УДК: 575.224+577.21

ПЕРЕНЕСЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ МОЛЕКУЛ ДНК У КЛІТИНИ ШТАМІВ АКТИНОМІЦЕТІВ — ПРОДУЦЕНТІВ АНТИБІОТИКІВ

Д. О. Климишин[1], В. О. Федоренко[2]

[1]Інститут біології тварин УААН;
[2]Львівський національний університет імені Івана Франка

Узагальнено літературні експериментальні дані про опрацювання методів клонування генів у актиноміцетах — продуцентах антибіотиків. Проаналізовано особливості найпоширеніших методів перенесення рекомбінантних молекул ДНК у клітини актиноміцетів та проведено порівняння їхньої ефективності для різних видів цих бактерій. Наведено матеріали власних досліджень авторів, присвячених створенню ефективної системи перенесення екзогенних молекул ДНК у штами актиноміцетів.

Ключові слова: STREPTOMYCES, КОН'ЮГАЦІЯ, ТРАНСФОРМАЦІЯ ПРОТОПЛАСТІВ, ПРОТИПУХЛИННІ АНТИБІОТИКИ, САЙТ-СПЕЦИФІЧНА ІНТЕГРАЦІЯ, АКТИНОМІЦЕТИ.

Актиноміцети продукують широкий спектр біологічно активних сполук, зокрема більшість відомих антибіотиків [1–3]. Як ґрунтові мікроорганізми, актиноміцети відіграють важливу екологічну роль, однак увагу дослідників вони привертають, насамперед, як одні з найважливіших об'єктів біотехнології. Більше 60 % біологічно активних сполук мікробного походження та дві третини відомих на сьогоднішній день антибіотиків — це метаболіти актиноміцетів. Приблизно 80 % з них синтезують представники роду *Streptomyces*. Серед цих бактерій проводиться постійний пошук продуцентів нових антибіотиків. Це, насамперед, зумовлено розповсюдженням штамів мікроорганізмів — збудників інфекційних захворювань, резистентних до антибіотиків, що широко застосовуються у медицині [1].

Вивчення біосинтезу антибіотиків актиноміцетами є важливим завданням сучасної генетики та біотехнології. На сьогодні продукти вторинного метаболізму актиноміцетів є одними з найважливіших препаратів у хіміотерапії інфекційних і ракових захворювань людини, а також знайшли широке застосування у ветеринарії та сільському господарстві [1]. Детальне вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків дало змогу отримати штами з підвищеним рівнем біосинтезу цих сполук, а також їх модифіковані похідні [1, 2]. Проте, ускладнення, пов'язані з відсутністю ефективних систем клонування генів у багатьох продуцентах антибіотиків, не дають можливості у повному обсязі застосувати весь арсенал генно-інженерних методів для конструювання цих штамів [4–10]. Саме тому необхідно володіти ефективними методами перенесення екзогенних молекул ДНК в їхні клітини. Розробка таких методів робить можливим генно-інженерні маніпуляції з цими штамами *in vivo* і є надзвичайно актуальною проблемою [3, 4, 11].

На сьогодні найпоширенішою процедурою введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини бактерій роду *Streptomyces* є трансформація протопластів за наявності поліетиленгліколю (ПЕГ) [6, 7, 10, 12–14]. Для багатьох штамів стрептоміцетів цей метод виявився дуже ефективним [16–18]. Так, для модельних штамів генетики актиноміцетів — *S. lividans* та *S. coelicolor*, частота ПЕГ-залежної трансформації може досягати 10^6–10^7 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК розміром до 60 т.п.н. Лінійні плазміди з комплементарними «липкими» кінцями трансформуються із частотою, нижчою у 10–

100 разів. З низькою частотою трансформанти виникають і при використанні лінійних молекул ДНК з дефосфорильованими кінцями [17, 20, 21].

Можна виділити декілька основних етапів процесу отримання та генетичної трансформації протопластів: вирощування культур актиноміцетів, отримання протопластів, трансформація протопластів плазмідною ДНК, регенерація трансформованих протопластів з використанням регенераційних середовищ та селекція трансформантів.

Слід зазначити, що для багатьох стрептоміцетів ці етапи потребують значних модифікацій, що ускладнює ефективність цієї процедури. До того ж перенесення екзогенних ДНК з використанням ПЕГ-залежної трансформації в цілу низку штамів відбувається з достатньо низькою ефективністю, або не проходить взагалі [4, 7, 10, 11]. Це створює значні проблеми для застосування сучасних генно-інженерних підходів (спрямованого руйнування генів, гетерологічної експресії тощо) щодо цих штамів. Однією з основних причин неефективної трансформації протопластів є функціонування систем рестрикції-модифікації в клітинах реципієнтних штамів [4, 7, 10, 11, 23, 24]. У розроблених методиках генетичної трансформації актиноміцетів переноситься двониткова ДНК, яка після потрапляння в реципієнтні клітини актиноміцетів підлягає дії ендонуклеаз рестрикції. Ці ускладнення можна подолати за допомогою певних модифікацій методики трансформації. Альтернативною процедурою, яка може знизити рестрикційний бар'єр, може бути пригнічення активності ферментів рестрикції за допомогою теплового шоку протопластів перед трансформацією [4, 19, 22]. Отримання мутантів реципієнтних штамів стрептоміцетів по генах ендонуклеаз рестрикції також описане у літературі як спосіб підвищення частоти проходження трансформації [19]. Беручи до уваги той факт, що однониткова ДНК не підлягає дії ендонуклеаз рестрикції, деякі методи ґрунтуються на трансформації протопластів однонитковою ДНК, яку отримують методом лужної чи термічної денатурації [19]. Однак, для багатьох актиноміцетних штамів, що є продуцентами важливих антибіотиків (наприклад *S. nogalater* IMET43360, *S. globisporus* 1912, *S. kanamyceticus* 1 тощо), ці модифікації методики не підвищували ефективності трансформації протопластів. Недоліками методики трансформації протопластів є її значна тривалість, складність отримання та регенерації протопластів, висока імовірність інфікування суспензій протопластів сторонньою мікрофлорою тощо [4, 8, 23].

