонований у складі інтегративної плазмиди pTESaadrA-expr у штаммах *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. lividans* TK24, *S. albus* J1074, *S. coelicolor* M1152.

Моеноміцин А - фосфогліколіпідний антибіотик, що на декілька порядків більш активний, ніж антибіотики, що сьогодні застосовують у медицині. Він складається з 3-фосфогліцератної кислоти, що зв'язує між собою ізопреноїдний ланцюг з пентасахаридним залишком. Мінімальна інгібуюча концентрація ММА проти різних грампозитивних мікроорганізмів варіює від 1 до 100 нг/мл [Ostash B., Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity // Nat Prod Rep. - 2010. - vol. 27. - P. 1594-1617]. Моеноміцини належать до групи антибіотиків, мішенню дії яких є клітинна стінка бактерій, і безпосередньо діють на ферменти її синтезу - пептидогліканові глікозилтрансферази (трансглікозилази). Цей механізм дії є унікальним серед усіх досліджених на сьогодні [Ostash B., Walker S. Bacterial transglycosylase inhibitors // Curr. Opin. Chem. Biol. - 2005. - Vol. 9. - P. 459-456]. Природні штам-продуценти фосфогліколіпідів накопичують надзвичайно малі кількості антибіотика, що

ускладнює його практичне використання та дослідження з метою отримання клінічно цінних похідних.

Авторами вперше запропоновано використати ген *adpA<sub>gh</sub>* *S. ghanaensis* у складі плазмиди pTESaapA-expr, сконструйованої на основі інтегративного вектора pTES [Herrmann S., Siegl T., Luzhetska M., Petzke L., Jilg C., Welle E., Erb A., Leadlay P., Luzhetsky A. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes // Appl. Environ. Microbiol. - 2012. - Vol. 78, № 6. - P. 1804-1812] для підвищення біосинтезу фосфогліколіпідних антибіотиків моеноміцинового ряду. Запропонований підхід дасть змогу значно підвищити продукцію цієї групи вторинних метаболітів, оскільки білок *AdpA<sub>gh</sub>* є безпосереднім активатором транскрипції *моє-генів*. Також *AdpA<sub>gh</sub>* активує транскрипцію гена лейцил-тРНК<sup>UUA</sup> *bldA<sub>gh</sub>*, продукт якого декодує триплет ТТА. Наявність рідкісного кодону ТТА у кількох ключових *моє-генах* є одним з факторів, що обмежує їхню експресію, а отже і продукцію фосфогліколіпідів [Ostash B., Saghatelian A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol. - 2007. - vol. 14. - P. 257-267]. Надекспресія гена *adpA<sub>gh</sub>* забезпечить зростання пулу плейотропного регулятора *AdpA<sub>gh</sub>* у клітинах стрептоміцетів, внаслідок чого зросте рівень транскрипції генів, безпосередньо задіяних у біосинтезі антибіотика, що дасть змогу подолати це обмеження. Оскільки ортологи генів *adpA* є висококонсервативними серед актиноміцетів, їх можна вільно комбінувати між різними видами без втрати функціональної активності. Авторами також вперше запропоновано використати інтегративну плазмиду для надекспресії плейотропного регулятора під контролем сильного конститутивного промотора гена стійкості до еритроміцину *ermE*, що суттєво збільшує рівень експресії корисного гена і його позитивний вплив на продукцію антибіотика.

Фіг. 1 Хімічна будова моеноміцину А - основного представника фосфогліколіпідної родини.

Фіг. 2 Схема плазмиди pTESaapA-expr, де:

*aacA(3)IV* - ген стійкості до апраміцину,

*oriT* - ділянка кон'югаційного переносу плазмиди RK2,

*int* - ген інтегрази актинофага  $\phi$ C31,

*loxP* - ділянка впізнавання сайт-специфічної рекомбінази Cre,

*attP* - сайт інтеграції фага  $\phi$ C31,

*adpA* - ген *adpA<sub>gh</sub>*, клонований з хромосоми *S. ghanaensis* ATCC14672.

Спосіб можна проілюструвати прикладами:

Приклад із використанням штаму *S. ghanaensis* ATCC14672.

Три інші штами актиноміцетів, *S. lividans*, *S. coelicolor* та *S. albus*, використовуються і досліджуються аналогічно.

