

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ВІРУСОЛОГІЇ  
ім.Д.К.ЗАБОЛТНОГО

На правах рукопису

ПОЛІЩУК  
Людмила Василівна

**ПОЗАХРОМОСОМНА СПАДКОВІСТЬ  
*STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912**

03.00.07. - мікробіологія

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук.

КИЇВ - 1995

579

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00761637 (U)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетики мікроорганізмів  
Інституту мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного  
НАН України.

**Науковий керівник** - доктор біологічних наук, професор  
член-кор. НАНУ Мацелюх Б.П.

**Офіційні опоненти** - доктор біологічних наук, професор  
Менджул М.І.  
доктор біологічних наук, професор  
Малюта С.С

**Провідна організація** - Київський Університет  
ім. Т.Г.Шевченка,  
кафедра мікробіології.

Захист відбудеться 20 грудня 1995 року о 10<sup>00</sup> годині  
на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 01.81.01 при  
Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН  
України ( 252143, Київ 143, вул.Заболотного,154, Інститут мікро-  
біології та вірусології НАН України, зал засідань)

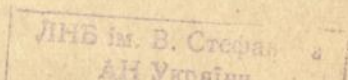
З дисертацією можна ознайомитись в науковій бібліотеці  
Інституту мікробіології та вірусології НАН України

Автореферат розіслано "17" *листопада* 1995 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

*Пуріш* -

Пуріш Л.М.



## ВСТУП

Актуальність теми. Плазмідні стрептоміцети - необов'язкові позахромосомні генетичні елементи клітини, які широко поширені у представників цієї родини мікроорганізмів. Вони виконують важливі біологічні функції, надаючи клітинам ряд фенотипових ознак. Плазмідні сприяють обміну генетичною інформацією між штамми одного і різних видів роду і виживанню клітин стрептоміцетів в особливих умовах існування.

Стрептоміцети - це головні промислові продуценти антибіотиків. У зв'язку з участю плазмід стрептоміцетів в синтезі і регуляції утворення антибіотиків, ці носії позахромосомної спадковості стали об'єктом глибокого і всебічного вивчення в багатьох лабораторіях світу.

Важливе теоретичне і практичне значення надається плазмідам стрептоміцетів в наш час як векторам в генноінженерних роботах, що відкривають широкі перспективи у вивченні структури та функцій генів хромосом стрептоміцетів та конструювання високо активних продуцентів цінних антибіотиків, ферментів, білків тощо.

Мета і завдання роботи. Метою даної роботи було виділення та вивчення фізичної організації плазмід рSG1912 штаму *Streptomyces globisporus* 1912; з'ясування біологічних функцій і фенотипових ознак, що детермінуються нею; вивчення хімічної природи, фізичних та біологічних властивостей речовин, синтез яких детермінується цим позахромосомним елементом.

Для виконання роботи необхідно було вирішити такі задачі:

1. дослідити наявність плазмідної ДНК у 30 штамів стрептоміцетів і відібрати перспективний для подальшої роботи штам;
2. визначити біологічні функції і фенотипові ознаки, що детермінуються плазмідною рSG1912 у штаму-хазяїна;

3. побудувати рестрикційну карту плазмиди pSG1912 і локалізувати на ній мініреплікон;

4. визначити фізичні властивості і спектр дії антибіотиків, синтез яких детермінується плазмідною рSG1912.

#### **ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:**

1. Штам *S.globisporus* 1912 є носієм плазмиди pSG1912 (11,2 тпн), яка детермінує Ltz<sup>+</sup>-фенотип та синтез речовин антрациклінової природи, стійкість до них та антибіотика норсетрицина.

2. Побудована рестрикційна карта плазмиди pSG1912, визначено розмір мініреплікона та його локалізацію на рестрикційній карті плазмиди.

3. Встановлено, що *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) синтезує речовини антрациклінової природи, які мають здатність пригнічувати ріст грампозитивних мікроорганізмів та пухлин.

Наукова новизна. На даний час достовірно відомо, що синтез тільки метиленоміцину А та стійкість до нього детермінується плазмідами (SCP1 і pSV1) (Chater and Bruton, 1985; Kinash et al., 1987). У ряді публікацій повідомляється, що синтез антибіотиків пенталенолактона (*S.arenae* TU469) та ласолоціда (*S.lasaliensis*) та стійкість до них детермінується позахромосомними елементами (Kinash et al., 1987; Braxerthaler and Poetsch, 1991).