Цілком нові можливості для вивчення штамів актиноміцетів, особливо тих, для яких не вдалося застосувати методику трансформації плазмідною ДНК, з'явилися у кінці 1980-х років з відкриттям Мазодієром та співавторами кон'югаційного перенесення ДНК у схрещуваннях між *Escherichia coli* та різними штамами *Streptomyces* [14]. Цей метод можна поділити на декілька основних етапів: вирощування культур актиноміцетів та *E. coli*, проведення схрещування між клітинами донора та реципієнта, переривання схрещування та видалення клітин донора із середовища, відбір транскон'югантів.

Як донора у таких схрещуваннях використовували штам *E. coli* S 17-1, що містив похідну плазміди RP4, інтегровану в хромосому. Проте з цим донором не вдалося отримати транскон'югантів для низки актиноміцетних штамів, наприклад *S. clavurigerus, S. coelicolor* A(3)2 та ін. [10, 13]. К. Сміт запропонував новий підхід для проведення кон'югації *E. coli* зі штамами актиноміцетів, яким властиві потужні системи рестрикції — модифікації. Як донора запропоновано використовувати штам *E. coli* ET12567, що несе плазміду pUB307. Цей штам є дефектним за функцією метилування (*dam*-13::Tn9, *dcm*-6, *hsd*M). Плазміда pUB307 є похідною RK2 та знаходиться в автономному стані в клітинах *E. coli* ET12567 [27–29]. Ефективність методу підтверджено в експериментах із використанням як реципієнтів штамів *S. coelicolor* A(3)2 MT1110, який має високу рестрикційну активність, і *S. lividans* 66 [17]. Для перенесення використовували похідні інтегративного вектора pSET152 — pDJ50 і pDJ70, які містять ділянки з хромосомної ДНК *S. coelicolor* A(3)2 розмірами 5,8 — 2,1 т.п.н. відповідно. Донорами у схрещуваннях були штами *E. coli* S17-1 і *E. coli* ET12567 (pUB307).

Виявилось, що при використанні штаму *E. coli* ET12567 (pUB307) екскон'юганти *S. coelicolor* A(3)2 з'являлися в 10^4 разів частіше, ніж при використанні *E. coli* S17-1. Частота транскон'югантів *S. lividans* 66 також була вищою, коли донором служила *E. coli* ET12567 (pUB307). Автори пояснюють це тим, що в штамі *E. coli* ET12567 плазміда pUB307 знаходиться в автономному стані, а кількість її копій в клітині більша у 2–3 рази порівняно зі штамом *E. coli* S17-1 [17]. Ефективність цієї методики спочатку продемонстровано для модельних об'єктів генетики стрептоміцетів, а потім її модифікували щодо багатьох інших продуцентів антибіотиків [5–7, 10, 11, 13].

Важливе значення для ефективного проходження кон'югації має склад живильного середовища, на якому здійснюється схрещування. В оригінальній методиці Мазодієра та співавторів для кон'югації між *E. coli* і *S. lividans* використано агаризоване середовище LB, сприятливе для росту донора [28]. Проте для схрещувань з іншими штамами (*S. parvulus*, *S. aureofaciens*, *S. globisporus* та *S. kanamyceticus* тощо) використання цього середовища не дало позитивних результатів. Недоліком процедури був швидкий та інтенсивний ріст газону донора на цьому середовищі, що призводило до суттєвого гальмування розвитку субстратного міцелію реципієнтних штамів і практично повного їх видалення під час змивання газону *E. coli* [6, 7, 10, 11].

Ефективною виявилась методика кон'югації *E. coli* — *Streptomyces*, модифікована А. М. Лужецьким та співавторами. У ній для проведення схрещування і селекції екскон'югантів використали вівсяне середовище [6, 7, 10, 11], на якому спостерігався кращий ріст і спороутворення штамів *S. globisporus* 1912 і *S. kanamyceticus* 1. Це середовище забезпечує переваги для розвитку реципієнтної культури, а слабкий ріст газону донора дає змогу виключити етап його механічного видалення, що може супроводжуватись частковою або майже повною втратою клітин реципієнтних штамів актиноміцетів [7, 10, 11]. Частота утворення транскон'югантів *S. globisporus* 1912 та *S. kanamyceticus* 1 у таких схрещуваннях у середньому становила 10^{-3}–10^{-5}. Пізніше розроблено методики перенесення плазмідних молекул ДНК за допомогою кон'югації з *E. coli* в різні штами актиноміцетів, для яких властива низька частота утворення трансформантів (табл. 1.) [6, 7, 10, 11].

