

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
Український науковий гігієнічний центр

*На правах рукопису*

**ЗАВОРОТНА**  
Сусана Анатоліївна

**ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМІВ  
НЕСТАБІЛЬНОСТІ ОЗНАК СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ  
У STREPTOMYCES COELICOLOR A3(2) ТА  
SACCHAROPOLYSPORA ERYTHRAEA**

03.00.15 - Генетика

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

Київ - 1996

AB 34.474

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів антибіотиків Львівського державного університету ім. І.Франка.

**Науковий керівник** - кандидат біологічних наук,  
доцент Федоренко В.О.

**Офіційні опоненти** - доктор медичних наук  
професор Буживєвська Т.І.  
  
кандидат біологічних наук  
Дуган О.М.

**Провідна організація** - інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України

Захист відбудеться 24 травня 1996 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д. 01.37.03 при Українському науковому гігієнічному центрі

З дисертацією можна ознайомитись з науковій бібліотеці Українського наукового гігієнічного центру

Автореферат розіслано "12" квітня 1996 року в **ЛНБ ім. В. Стефаніка АН України**

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

*Рисенко* Стефанович А.Б.

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00754368 (X)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність досліджень.** Дослідження, виконані на різних представниках роду *Streptomyces*, показали високий ступінь нестабільності їх геному. Найкращою моделлю для вивчення цього явища є генетичні детермінанти резистентності актиноміцетів до антибіотиків. Встановлення механізмів генетичної нестабільності має важливе значення для розуміння особливостей організації геному актиноміцетів та його перебудов, пошуку факторів, які б впливали на його стабільність.

Актиноміцети, для яких характерна природна множинна стійкість до антибіотиків, розглядаються як можливе джерело генетичних детермінантів антибіотикорезистентності. В останній час показано гомологію деяких генів стійкості до антибіотиків актиноміцетів, клінічних штамів мікроорганізмів та ракових клітин людини. Тому важливим для медицини є розуміння особливостей генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків, еволюції і розповсюдження детермінантів антибіотикорезистентності.

Актиноміцети є продуцентами більшості відомих антибіотиків. Функціонування генів стійкості до антибіотиків є необхідним для забезпечення життєдатності клітин, які їх продукують. Вивчення механізмів антибіотикорезистентності дозволяє розробити нові підходи до конструювання високоактивних штамів-продуцентів антибіотиків. Крім того, знання механізмів нестабільності генів антибіотикорезистентності дозволить вести пошуки факторів, які б дозволили покращити ефективність антибіотикотерапії.

**Мета і завдання досліджень.** Метою роботи є генетичний аналіз множинної зміни ознак антибіотикорезистентності модельного об'єкта генетики актиноміцетів *S.coelicolor* A3(2), а також ідентифікація та характеристика нестабільних ознак у продуцента макролідного антибіотика еритроміцину *S.erythraea*.

В зв'язку з цим було поставлено наступні завдання:

- охарактеризувати множинні зміни ознак резистентності до антибіотиків *S.coelicolor* A3(2);
- провести генетичний аналіз та локалізувати нестабільні детермінанти стійкості *S.coelicolor* A3(2) до хлорамфеніколу та ристоміцину;
- ідентифікувати та вивчити генетично нестабільні ознаки у

продуцента еритроміцину *S. erythraea*;

- дослідити структурні перебудови в геномах штамів з нестабільними ознаками та вивчити їх зв'язок з нестабільністю ознак.

**Наукова новизна.** Виявлено ряд закономірностей множинної зміни ознак антибіотикорезистентності у *S. coelicolor* A3(2). Показано хромосомну локалізацію генетично нестабільного детермінанта стійкості до ристоміцину. Ідентифіковано два не-валежних детермінанта стійкості до хлорамфеніколу *S. coelicolor* A3(2), які локалізуються у відмінних районах хромосоми. Вперше в геномі мутантів *S. coelicolor* A3(2) виявлено різні послідовності ДНК, здатні до ампліфікації.