Нами проведено вивчення детермінації синтезу антибіотиків антрациклінової природи у штама *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) та

- доказано детермінацію плазмідною рSG1912 Ltz<sup>+</sup>-фенотипу, синтезу антибіотичних речовин і стійкості до них та до антибіотика норсетрицина;

- досліджений спектр дії метаболітів, що синтезується *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) і виявлена пригнічувальна дія їх на грампозитивні мікроорганізми та пухлини.

Практичне значення. Плазмідна рSG1912 має велику копійність, стабільно зберігається в культурі та детермінує ряд фенотипових властивостей. При побудові її рестрикційної карти встановлено наявність унікальних сайтів впізнання для 4 рестриктаз. Все це робить можливим використання плазмідної рSG1912 для побудови на її основі векторів клонування для стрептоміцетів. Штам *S.globisporus* 1912 (рSG1912<sup>+</sup>) синтезує вторинні метаболіти, що належать до антрациклінових речовин. Багато речовин цього класу мають практичне застосування в медицині для терапії онкозахворювань. Речовини, синтезовані *S.globisporus* 1912 (рSG1912<sup>+</sup>) здатні пригнічувати ріст пухлин. Після подальшого вивчення вони можливо знайдуть застосування в медицині.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися і обговорювалися на Y1 з'їзді УТГІС (Полтава, 1992), на Першій генетичній конференції країн Балтики (Вільнюс, 1992), на I (Установчому) з'їзді УМО (Одеса, 1994), на 9 Міжнародному симпозиумі з біології актиноміцетів (Москва, 1994).

Публікація результатів роботи. Основні положення роботи викладені у 7 друкованих працях.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів, їх обговорення, висновків та списку літератури, який включає 267 найменувань. Робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту та містить 6 малюнків, 23 фотографії та 28 таблиць.

## **З М І С Т Р О Б О Т И**

Огляд літератури. Наведені сучасні дані з питань хромосомної та позяхромосомної спадковості стрептоміцетів: взаємодії плазмідної та хромосомної ДНК в різні фази розвитку міцелію, розповсюдженості позяхромосомної спадковості у представників цього роду мікроорганізмів та про будову плазмід стрептоміцетів і функції, які детермінуються ними.

Також наведені відомості про антрациклінові антибіотики: їх продуцентів, властивості та значення для хіміотерапії пухлин.

### Експериментальна частина.

Матеріали і методи. В роботі досліджувались 30 штамів стрептоміцетів, що належать до глобіспоринової групи непігментованих культур *Streptomyces*. Вони були виділені із зразків ґрунту співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ. Використовувались також штами стрептоміцетів, ентеробактерій, бацил, нокардій та дріжджів з колекції відділу генетики мікроорганізмів ІМВ НАНУ.

Середовища та умови культивування мікроорганізмів підбиралися відповідно до задач експерименту, враховуючи потреби мікроорганізмів (Маниатис и др., 1984, Okanishi et al., 1974; Hopwood et al., 1985).

Виділення плазмідної та тотальної ДНК з клітин мікроорганізмів проводили за методами Бірнбойма і Долі та Кайзера (Birnboim and Doly, 1979; Kieser, 1984), в які було внесено деякі модифікації. Електронна мікроскопія плазмідної ДНК та визначення контурної довжини молекул плазмідної ДНК проводили за допомогою метода, запропонованого Девісом (Devis et al., 1971). Стандартом довжини була плазміда pBR322, розміром 4,36 тпн (Sutcliffe, 1987).

Розділення плазмідної, тотальної ДНК та їх рестрикційних фрагментів, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції та лігування лігазою фага T4 проводили як описано в керівництві Маниатіса (Маниатис и др., 1984). Реакцію нік-трансляції проводили по методиці, запропонованій Рігбі (Rigbi et al., 1977). Перенесення ДНК з агарозного гелю на нітроцелюлозний мембранний фільтр (фірма "Schuell BA85", 0,45) проводили за Саузерном (Southern, 1975). Для виявлення у стрептоміцетів плазмід, що детермінують  $Ltz^+$  фенотип, використовували 2 методи - метод відбитків плям та метод мікроколоній. Для виявлення здатності стрептоміцетів пригнічувати ріст мікроорганізмів

використовували метод підсіву тест-культур, метод накладання агарових блоків культур стрептоміцетів та оприскування окремих колоній суспензією спор тест-культури. Чутливість стрептоміцетів до антибіотиків досліджували методом накладання стандартних паперових дисків з антибіотиками (Егоров, 1986). Для одержання безплазмідних варіантів використовували як фактори елімінації підвищену температуру, протопластування і регенерацію, спори також обробляли бромістим етидієм, додецилсульфатом натрію, ультрафіолетовими хвилями окремо і в комплексі з етидій бромідом (Okanishi et al., 1974; Hopwood et al., 1985).