Кон'югативні плазміди поділяються на групи несумісності залежно від контролю їхньої реплікаціїї в клітинах мікрорганізмів [20, 30, 33, 34, 36, 37]. Показано, що приналежність плазмід до різних груп несумісності (IncPα, IncI1, IncFII, IncQ) позначається на ефективності проходження кон'югації між *E. coli* та штамами *Streptomyces* [9, 15, 25]. Ці плазміди відрізняються за нуклеотидними послідовностями їхніх *tra*-оперонів, розміщенням *tra*-генів, а також їхніх районів ініціації перенесення плазмід (*oriT)* [13]. Низкою авторів доведено, що використання плазмід групи несумісності IncPα є найперспективнішим для створення системи перенесення плазмідних ДНК з *E. coli* в штами стрептоміцетів, а основну роль при цьому відіграє плазміда RK2 [7, 10, 13]. Гени, які розміщені в цій плазміді і забезпечують кон'югаційне перенесення ДНК, розділені на дві окремі ділянки — TRA1 та TRA2. Ділянка TRA1 містить AT-багатий сайт *oriT*, з якого починається перенесення ДНК. Сайт *oriT* розміщений в протилежній орієнтації відносно *tra*-генів, які останніми входять в клітини реципієнта, а також формує послідовності для зв'язування специфічних білків за рахунок прямих та непрямих повторів у своїй структурі [33, 37].

Ділянка TRA1 також містить *tra*-гени, які контролюють перенесення ДНК у реципієнтні клітини. Спочатку відбувається зв'язування продуктів генів *traI*, *traJ* та *traH* з *oriT*. Одержаний нуклеопротеїновий комплекс називається релаксосомою, оскільки його утворення веде до однониткового розриву в сайті *oriT*. Після такого розриву продукт гена *traI* ковалентно зв'язується через гідроксильну групу тирозину з залишком фосфорної кислоти на 5′-кінці однониткової ДНК і забезпечує перенесення ДНК від донора до реципієнта [17, 20, 29].

У складі TRA1, крім генів, які контролюють утворення релаксосоми, наявні гени *traG* та *traF*, продукти яких забезпечують створення мембранного контакту між клітинами донора і реципієнта [17, 29].

Таблиця 1

Частоти перенесення плазмід pSET152, pSOK101, pSOK201 і pCHZ101 у клітини *Streptomyces* spp. [13]

Штами актиноміцетів	Антибіотик, який продукує штам	Частота отримання транскон'югантів		
		pSET152	pSOK101	pCHZ101
S. coelicolor A3(2)	актинородин	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
S. globisporus 1912	ландоміцин Е	10^{-4}	10^{-4}	—
S. kanamyceticus 1	канаміцин	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5}
S. fradiae Tu2717	урдаміцин	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
S. galilaeus HKI022	аклациноміцин	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
S. peucetius subsp. caesius ATCC27952	доксорубіцин	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
S .nogalater IMET 43360	ногаламіцин	—	10^{-5}	10^{-5}
S. parvulus IMET 41380	актиноміцин	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
S. caespitosus IMET 43411	мітоміцин	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}
S. noursei IMET3778	норзетрицин	10^{-5}	—	—
S. cyanogenus S136	ландоміцин А	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
S.argillaceus ATTC 12956	мітраміцин	10^{-5}	—	—
Saccharopolyspora erythrea NRRL2338	еритроміцин	10^{-4}	—	—

Примітка: * «—» експерименти не проводили

Решта генів, що контролюють утворення та підтримання мембранного контакту, розміщені в TRA2 (*trb*-гени) [17, 29]. У цій ділянці виявлено дванадцять відкритих рамок зчитування. Більшість продуктів цих генів є гідрофобними білками, що свідчить про їх мембранну локалізацію [26]. Спрямована інактивація генів з ділянки TRA2, що забезпечують мембраний контакт донора з реципієнтом, показала, що їхня експресія необхідна для ефективного проходження кон'югації [17, 26].

Для перенесення екзогенних молекул ДНК у клітини актиноміцетів створено велику кількість кон'югативних векторів із різними властивостями [7, 15, 18, 22, 26, 38, 39]. Наявність низки різних плазмідних векторів є необхідною умовою для успішного застосування сучасних методик генетичної інженерії актиноміцетів. Найважливіше значення для кон'югаційного перенесення мають космополітичні плазміди, які мають широке коло господарів серед різних видів актиноміцетів. Тому немає потреби у створенні окремої векторної системи перенесення генів для кожного окремого виду.

Обов'язковою вимогою для кон'югативних плазмід є наявність *oriT*-сайту, який забезпечує мобілізацію плазміди в клітини реципієнта. Плазміди, що не здатні автономно реплікуватися у штамах актиноміцетів, часто використовують для інактивації і гетерологічної експресії генів. Такі плазміди як pSET152, pRT801, pVWB (рис. 1.) позбавлені ділянки, що забезпечує їхню реплікацію в реципієнтних клітинах. Вони можуть підтримуватись в них лише за рахунок гомологічної рекомбінації з хромосомою реципієнта та інтеграції в неї [14, 21, 22, 24].

Важливе значення для генетичного конструювання актиноміцетних штамів мають також вектори, які здатні автономно реплікуватися в клітинах реципієнтів (рис. 2). Ці плазміди використовують для комплементації мутацій в хромосомі за допомогою клонованих генів, збільшення кількості копій генів у клітині, заміни одних алелів генів на інші (наприклад, диких на мутантні) [22]. Проте, після перенесення таких векторів у різні

штами актиноміцетів часто спостерігається їхнє нестабільне успадкування за відсутності селекції, спрямованої на підтримання таких плазмід у клітині. Це значно ускладнює дальше використання штамів з цими плазмідами. Наприклад, застосування штамів мікроорганізмів, створених на основі реплікативних плазмід, є обмеженим у промисловому виробництві антибіотиків. Такі ускладнення зумовлені структурними перебудовами цих плазмід, а також із високою частотою їх втрат реципієнтними штамами під час вирощування у промислових ферментерах. Тому широке використання мають плазміди, які володіють функцією сайт-специфічної інтеграції в хромосому актиноміцетів [14, 21, 22, 24].