Для конструювання плазмиди pTESaapA-expr для надекспресії гена *adpA<sub>gh</sub>* застосовують полімеразну ланцюгову реакцію та за допомогою неї ампліфікують з хромосомної ДНК *S. ghanaensis* ATCC14672 фрагмент ДНК, розміром 1,4 т.п.н., що містить досліджуваний ген. Усі маніпуляції виконують згідно стандартних методик [Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. - 2001. - 450 P.] Для цього використовують пару праймерів *adpA\_exp\_for* (AAAGATATCACAAACCGAGGAGCCGCGACCA) та *adpA\_exp\_rev* (AAAGAATTCGCCTCCGGCCCCGTCCGGTGT), що містять штучно введені сайти впізнавання для ендонуклеаз рестрикції *EcoRV* та *EcoRI*, відповідно. Амплікон елюють з агарозного гелю відповідно до стандартних методик [Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. - 2001. - 450 P.]. Далі отриманий фрагмент ДНК та вектор pTES [Herrmann S., Siegl T., Luzhetska M., Petzke L., Jilg C., Welle E., Erb A., Leadlay P., Luzhetsky A. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes // Appl. Environ. Microbiol. - 2012. - Vol. 78, № 6. - P. 1804-1812] обробляють ендонуклеазами рестрикції *EcoRV* та *EcoRI*. Отримані лінійні фрагменти вектора та досліджуваного гена лігують між собою, далі отриману суміш трансформують компетентні клітини *E. coli* і проводять селекцію трансформантів за стійкістю до апраміцину у концентрації 25 мкг/мл згідно з стандартними методиками [Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. - 2001. - 450 P.]. У новоствореній плазмиді pTESaapA-expr транскрипція гена *adpA<sub>gh</sub>* перебуває під контролем *ermE<sub>p</sub>*, як зображено на фіг. 2.

Плазмидою pTESaapA-expr трансформують штам *E. coli* ET12567 (pUB307), який за рахунок *tra*-генів плазмиди pUB307 забезпечує кон'югативне 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  $OD_{600}=0,1$ , переносять у мікропробірки з об'ємом 1,5 мл і осаджують центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 1 хв. Зливають супернантант та клітини ресуспендують у 50 мкл середовища LB. Отриману суспензію клітин охолоджують у льоді 5 хв, додають 1 мл 0,1 М розчину  $CaCl_2$  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 0,1 М розчину  $CaCl_2$ . 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 °С, охолоджують та додають 1 мл середовища LB. Інкубують 2 год. при 37 °С для індукції експресії генів стійкості та висівають на чашки з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину. Чашки інкубують 16 год. при 37 °С, після чого трансформанти пересівають на свіже середовище LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину.

Плазмиду pTESaadpA-expr в *S. ghanaensis* ATCC14672 переносять шляхом міждової кон'югації з відповідним штамом *E. coli* ET12567 (pUB307).

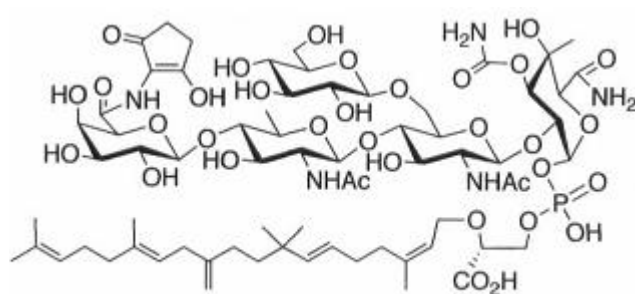
Суспензію спор штаму *S. ghanaensis* ATCC14672 висівають на вівсяне середовище (г/л: вівсяне борошно - 30, агар - 18, вода водопровідна - до 1 л, pH до стерилізації - 7,0; після стерилізації додають розчин хлориду магнію до кінцевої концентрації 40 мМ) та вирощують 7 діб при 37 °С для отримання спорової суспензії для кон'югаційних схрещувань. Штам *E. coli* ET12567 (pUB307) з плазмідною pTESaadpA-expr висівають на чашку з середовищем LA з 25 мкг/мл апраміцину та 50 мкг/мл канаміцину та вирощують 18 год. при 37 °С. Готують суспензію клітин у 4 мл середовища LB. Одночасно готують суспензію спор штаму *S. ghanaensis* ATCC14672 у 7 мл стерильного фізіологічного розчину та проводять тепловий шок при 50 °С протягом 10 хв. 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 вівсяним середовищем. Чашки інкубують 12-16 год. при 28 °С та заливають 1 мл водного розчину 25 мкг апраміцину та 50 мкг налідиксової кислоти.