Отримували компетентні клітини *E.coli* та протопласти стрептоміцетів, проводили їх трансформацію і відбір трансформантів за відповідними методиками (Стенько и др., 1986; Okanishi et al., 1974; Dagert, 1979, Hopwood et al., 1985).

Дослідження речовин з антибіотичними властивостями проводили методами аналітичної та препаративної тонкошарової хроматографії (Шаршунова и др., 1980). Біоавтографію отриманих тонкошарових хроматограм проводили за методом (Aszalos et al., 1968).

Вивчення протипухлинної дії метаболіту з Rf 0,33, що синтезується *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>), проводили на 10 безпородних щурах - самках з перевивною карциномою Герена на 6 добу після перевивки. Вихідні розміри пухлин на цей день становили 0,9 - 1,1 см<sup>3</sup>. Препарат вводили в дозі 0,8 мг/кг в добу на протязі 10 діб. Досліди по вивченню протипухлинної дії метаболіту проводили на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАНУ.

#### 1. Дослідження ряду штамів глобіспоринової групи на наявність позахромосомної спадковості .

Для даних досліджень були відібрані 30 штамів, що належали до групи глобіспоринових стрептоміцетів. Такий вибір був пов'язаний з тим,

що всі представники цієї групи синтезують речовини з антибіотичними властивостями широкого спектру дії (Красильников, 1970).

Встановлено, що екстрахромосомна ДНК у 15 штамів не виділяється жодним з використаних нами методів, у 14 штамів в аналогічних умовах - виділяється нестабільно і тільки з одного штама (*S.globisporus* 1912) плазмідна ДНК виділялась стабільно.

За даними літератури 20-25 % штамів стрептоміцетів містять в собі плазмідну ДНК (Okanishi et al., 1980; Hopwood et al., 1981; Омура et al., 1981), але є дослідження, які виявили більшу поширеність плазмідної ДНК серед стрептоміцетів (93%) (Ritchie et al., 1985).

Як відомо, одною з типових властивостей, які детермінуються плазмідами стрептоміцетів, є явище "летального зигозису" ( $Ltz^+$  - фенотип, "поки"). Було проведено вивчення штамів з досліджуваної групи, що містять плазмідну ДНК, на наявність  $Ltz^+$ -фенотипу. Як встановлено, всі перевірені безплазмідні штами виявилися чутливими до  $Ltz^+$  -фенотипу штаму *S.globisporus* 1912 ( $pSG1912^+$ ) (Рис.1), в той час як деякі інші (наприклад, *S.globisporus* 284) продемонстрували явище "летального зигозису" тільки на газонах деяких з використаних безплазмідних штамів. Штам *S.sp* 4326 не виявив феномену "летального зигозису" на жодному з використаних штамів, що може свідчити про некон'югативність плазмиди цього штаму.



Рис.1 .

Виявлення феномену "летального зигозису" ("поки") штамом *S.globisporus* 1912 ( $pSG1912^+$ ) на безплазмідному штаміві *S.levoris* 165 (газон).

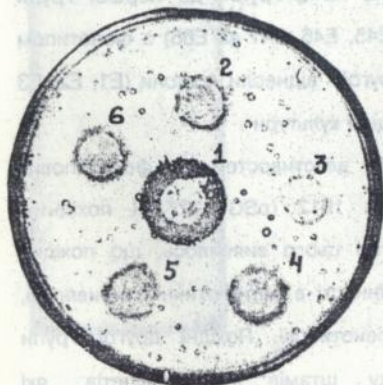
Іншою важливою фенотиповою ознакою, що детермінується плазмідами мікроорганізмів, є визначення стійкості до дії антибіотичних речовин. Досліджувався спектр чутливості до антибіотиків штамів, що містили позахромосомну ДНК, так і безплазмідних штамів. Було встановлено, що переважна більшість досліджених штамів незалежно від наявності плазмідної ДНК виявилась стійкою до  $\beta$ -лактамних та макролідних антибіотиків, мітоміцину С та поліміксину М і чутливою до аміноглікозидних антибіотиків, тетрацикліну, ристоміцину та деяких інших. Деякі відмінності в стійкості до антибіотиків виявлено у *S.sp* 2070 і *S.pluricologrescens* 12.

Досліджені штами глобіспоринової групи виявили слабку здатність пригнічувати ріст окремих грамполозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. При вивченні впливу метаболітів штамів глобіспоринової групи *S.globisporus* 1912 ( $pSG1912^+$ ), *S.globisporus* 284, *S.sp* 2070, *S.pluricologrescens* 12 і *S.levatoris* 165 на деякі штами стрептоміцетів з колекції лабораторії і на представників досліджуваної групи встановлено, що всі досліджені штами (за винятком *S.levatoris* 165) як плазмідні, так і безплазмідні здатні пригнічувати ріст інших стрептоміцетів (Рис. 2).