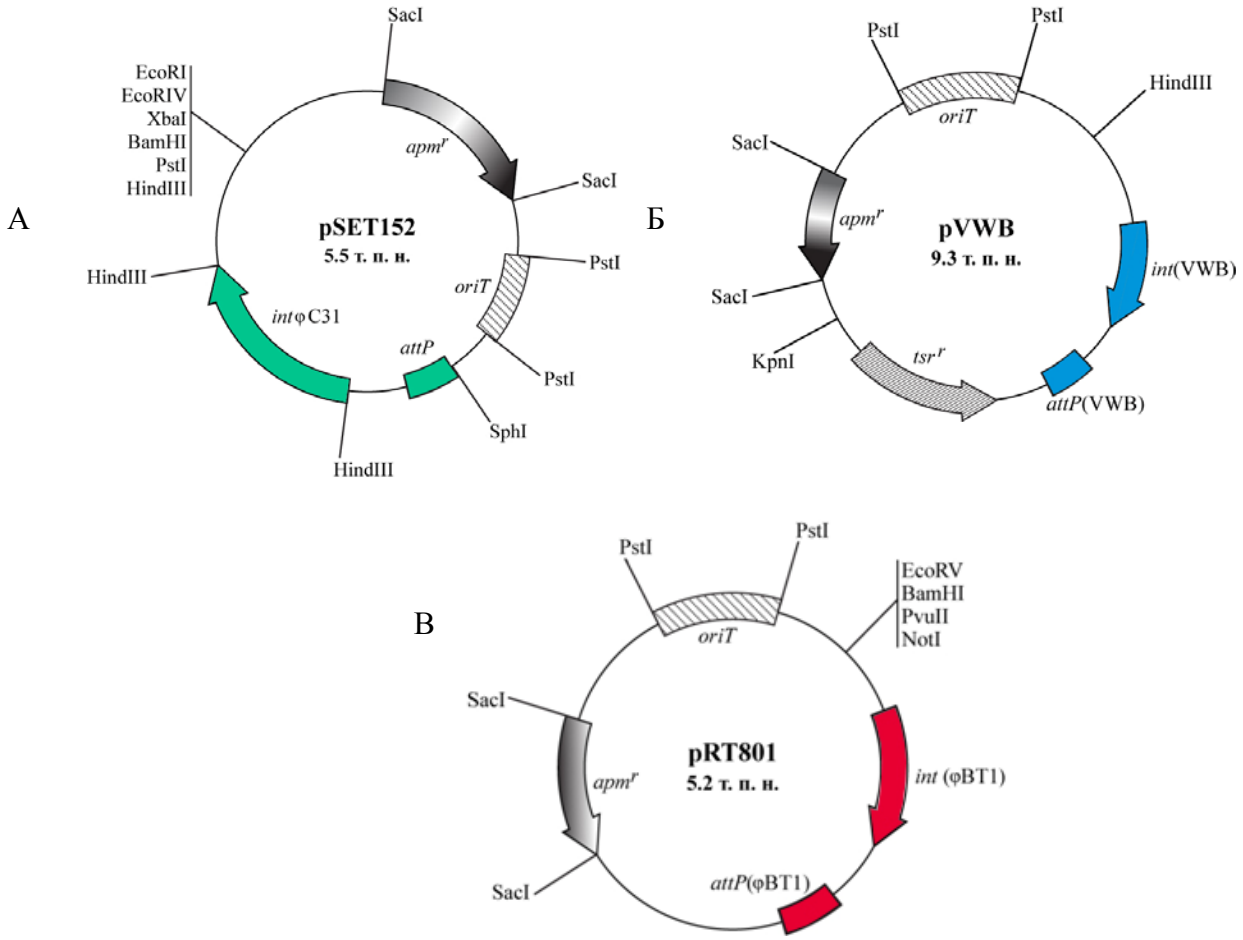


Рис. 1. Будова кон'югативних інтегративних плазмід pSET152 (А), pVWB (Б) та pRT801 (В). *oriT* — ділянка, що відповідає за ініціацію кон'югативного перенесення; *apm*^{r} — ген стійкості до апраміцину, *tsr*^{r} — ген стійкості до тіострептону, *int*φC31, *int*(VWB), *int*(φBT1) — гени фага φC31, VWB та BT1, що забезпечують інтеграцію плазмід pSET152, pVWB та pBT1 у хромосому реципієнтних штамів [22].

Для більшості плазмід, що здатні до сайт-специфічної інтеграції, характерне стабільне успадкування за відсутності селективного тиску [6, 7, 11, 13]. Особливістю інтегративних плазмід є наявність фрагменту, який містить *attP*-сайт та ген *int*, що забезпечують сайт-специфічну інтеграцію плазміди в хромосому, що є необхідним для реплікації плазміди. Для такої інтеграї обов'язковим є наявність відповідного *attB*-сайту в хромосомі актиноміцетів. Розміщення та кількість *attB*-сайтів є видоспецифічними ознаками і варіює від виду до виду [7, 11, 13]. Так, кількість attB-сайтів плазмід, які використовують для сайт-специфічної інтеграції систему фага φC31 відрізняються — у S. coelicolor A3(2) є один attB-сайт, у *Sacharopolyspora spinosa* — два, а у *S. nogalater* IMET43360 — жодного [6]. Широке коло актиноміцетних штамів, у хромосому яких відбувається сайт-специфічна інтеграція, відкриває можливості для використання інтегративних плазмідних векторів у генно-

інженерних маніпуляціях з актиноміцетами з метою конструювання штамів продуцентів нових антибіотиків [6, 7, 13].