Перевіряють рівень продукції фосфогліколіпідних антибіотиків транскон'югантом *S. ghanaensis* pTESaadpA-expr<sup>+</sup>. Штам висівають у 30 мл середовища TSB та вирощують протягом 5 діб при 37 °С. Біомасу осаджують за допомогою центрифугування, промивають водою та екстракують 7 мл метанолу протягом 14 год. Одночасно, на чашку із середовищем LA висівають репортерний штам *Bacillus cereus* ATCC19637 для отримання нічної культури. Екстракт випаровують і сухий залишок розчиняють у 100 мкл води. Одночасно на чашку із середовищем LA висівають суспензію клітин нічної культури *B. cereus*. На паперові диски Whatman діаметром 5 мм наносять 20 мкл водного розчину і потім накладають на щойно засіяний газон репортерного штаму. Чашки з дисками інкубують при 37 °С протягом 24 год. Кількість моеноміцинів у зразках визначають вимірюванням діаметру зон пригнічення екстрактом росту *B. cereus* та порівнянням із діаметрами пригнічення росту з використанням дисків із відомою кількістю моеноміцину *A. Транскон'юганти* продукують у 2,5 рази більше моеноміцинів ( $5,7 \pm 0,6$  мг/л ферментаційного середовища), ніж контрольний штам ( $2,3 \pm 0,3$  мг/л ферментаційного середовища).

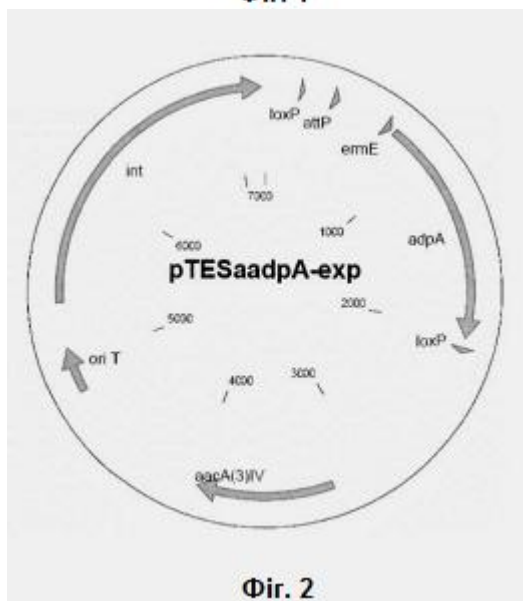
Перевіряють стабільність підтримання плазмиди pTESaadpA-expr у клітинах *S. ghanaensis* ATCC14672 за неселективних умов вирощування без використання селекції за стійкістю до апраміцину. Для цього засівають штам *S. ghanaensis* pTESaadpA-expr<sup>+</sup> у 30 мл середовища TSB та вирощують протягом 5 діб при 37 °С. Далі 300 мкл культури пересівають у нові колби з 30 мл TSB. Пересів повторюють три рази. 100 мкл культури з останнього пересіву послідовно розводять стерильною водою у  $10^6$  разів та висівають клітини на вівсяне середовище без додавання апраміцину. У результаті на чашці Петрі виростає 200-500 колоній. Згодом методом реплік перевіряють стійкість однієї тисячі окремих клонів до апраміцину, аналізуючи їх на вівсяному середовищі з додаванням антибіотика у концентрації 50 мкг/мл. Усі проаналізовані клони *S. ghanaensis* pTESaadpA-expr<sup>+</sup> зберігають фенотип стійкості до апраміцину та надсинтезують моеноміцини. Стовідсоткова стабільність успадкування плазмиди та підвищений рівень синтезу антибіотика підтверджують отримання передбачуваного результату.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб підвищення продукції антибіотиків моеноміцинового ряду, який базується на надекспресії генів плейотропних регуляторів у актиноміцетах-продуцентах цих антибіотиків, який **відрізняється** тим, що як регуляторний елемент використовують ген плейотропного регулятора транскрипції *adpA<sub>gh</sub>* *S. ghanaensis*, клонований у складі інтегративної плазмиди pTESaadpA-expr у штам *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* M1152, *S. albus* J1074.



Фиг. 1



Фиг. 2

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601