Рис. 2.

Пригнічення росту безплазмідного штама *S.globisporus* 3934 (газон) навколо агарових блоків з культурами :

- 1-*S.globisporus* 1912 ( $pSG1912^+$ ),
- 2-*S.globisporus* 284, 3-*S.sp* 801,
- 4-*S.pluricologrescens*.12,
- 5-*S.sp* 4326, 6-*S.sp* 2070.



На підставі отриманих даних про стабільне виділення плазмідної ДНК з штаму *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) і наявність у нього властивостей, які можуть детерминуватися плазмідною (синтезу метаболітів з антибіотичними властивостями, стійкості до них та феномену "летального зигозису"), було вирішено відібрати для детального дослідження цей штам і плазмиду, яку він містить (pSG1912).

**2. Функції та фенотипові ознаки, детерміновані плазмідною pSG1912.** Для того, щоб виявити, які з властивостей штаму *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) детермінуються плазмідною pSG1912, було вирішено отримати безплазмідні варіанти цього штаму. Як відомо, втрата якої небудь властивості штаму, що супроводжує втрату плазмиди, є одним з доказів детермінації цієї властивості плазмідними генами (Shrempf, 1982; Fishman and Hershberger, 1983; Hintermann et al., 1984).

В нашій роботі використовувалися як фактори елімінації плазмід хімічні речовини та фізичні фактори. 6530 колоній, які виростили із оброблених спор або міцелію, було перевірено на наявність позахромосомної ДНК. При цьому було знайдено тридцять один клон, у яких позахромосомної ДНК фізичними методами не було виявлено. Ці клони по фенотипу було розподілено на 2 групи: до першої групи віднесли 27 клонів (наприклад, E27, E45, E46, E47 та E66) з фенотипом *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) ; до другої - віднесли 4 клони (E1, E2, E3 та E8) , відмінні за фенотипом від вихідної культури .

Проведено порівняльний аналіз властивостей та фенотипових ознак вихідної культури *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) і похідних, віднесених до обох груп. В результаті цього виявилось, що похідні, віднесені до різних груп, мають відмінності в антибіотичній активності, стійкості до норсетрицину та Ltz-фенотипові. Похідні другої групи перестали пригнічувати ріст ряду штамів стрептоміцетів, які пригнічуються вихідним штамом *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) та

похідними першої групи, були чутливі до антибіотичної речовини, що синтезується вихідним штамом *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) та похідними першої групи. Змін в спектрі стійкості до поширених антибіотиків не знайдено, але дослідження виявили чутливість до норсетрицину тільки похідних другої групи. Похідні другої групи мали також Ltz<sup>-</sup>-фенотип та були чутливі до Ltz<sup>+</sup>-фенотипу як вихідного штаму, так і похідних першої групи.

На підставі отриманих результатів зроблено висновок, що плазмідна рSG1912 у *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) приймає участь в кодуванні синтезу стрептоміцетом речовин з антибіотичними властивостями та стійкості до них, надає мікроорганізму стійкість до норсетрицину та Ltz<sup>+</sup>-фенотип. Тільки чотири клони похідних, другої групи дійсно втратили позахромосомну ДНК. Цей висновок був підтверджений даними, отриманими після повторної обробки клонів E45 та E47 елімінуючими факторами (підвищеною температурою та етидієм бромідом (Рис. 3). Це

а б



Рис.3.

Електрофоретичне розділення препаратів тотальної ДНК:

а- *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>);

б- штам E45 1 групи (після обробки елімінуючим фактором).

1-хромосомна ДНК,

2-4 - форми плазмідної ДНК:

2-відкрита кільцева, 3-лінійна,

4-ковалентно замкнена кільцева форма.

виявило можливість існування плазмід рSG1912 як в автономному, так і в інтегрованому станах із збереженням експресії локалізованих на ній генів.

Для безпосереднього доказу детермінації плазмідною рSG1912 феномену "летального зигозису" і синтезу антибіотичних речовин та стійкості до них було проведено трансформацію як безплазмідного варіанту E8 (*S.globisporus* 1912-8 (рSG1912<sup>-</sup>)) та *S.levoris* 165 (обидва відносяться до глобіспоринової групи), так і штаму *S.griseus* 68-31, який відноситься до групи сірих культур. Ці штами були відібрані для використання як реципієнти в зв'язку з тим, що вони, з одного боку, чутливі до дії антибіотичних речовин, детермінація синтезу яких пов'язується з плазмідною рSG1912, а з другого - вони мали Ltz<sup>-</sup> -фенотип; що повинно дозволити виявити фенотипові ознаки, детерміновані плазмідною рSG1912.