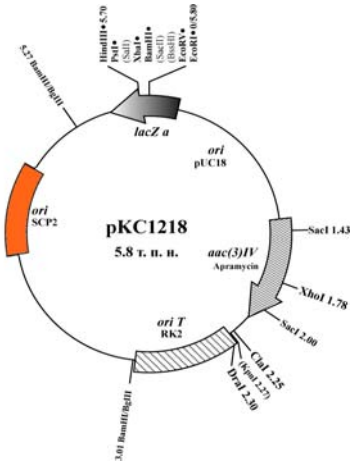
Однією з проблем, які перешкоджають ефективному використанню інтегративних плазмід, є зміна ознак рекомбінантних штамів внаслідок їх включення в хромосому, зокрема може змінюватись біосинтез ними антибіотиків та інші ознаки [6, 13, 34]. Проведено аналіз ознак штамів *S. hygroscopicus* і *S. aureofaciens* і їхніх транскон'югантів, що несли плазміду pTO1 [17]. Виявлено суттєві відмінності в характері впливу інтегрованої плазміди на процес розвитку та диференціювання міцелію досліджуваних штамів. Натомість після інтеграції pTO1 у хромосому *S. aureofaciens* не спостерігали змін морфології колоній, швидкості росту та диференціації культури, а також інших культурально-морфологічних ознак. Екскон'юганти зберігали антибіотичну активність на рівні вихідного штаму. Одночасно, внаслідок інтеграції pTO1 у хромосому *S. hygroscopicus* у транскон'югантів відбуваються зміни вищеперелічених ознак — різке сповільнення швидкості росту і диференціації колоній агаризованих середовищах. Колонії транскон'югантів мають менші розміри, сповільний розвиток повітряного міцелію і спороутворення порівняно з вихідним штамом [17]. Якісна і кількісна оцінка антибіотичної продуктивності транскон'югантів *S. hygroscopicus* вказує на суттєве зниження рівня антибіотикоутворення під час культивування у рідких і твердих середовищах. Концентрація антибіотика в культуральній рідині після ферментації транскон'югантів становила 50 % від рівня вихідного штаму [17].

Подібні результати спостерігали після інтеграції плазміди pSET152 у хромосому *S. globisporus* 1912 та *S. kanamyceticus* 1 [7, 11]. Для транскон'югантів *S. globisporus* 1912, що містять плазміду pSET152, властиве суттєве зниження рівня продукції ландоміцину E (на 50–90 % порівняно із вихідним штамом). Транскон'юганти *S. kanamyceticus* 1, що містять плазміду pSET152, не виявляють антибіотичної активності щодо тест-культури *Bacillus mycoides*. Подальші дослідження показали, що плазміда pSET152 не інтегрується в структурні гени біосинтезу канаміцину. Інтеграція цієї плазміди проходить у ділянки ДНК біля генів, задіяних у глобальній регуляції метаболізму клітини. Очевидно, що інтеграція плазміди pSET152 в ці ділянки впливала на рівень їхньої експресії і це, в свою чергу, призвело до пригнічення біосинтезу канаміцину [13].

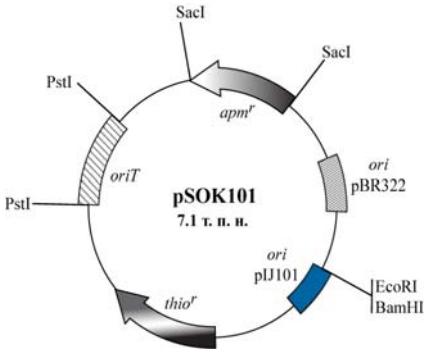
У геномах *S. globisporus* 1912 і *S. kanamyceticus* 1 було виявлено по два *attB*-сайти інтеграції φC31, а копії плазміди pSET152 могли перебувати одночасно як в інтегрованому, так і в автономному станах [7, 11]. Доведено можливість вторинної інтеграції pSET152 за гомологією в послідовності плазмідної ДНК, що були попередньо інтегровані в хромосому цих штамів сайт-специфічно [13]. Вважається, що після інтеграції pSET152 в *attB*-сайт хромосоми ген *int* відділяється від свого промотора, що ускладнює його експресію, необхідну як для інтеграції, так і для ексцизії плазміди [13]. При вторинних інтеграціях ген *int* залишається інтактним, тому ті копії плазміди, які інтегрувалися унаслідок гомологічної рекомбінації в послідовності плазмідної ДНК попередньо інтегрованої сайт-специфічно, здатні з високою ймовірністю вирізатися з хромосоми [13].

Після інтеграції в його хромосому *S. nogalater* IMET43360 плазміди pVWB спостерігали пригнічення синтезу антрациклінового антибіотика ногаламіцину. Ця плазміда містить ген *int* та *attP*-сайт бактеріофага VWB. Рівень синтезу антибіотика у штамів *S. nogalater,* що містили плазміду pVWB інтегровану в хромосому, був зниженим на 50 % порівняно з диким типом [6].

А



Б



В

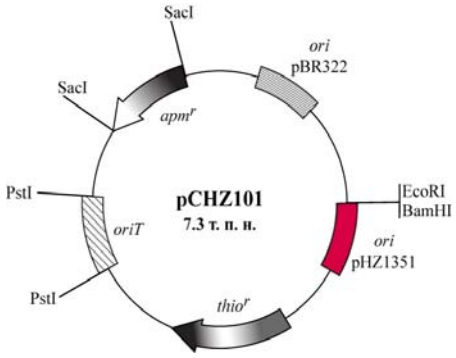


Рис. 2. Будова кон'югативних реплікативних плазмід pSOK101 (А), pKC1218 (Б), pCHZ101 (В). *oriT* — ділянка, що відповідає за ініціацію кон'югативного перенесення; *apm*^{r} — ген стійкості до апраміцину, *tsr*^{r} — ген стійкості до тіострептону, *ori* pBR322, *ori* pIJ101 — ділянки початку реплікації плазміди pSOK101 у клітинах *E. coli* та актиноміцетів, *ori* pHZ101 — ділянка початку реплікації плазміди pCHZ101 у клітинах актиноміцетів, *ori* SCP2 — ділянка початку реплікації плазміди pKC1218 у клітинах актиноміцетів [22].