В дослідках по трансформації плазмідною ДНК рSG1912 протопластів відібраних реципієнтів було отримано 725 клонів, які виявили фенотипову ознаку, що детермінується трансформуючим фактором (плазмідною рSG1912) - здатність пригнічувати ріст тестерного штаму *S.levoris* 165. З них 75 клонів трансформантів було досліджено на наявність плазмідної ДНК фізичними методами. У всіх перевірених трансформантів виявлена плазмідна ДНК, аналогічна по рухливості в агарозному гелі плазміді рSG1912. Перевірені трансформанти всіх трьох використаних реципієнтів виявились здатними виявляти Ltz<sup>+</sup>-фенотип на тих же штаммах, що і вихідний штам *S.globisporus* 1912 (рSG1912<sup>+</sup>).

Багато вивчених плазмід стрептоміцетів виявились кон'югативними. Для визначення здатності плазмід рSG1912 до кон'югативного переходу проводили схрещування *S.globisporus* 1912 (рSG1912<sup>+</sup>) з штамом *S.lividans* ТК 24. У п'яти виділених клонів (К1, К2, К3, К4, К6) було виявлено плазмідну ДНК, яка за даними рестрикційного аналізу

визначається як плазмідна ДНК штаму *S.globisporus* 1912 (рSG1912<sup>+</sup>) та

аналогічна рSG1912. Клони мали властивості донорного штаму, яких не було у реципієнта *S.lividans* TK 24 (Рис. 4).

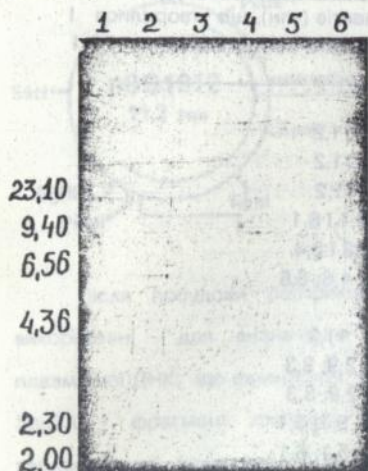


Рис. 4.

Електрофореграма розділення рестрикційних фрагментів ДНК плазміди рSG1912 та позахромосомної ДНК, виділеної з кон'юганта К6 :

- 1- тотальна ДНК *S.lividans* TK 24;
- 2- ДНК  $\lambda$  + HindIII ; 3-рSG1912 + BamHI;
- 4- ДНК К6 + BamHI;
- 5-рSG1912 +PvuII; 6- ДНК К6 + PvuII.

Таким чином, перенесення в клітини реципієнтів плазмідної ДНК супроводжується появою нових фенотипових ознак у трансформантів, що вважається безперечним доказом детермінації плазмідною цих властивостей (Hutter and Eckhardt, 1988).

У зв'язку із здатністю плазміди рSG1912 здійснювати інтеграцію в хромосому і ексцизію із неї проведені дослідження по вивченню впливу цих процесів на молекулярну масу і структуру плазміди. За даними рестрикційного аналізу ці процеси проходять без делецій та транслокацій послідовностей ДНК плазміди та інсерцій хромосомної ДНК.

**3. Побудова рестрикційної та фізичної карт плазміди рSG1912.** Після виявлення нової плазміди рSG1912 поряд з визначенням ознак, що детермінує плазміда, вивчали молекулярну будову і визначали копійність і розмір молекули. Для побудови рестрикційної карти проводили аналіз за допомогою ендонуклеаз рестрикції (таблиця 1).

Нами була побудована рестрикційна карта плазміди рSG1912 для 6 рестриктаз і встановлена наявність для рестриктаз AluI, BamHI,

Таблиця 1.

Рестрикційний аналіз ДНК плазміди рSG1912.