Пригнічення продукції антибіотиків у результаті сайт-специфічної інтеграції плазмід показано для деяких штамів актиноміцетів, проте однозначного пояснення цього факту поки що не існує [6, 13, 31]. Вважають, що сайт-специфічна інтеграція може спричиняти хромосомні перебудови, які впливають на продукцію антибіотиків [24, 31]. Для низки інтегративних плазмід, здатних до інтеграції в хромосому актиноміцетних штамів, доведено, що їхні *attB*-сайти розміщені в генах тРНК [13]. Можливо, зміна пулу тРНК у клітинах унаслідок інтеграції може впливати на біосинтез антибіотиків [13]. Подолати ускладнення, пов'язані з пригніченням продукції антибіотиків у результаті сайт-специфічної інтеграції плазмід, можна використавши вектори з різними системами інтеграції в хромосому реципієнтних штамів [6, 7, 13]. Наприклад, негативний вплив інтеграції плазміди pSET152 на синтез антибіотиків штамами *S. globisporus* 1912 і *S. kanamyceticus* вдалося оминути, використавши кон'югативний вектор pVWB, а пригнічення біосинтезу ногаламіцину — плазміду pRT801 [6, 7, 11, 13]. Інтеграція цих плазмід у хромосоми досліджуваних штамів не впливала на синтез ними антибіотиків [6, 13, 37].

Суперечливі дані існують щодо впливу розміру плазмід на ефективність кон'югації [6, 13, 18]. Для кон'югації *E. coli* з продуцентом тилозину *S. fradiae* ATCC157, було доведено, що при використанні плазмід розміром менше 5,5 т.п.н частота екскон'югантів у 100–1000 разів вища, ніж великих — розміром від 20 т.п.н, чи космід розміром більше 45–50 т.п.н. При кон'югаційному перенесенні в системі *E. coli — Sacch. spinosa* такого ефекту не помічено. Так, косміда розміром 37 т.п.н. передавалася з такою ж ефективністю, як і плазміда, що мала розміри 5,5 т.п.н. [18, 22].

Присутність плазмід, які автономно реплікуються в штамах актиноміцетів (pKC1218, pCHZ101, pSOK101 та ін.), зазвичай, не впливає на процеси морфологічної диференціації культури та продукцію антибіотиків. Проте нестабільне успадкування цих плазмід ускладнює їхнє використання у генетиці актиноміцетів. Інтегративні плазміди в більшості випадків стабільно успадковуються в реципієнтних штамах, забезпечуючи ефективне успадкування досліджуваних генів, але сайт-специфічна інтеграція плазміди в хромосому може мати негативний вплив на продукцію антибіотиків. Це змушує вивчати вплив автономних та інтегративних плазмід на властивості рекомбінантних штамів у кожному конкретному випадку.

Успішне перенесення рекомбінантних молекул ДНК за допомогою кон'югації з *E. coli* у штами, для яких властива низька частота одержання трансформантів, надало можливість більш детально дослідити шляхи біосинтезу багатьох важливих біологічно активних сполук. Ці дослідження дали змогу отримувати штами — продуценти нових антибіотиків, що характеризуються покращеними фармакокінетичними властивостями, а також штами із підвищеним рівнем синтезу антибіотиків, що мають важливе значення у хіміотерапії інфекційних і ракових захворювань людини та тварин. Висока ефективність кон'югації в системі *E. coli — Streptomyces* зробило цей метод ефективним інструментом для конструювання «гібридних» сполук. Так, експресія гена *urdM*, що кодує 12b-оксигеназу урдаміцину A у *S. fradiae* Tu2717 в продуцентах ландоміцинів *S. globisporus* 1912 та *S. cyanogenus* S136, у складі плазміди pKC1218E*urdM,* привело до продукції нових сполук — C12-гідроксильованих ландоміцинів. Використовуючи опрацьовану методику кон'югаційного перенесення рекомбінантних молекул ДНК з *E. Coli,* стало можливим проводити експерименти із спрямованої інактивації генів біосинтезу ландоміцинів, урдаміцинів, доксорубіцину та інших антибіотиків. Це дало можливість більш детально вивчати функціонування цих генів. Зокрема, було вивчено гени *lndI* та *lanI*, що контролюють продукцію ландоміцинів E та A, відповідно у *S. globisporus* 1912 та *S. cyanogenus* S136 на рівні шлях-специфічної регуляції структурних генів [3, 40]. Одержані дані використано для створення підходів до отримання штамів із підвищеною продукцією ландоміцинів за рахунок генно-інженерних маніпуляцій із дослідженими регуляторними генами [40].