Рестриктази	Розміри фрагментів (тпн), що утворилися в результаті обробки рестриктазами
: одинарні перевари :	
: BamHI	11,2
: PstI	11,2
: SacI	11,2
: BgIII	5,1 і 6,1
: PvuII	4,8 і 6,4
: KpnI	0,9; 1,8; 8,6
: подвійні перевари :	
: BamHI + PstI	11,2
: BamHI + SacI	2,9; 8,3
: PstI + SacI	2,9; 8,3
: BgIII + BamHI	5,1; 6,1
: BgIII + PstI	5,1; 6,1
: BgIII + SacI	2,3; 2,9; 6,1
: PvuII + BamHI	1,2; 4,8; 5,2
: PvuII + PstI	1,2; 4,8; 5,2
: PvuII + SacI	2,2; 4,2; 4,8
: PvuII + BgIII	1,2; 4,8; 5,1
: KpnI + BamHI	0,9; 1,8; 3,3; 5,3
: KpnI + PstI	0,9; 1,8; 3,3; 5,3
: KpnI + SacI	0,9; 1,8; 2,4; 6,2

PstI і SacI по одному сайту впізнання на молекулі, що робить плазмиду придатною для побудови на її основі векторів клонування (Рис. 5). Молекулярна маса плазміди рSG1912 становить 11,2 тпн. Плазміда рSG1912 виявилась висококопійною - до 500 копій на одну хромосому.

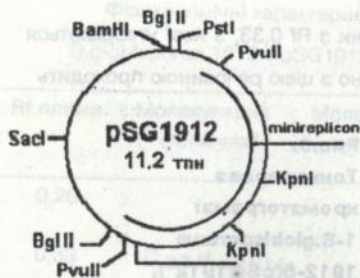


Рис.5  
Рестрикційна карта плазмиди pSG1912.

Після побудови рестрикційної карти отримані відомості були використані для визначення розміру і розташування фрагмента плазмідної ДНК, що функціонує як мініреплікон. Було встановлено, що Sau3A - фрагмент плазмиди pSG1912 в 4,5 тпн достатній для забезпечення здатності реплікуватись в клітинах стрептоміцета *S.globisporus* 1912-8 (pSG1912<sup>-</sup>) гібридним плазмідом pSGN1-pSG6, що побудовані на базі колійної плазмиди pUC19B6 (нездатної самостійно реплікуватись в стрептоміцетах). Цей Sau3A - фрагмент було локалізовано за допомогою рестрикційного аналізу на рестрикційній карті плазмиди pSG1912 (Рис.5).

**4. Фізико-хімічні та біологічні властивості метаболітів *S.globisporus* 1912.** Як встановлено нами, *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) синтезує комплекс речовин з антибіотичними властивостями. Ці речовини мають антрациклінову природу.

Методами тонкошарової хроматографії було досліджено хлороформ - ацетонний екстракт і встановлено, що комплекс метаболітів, синтезований *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>), складається з 7 речовин, які мають різну ступінь антибіотичної активності (Рис. 6).

Нами було проведено дослідження динаміки синтезу компонентів комплексу метаболітів з антибіотичними властивостями і встановлено, що

найбільше (до 60%) синтезується речовини з Rf 0,33, з якої утворюються речовини плям з Rf 0,65 та 0.95 і одночасно з цією речовиною проходить

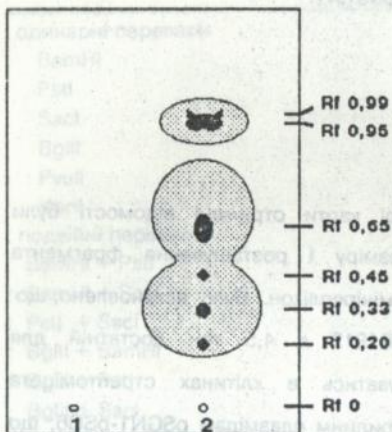


Рис.6.  
Тонкошарова  
хроматограма:  
1-*S.globisporus*  
1912-8(pSG1912<sup>-</sup>),  
2-*S.globisporus*  
1912 (pSG1912<sup>+</sup>)  
та біоавтограма  
метаболітів  
*S.globisporus* 1912  
(pSG1912<sup>+</sup>)  
(заштриховано).

синтез речовини з Rf 0,2. Речовина з Rf 0,2 не утворюється з речовини з Rf 0,33.

Ми вивчали поглинання речовин окремих фракцій в ультрафіолетових та видимих промінях. Спектри кожної речовини мають по 2 добре виражених піки в ультрафіолетовій частині спектру і по одному пікові в інтервалі 446 - 500 нм (таблиця 2).

Встановлено, що метаболіти з Rf 0,33; 0,65 та 0,95 розчиняються в ацетоні, етанолі, метанолі, хлороформі, етилацетаті, бензолі, ксилолі, бутанолі- 1, чотирьоххлористому вуглецю і не розчинні в ефірі, гексані та воді. Якщо підлужити воду NaOH до pH 8,5 - 9,0, то можна екстрагувати нею до 90% речовин, розчинених в органічних розчинниках.