Таким чином система перенесення плазмідних ДНК з *E. coli* в штами актиноміцетів тепер є більш перспективним методом, ніж ПЕГ-залежна трансформація протопластів. Кон'югація в системі *E. coli* — *Streptomyces* має низку переваг над трансформацією протопластів: цей метод є значно простішим і не потребує складних методик отримання та регенерації протопластів, рестрикційні бар'єри реципієнтних штамів можна подолати при перенесенні однониткових молекул ДНК, можливість використовувати широке коло кон'югативних плазмід, здатних підтримуватись в клітинах актиноміцетів. На основі цього методу перенесення рекомбінантних ДНК може бути створена ефективна система клонування генів у штамах актиноміцетів, для яких властива низька частота утворення трансформантів плазмідною ДНК. Проте, слід зазначити, що умови проходження кон'югації для різних штамів актиноміцетів відрізняються, тому оптимальні умови схрещування (розмір векторів, що переносяться, час переривання схрещування, час вирощування реципієнтних штамів тощо) слід окремо підбирати в кожному конкретному випадку. Розроблені методи перенесення рекомбінантних молекул ДНК у клітини стрептоміцетів дають змогу ефективно використовувати весь арсенал генно-інженерних маніпуляцій з продуцентами антибіотиків.

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати сприятимуть глибшому розумінню закономірностей експресії генів вторинного метаболізму стрептоміцетів, опрацюванню методів одержання штамів-надпродуцентів біологічно активних сполук та отриманню нових антибіотиків.

D. O. Klymyshin, V. O. Fedorenko

TRANSFER OF RECOMBINANT DNA INTO THE ACTINOMYCETES STRAINS — THE PRODUCERS OF ANTIBIOTICS

S u m m a r y

In this work was analyzed the investigation of gene cloning system in antibiotic producers strains. The data about the widespread methods of recombinant DNA transfer into different species of *Streptomyces* genus was generalized. The affectivity of these methods was also comparing. The materials of the own investigations of the authors about the transfer of recombinant DNA into *Streptomyces* spp. were demonstrated.

Д. А. Климишин, В. А. Федоренко

ПЕРЕНОС РЕКОМБИНАНТНИХ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ ШТАМОВ АКТИНОМИЦЕТОВ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

А н н о т а ц и я

Обобщены опубликованные в литературе экспериментальные данные о разработке методов клонирования генов в актиноміцетах — продуцентах антибиотиков. Проаназированы особенности наиболее распространенных методов переноса рекомбинантных молекул ДНК в клетки актиномицетов и приведено сравнение их эффективности для разных видов этих бактерий. Представлены материалы собственных исследований авторов, посвященных созданию еффективной системы переноса екзогенных молекул ДНК в штаммы актиномицетов.

1. *Hopwood D. A.* Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico / D. A. Hopwood // Microbiol. — 1999. — V. 145. — P. 2183–2202.

2. *Hopwood D. A.* Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual / D. A. Hopwood, M. J. Bibb, K. F. Chater et al. — Norwich : The John Innes Foundation, 1985. — 356 p.

3. *Rebets Y.* DNA binding activity of LndI protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 / Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. // Microbiology. — 2005. — V. 151. — P. 191–200.

4. *Аравіцька О.* Отримання та генетична трансформація протопластів штаму *Streptomyces nogalater* IMET 43360 / О. Аравіцька, Д. Климишин, О. Громико та ін. // Вісник Львів. ун-ту. — 2008. — Т. 48. — С. 69–74. — (Сер. біол.)

5. *Воейкова Т. А.* Конъюгативный перенос плазмид из *Eschericha coli* в различные штаммы порядка *Actinomycetales* / Т. А. Воейкова // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 12. — С. 1626–1633.

6. *Климишин Д.* Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli — Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК в штам *Streptomyces nogalater* IMET 43360 / Д. Климишин, О. Громико, В. Федоренко // Цитологія і генетика. — 2007. — Т. 41. — С. 263–267.

7. *Лужецкий А. Н.* Межродовая конъюгация *Escherichia coli — Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 и ее производных / А. Н. Лужецкий, Б. Е. Осташ, В. А. Федоренко // Генетика. — 2001. — Т. 37. — С. 1340–1347.

8. *Мацелюх А. Б.* Генетична трансформація штаму *Streptomyces globisporus* 1912: рестрикційний бар'єр і сумісність плазмід / А. Б. Мацелюх // Мікробіол. журн. — 2001. — Т. 63, № 1. — С. 15–22.

9. *Lanka E. B.* DNA procesing reactions in bacterial conjugation / E. Lanka, B. Wilkins // Annu. Rev. Biochem. — 1995. — V. 64. — P. 141–169.

10. *Luzhetskyy A.* Gene cloning system for *Streptomyces cyanogenus* S136 / A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, D. Hoffmeister et al. // Вісн. Львів. ун-ту. — 2002. — Вип. 29. — С. 62–68. — (Серія біол.)

11. *Luzhetskyy A.* Conjugal transfer of plasmid DNA from *Esherichia coli* to *Streptomyces kanamyceticus*: effects of chromosomal insertions on kanamycin production / A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, D. Hoffmeister et al. // VAAM Workshop «Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten». — Freiburg, 2003. — V. 3. — P. 27.

12. *Табаков В. Ю.* Межродовая коньюгация *Escherichia coli — Streptomyces* как способ передачи коньюгативных плазмид в продуценты антибиотиков хлортетрациклина и биалафоса / В. Ю. Табаков, Т. А. Воейкова, И. Л. Токмакові та ін. // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 1. — С. 57–61.

13. *Luzhetskyy A.* IncP plasmids are most effective in mediating conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* / A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, O. Gromyco et al. // Russ. J. of Genet. — 2006. — V. 42. — P. 476–481.

14. *Mazodier P.* Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces species* / P. Mazodier, R. Petter, C. Thompson // J. Bacteriol. — 1989. — Vol. 171. — P. 3583–3585.

15. *Pettis S. G.* Plasmid transfer and expression of the transfer (*tra*) gene product of plasmid pIJ101 are temporally regulated during the *Streptomyces lividans* life cycle / S. G. Pettis, N. S. Cohen // Mol. Microbiol. — 1996. — V. 19. — P. 1127–1135.