У безплазмідного варіанту *S.globisporus* 1912-8 (pSG1912<sup>-</sup>) в аналогічних умовах вирощування та екстракції методом тонкошарової хроматографії не виявлено метаболітів, які були б аналогічні метаболітам, знайденим у вихідного штама (Рис.6).

Таблиця 2.

Фізико-хімічні характеристики речовин, що синтезуються

*S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>)

Rf плями	Молекулярна формула*	Молекулярна вага	Максимуми поглинання (в нм) і колір.
0,20	--	-	214; 260; 442 темно червоний
0,33	C <sub>37</sub> H <sub>44</sub> O <sub>14</sub>	714,2	218; 260; 446 темно червоний
0,65	C <sub>37</sub> H <sub>42</sub> O <sub>14</sub>	710,2	213; 248; 456 бузковий
0,95	C <sub>37</sub> H <sub>42</sub> O <sub>13</sub>	696,0	215; 264; 500 фіолетовий

\* - встановлено за допомогою FAB мас-спектроскопії.

У двох трансформантів (Т68-29 і Т68-34), отриманих в дослідках по трансформації протопластів *S.griseus* 68-31, проведено вивчення антибіотичної речовини методами тонкошарової хроматографії і біоавтографії. У них були виявлені речовини, які мали антибіотичну активність і значення Rf, аналогічні речовинам вихідного штаму *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>). Штам-реципієнт *S.griseus* 61-38 таких біологічно активних речовин не синтезував.

Одержані дані підтверджують детермінацію плазмідною pSG1912 синтезу речовин з антибіотичними властивостями.

У зв'язку з тим, що антибіотики антрациклінової природи широко використовуються в хіміотерапії пухлин, було досліджено здатність метаболітів *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) впливати на розвиток пухлин. В наших експериментах використовували в якості моделі перевивну пухлину - карциному Герена.

Наші попередні дослідження встановили, що термін життя експериментальних тварин довший в 1,5 рази терміну життя контрольних щурів. Одержані результати також виявили здатність метаболітів *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) значно пригнічувати розвиток експериментальної пухлини. Необхідно відмітити, що не спостерігалось гострої токсичної дії препарату на щурів.

Таким чином, отримані нами результати є важливими для вивчення позахромосомної спадковості стрептоміцетів. Встановлено, що плазміда pSG1912 детермінує синтез антибіотиків антрациклінової природи, стійкість до них, стійкість до антибіотика норсетрицина та є кон'югативною. Проведення рестрикційного аналізу плазмиди pSG1912 дозволило виявити на ній унікальні сайти рестрикції для 4 ендонуклеаз, що відкриває можливість конструювання вектора для генноінженерних експериментів по клонуванню генів. З другого боку, антибіотичні речовини, що синтезуються *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>), пригнічують розвиток пухлин і грампозитивних мікроорганізмів. Подальші дослідження метаболітів *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) необхідні для встановлення можливості застосування їх в медицині та ветеринарії.

#### ВИСНОВКИ.

1. Показано, що 50 % перевірених штамів стрептоміцетів глобіспоринової групи містять плазмідну ДНК в автономній формі. Стабільно плазмідна ДНК виділялася тільки з одного штаму -*S.globisporus* 1912.
2. Плазміда pSG1912 є висококопійною (500 копій на одну хромосому), кільцевою та має молекулярний розмір 11,2 тпн.
3. Побудована рестрикційна карта плазмиди pSG1912 для 6 ендонуклеаз рестрикції. Виявлено наявність унікальних сайтів рестрикції для ферментів AluI, BamHI, PstI та SacI. Встановлено, що мініреплікон

плазмиди pSG1912 розташований на Sau3A фрагменті розміром 4,5 тпн та визначено його локалізацію на рестрикційній карті плазмиди.

4. Доказано, що плазмиди pSG1912 є кон'югативною і детермінує синтез антибіотичних речовин і стійкість до них, а також стійкість до антибіотика норсетрицину.

5. Встановлено, що плазмиди pSG1912 стабільно існує як у вихідному хазяїні *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>), так і в деяких інших споріднених штамів (*S.levoris* 165 і *S.griseus* 68-31), в які вона була перенесена методами трансформації чи кон'югації. Плазмиди здатна до інтеграції в хромосоми цих штамів та ексцизію з них без змін в молекулярному розмірі та структурі.

Генетичні детермінанти плазмиди pSG1912 здатні експресуватися як в автономному, так і в інтегрованому стані.

6. В *S.lividans* TK24 плазмиди pSG1912 існує тільки в автономній формі, що свідчить про відсутність attB послідовності, в яку за рахунок сайтспецифічної рекомбінації могла б інтегрувати плазмиди.

7. Штам *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) синтезує комплекс споріднених антибіотичних речовин антрациклінової природи. Речовини пригнічують ріст грам-позитивних мікроорганізмів (особливо інших стрептоміцетів) та виявляють протипухлинну дію на моделі первинної пухлини карциноми Герена.

#### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Полищук Л.В., Дехтяренко Т.Д., Стефанишин Е.Е., Мацелюх Б.П., Козырицкая В.Е. Плазмиды стрептомицетов глобиспориновой группы//Микробиол. ж.-1985.-47.-N 4.- с. 83 - 88.

2. Стефанишин Е.Е., Дехтяренко Т.Д., Полищук Л.В., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Рестрикционный анализ плазмиды pSG1912// Микробиол. ж.- 1986.- 48.- N 2.- с. 79 -80.

3. Стенько А.С., Мацелюх Б.П., Дехтяренко Т.Д., Стефанишин Е.Е., Стефанов А.В., Безкоровайная Н.К., Полищук Л.В., Машковский Н.Н. Трансформация протопластов *Streptomyces griseus* хромосомной и плазмидной ДНК, заключенной в липосомы// Биополимеры и клетка.- 1986.-2.-N 5.-с. 270 - 274.

4. Полищук Л.В., Стефанишин Е.Е., Дехтяренко Т.Д., Стенько А.С., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Трансформация протопластов *Streptomyces* sp. 1912-8 с помощью ДНК плазмиды рSG1912//Микробиол. ж.- 1987.-49.-N 1.- с. 24 -28.

5. Полищук Л.В., Полевода Б.В., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Изучение стабильности наследования плазмиды рSG1912 клетками *Streptomyces globisporus* 1912 и гетерологичных штаммов стрептомицетов// Микробиол. ж.-1992.-54.-N 3.-с.9-14.

6. Заверуха В.Б., Полевода Б.В., Полищук Л.В., Мацелюх Б.П. Клонирование фрагментов стрептомицетной плазмиды рSG1912 в составе вектора рUC19//Микробиол. ж.- 1992.- 54.- N 5.с. 30 -35.

7. Полищук Л.В. Особливості біосинтезу метаболітів з антимікробними властивостями *Streptomyces globisporus* 1912 // Матеріали І Установчого з'їзду УМТ.- Одеса.-1993.-Мікробіол. ж.-1994.-56.- N 2.- с.99.

*Полищук Л.В.*

### **Внехромосомная наследственность *S.globisporus* 1912.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07. - микробиология, Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1995.

**РЕЗЮМЕ**

У 30 штамов стрептомицетов, выделенных из образцов почв различных регионов было изучено наличие плазмид и фенотипических признаков, которые могут детерминироваться ими. Был отобран штам *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>), имеющий кольцевую мультикопийную плазмиду pSG1912 стабильно выделяемую и детерминирующую Ltz<sup>+</sup>-фенотип, синтез веществ антрациклиновой природы с антибиотическими свойствами, устойчивость к ним и антибиотик норсетрицину. Была построена рестрикционная карта плазмиды pSG1912 (11,2 тпн) и локализован на ней минирепликон. Изучены некоторые физико-химические свойства антибиотических веществ, синтезируемых *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>). Установлено, что спектр антибиотического действия метаболитов *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) включает грамположительные микроорганизмы и они оказывают противоопухолевое действие.

Ключові слова: стрептоміцети, плазміді, компетентні клітини, протопласти, трансформація, трансформанти, антибіотик, рестрикція, тонкошарова хроматографія, стійкість до антибіотиків, антибіотична дія, електрофорез, Ltz-фенотип, елімінація, мінірелікон.

*Polishchuk L.*

### **The Extrachromosome heredity of *S.globisporus* 1912.**

The Candidate Thesis for a Phylosophy Degree, a Speciality 03.00.07 - Microbiology, Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukrainian , Kiev, 1995.

### **S U M M A R Y**

Presence of plasmid DNAs and some plasmidborn phenotypic properties have been investigated for 30 Streptomycetes strains, isolated from samples of soil. Strain *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) has been picked out as one which containing stable circular multicopy plasmid pSG1912. It

was shown that pSG1912 determines Ltz<sup>+</sup>-phenotype, synthesis of anthracycline antibiotics, resistance to them and northetricene. Restriction map of plasmid pSG1912 (11,2 kb) had been constructed and minireplicon has been localized on it. Some physical and chemical properties of antibiotic substances producing by *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) have been studied. It was established *S.globisporus* 1912 (pSG1912<sup>+</sup>) substances have antibiotic activity against grampositive microorganisms and a tumor.

зак. № 297 т. 100 УБК НАУ 1995 г.



AB 33.478