16. *Davies J* Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *E. coli* to *S. lividans* / J. Davies, E. D. Gormley // J. Bacteriol. — 1991. — V. 18. — P. 6705–6708.

17. *Flett F.* High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl-DNA-restricting *Streptomycetes* / F. Flett, V. Mersinias, C. P. Smith // FEMS Microbiol. Lett. — 1997. — V. 155. — P. 223–229.

18. *Hopwood D. A.* Conjugative plasmids of *Streptomyces* / D. A. Hopwood, T. Kieser // Bacterial Conjugation. — New York : Plenum Press, 1993. — P. 293–311.

19. *Шевченко А. А.* Изучение слияния протопластов *Streptomyces antibioticus* / А. А. Шевченко, Б. П. Мацелюх // Генетика. — 1988. — Т. 24, № 11. — С. 1940–1946.

20. *Hopwood D. A. Streptomyces* plasmids: their biology and use as cloning vectors / D. A. Hopwood, T. Kieser, D. J. Lidiate et al. // Microbiol. — 1986. — Vol. 9. — P. 159–167.

21. *Jmamoto H.* Transformation of *Sacch. erythrea* / H. Jmamoto, H. Maurer, C. G. Hutchinson // J. of Antibiot. — 1986. — V. 39. — P. 1304–1313.

22. *Kieser T.* Practical *Streptromyces* genetics / T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner et al. — Norwich : John Innes Foundation, 2000. — 634 p.

23. *Baltz R. H.* Protoplast fusion in *Streptomyces*: condition for efficient genetic recombination and cell regeneration / R. H. Baltz, P. Matsushima // J. Gen. Microbiol. — 1981. — V. 127. — P. 137–146.

24. *Van Mellaert L.* Site-specific integration of bacteriophage VWB genom into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector / L. Van Mellaert, L. Mei, E. Lammertyn et al. // Microbiology. — 1988. — Vol. 144. — P. 3351–3358.

25. *Smith M. C.* The complete genome sequence of *Streptomyces* phage phiC31: evolutionary relationships to other viruses / M. C. Smith // Nucl. Ac. Res. — 1999. — V. 27. — P. 2145–2155.

26. *Bates S.* IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the *tra2* mating system / S. Bates, A. M. Cashmore, B. M. Wilkins // Bacteriol. — 1998. — V. 180. — P. 6538–6543.

27. *Bibb M. J.* Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency / M. J. Bibb, J. M. Ward, D. A. Hopwood // Nature. — 1978. — V. 274. — P. 398–400.

28. *Bierman M.* Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *E. coli* to *Streptomyces* spp. / M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien. et al. // Gene. — 1992. — V. 116. — P. 43–49.

29. *Silverman M. P.* Towards a structural biology of bacterial conjugation / M. P. Silverman // Mol. Microbiol. — 1997. — V. 23. — P. 423–429.

30. *Brasch M. A.* Sequences essential for replication of plasmid pIJ101 in *Streptomyces lividans* / M. A. Brasch, S. N. Cohen // Plasmid. — 1995. — V. 33. — P. 191–197.

31. *Brown D. P.* Site-specific integration in *Saccharopolyspora erythraea* and multisite integration in *Streptomyces lividans* of actinomycete plasmid pSE101 / D. P. Brown, S.-J. D. Chiang, J. S. Tuan et al. // J. Bacteriol. — 1988. — Vol. 170. — P. 2287–2295.

32. *Combes P.* The streptomyces genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the (*phi*) C31-encoded site-specific recombination system / P. Combes, R. Till, S. Bee et al. // J. Bacteriol. — 2002. — Vol. 184. — P. 5746–5752.

33. *Courvalin P.* Transfer of antibiotic resistansce genes between gram-positive and gram-negative bacteria / P. Courvalin // Antimicrobal Agents and Chemotherapy. — 1994. — V. 38. — P. 1447–1451.

34. *Kuhstoss S.* Analysis of the integration function of the *Streptomyces* bacteriophage *phiC31* / S. Kuhstoss, R. N. Rao // J. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 222. — P. 897–908.

35. *Pettis S. G.* Transfer of the pIJ101 plasmid in *Streptomyces lividans* requires a *cis*-acting function dispensable for gene transfer / S. G. Pettis, N. S. Cohen // Mol. Microbiol. — 1994. — V. 13. — P. 955–964.

36. *Syvanen M.* Horisontal gene transfer: evidence and possible consequences / M. Syvanen // Annu. Rev. Genet. — 1994. — V. 28. — P. 237–261.

37. *Pettis S. G.* Complementation of conjugation functions of *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 by the related *Streptomyces* plasmid pSB24.2 / S. G. Pettis, S. Prakash // J. Bacteriol. — 1999. — V. 181. — P. 4680–4685.

38. *Zotchev S. B.* Identification of a methyl-specific restriction system mediated by a conjugative element from *Streptomyces bambergiensis* / S. B. Zotchev, H. Schrempf, C. R. Hutchinson // J. Bacteriol. — 1995. — V. 177. — P. 4809–4812.

39. *Zotchev S. B.* The linear *Streptomyces* plasmid pBL1: analyses of transfer functions / S. B. Zotchev, H. Schrempf // Mol. Gen. Genet. — 1994. — V. 242. — P. 374–382.

40. *Rebets Y.* Production of landomycins in strains *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators / Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. // FEMS Microbiol. Lett. — 2003. — V. 222. — P. 149–153

41. *Ylihonko K.* A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway / K. Ylihonko, J. Tuikkanen, S. Jussila et al. // Mol. Gen. Genet. — 1996. — V. 251. — P. 113–120.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, д. б. н., професор Янович В. Г.