В клітинах *S. erythraea* ідентифіковано неописану раніше плазмиду pSE201, яка містить детермінанти стійкості до аміноглікозидних антибіотиків і здатна трансформувати *S. lividans* і переноситись кон'югативно у *S. coelicolor* A3(2). Показано, що елімінація та зміна копійності цієї плазмиди обумовлює нестабільність прояву ознак резистентності вказаних штамів до аміноглікозидних антибіотиків.

**Науково-практична цінність досліджень.** Підходи до вивчення генетичної нестабільності, розроблені при дослідженні модельного об'єкту *S. coelicolor* A3(2), можуть бути застосовані до промислових штамів-продуцентів антибіотиків, зокрема, продуцента еритроміцину *S. erythraea*. Система генетично нестабільних детермінантів хлорамфенікол- та ристоміцин-резистентності *S. coelicolor* A3(2) може бути використана як тестсистема для скринінгу речовин, які впливають на частоту перебудов нуклеотидних послідовностей (ампліфікацій, деампліфікацій, делецій). Плазмиду pSE201 можна використати для клонування та ампліфікації послідовностей ДНК з метою підвищення експресії певних генів.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації представлялися на VII Національній конференції по виробництву та застосуванню антибіотиків, Разград (Болгарія), 1990; Міжнародному симпозіумі "Генетика та утворення продуктів актиноміцетами", Ерфурт (Німеччина), 1990; VI Міжнародному симпозіумі з генетики промислових мікроорганізмів, Страсбург (Франція), 1990; I Всесоюзній планово-завітній конференції "Тенна та клітинна інженерія", Пушино-на-Оці (Росія), 1990; VI з'їзді Українсь-

кого товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова, Полтава, 1992; II Всесоюзній планово-звітній конференції "Генна та клітинна інженерія", Пушино-на-Оці (Росія), 1991; I з'їзді Українського мікробіологічного товариства, Одеса, 1993; VII Міжнародному симпозиумі з генетики промислових мікроорганізмів, Монреаль (Канада), 1994; IX Міжнародному симпозиумі з біології актиноміцетів, Москва (Росія), 1994; X конференції Німецького товариства загальної мікробіології "Біологія актиноміцетів", Йена (Німеччина), 1994; VII Європейському конгресі з біотехнології, Ніцца (Франція), 1995; наукових конференціях співробітників біологічного факультету Львівського державного університету.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 18 робіт.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається із 6 розділів: "Вступ", "Огляд літератури", "Результати та їх обговорення", "Висновки" та "Список літератури". Роботу викладено на 163 сторінках машинописного тексту, в тому числі 22 таблиці та 39 рисунків. Список літератури включає 192 найменування.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.

**Бактеріальні штами та плазмиди.** В роботі використано штами актиноміцетів: *S. coelicolor* A3(2) A617, S507, S509, S510, S511 S18, S459 та S508 з музею культур ДНДІ генетика; *S. erythraea* штам 5, NRRL2338, A48, *S. lividans* 66 з музею культур ДНДІ антибіотиків (Москва, Росія); BTCC2, 5002, 5003, 5004, 2214 та 2215 люб'язно надані д-ром Т.Тодоровим (Інститут мікробіології АН Болгарії, Софія); похідні перерахованих штамів, отримані при виконанні цієї роботи; штами *E. coli* C500, DH5 $\alpha$ , а також *B. thuringiensis* HB<sub>2</sub>. Як вектор було використано плазмиду pUC19.

**Середовища.** Для вирощування штамів актиноміцетів використовували повноцінні агаризовані середовища CP-6, ПКА-2, ПКА-5 [Ломовская Н.Д. и др.], R2 [Norwood D. et. al., 1985], синтетичне глюкозо-аспарагінове середовище (MC) [Norwood D. et. al., 1985], рідкі середовища YEME [Norwood D. et. al., 1985] та SGEP [Weber et.al., 1985]. Для визначення антибіотичної активності *S.erythraea* використовували повноцінне

ферментаційне середовище. *V.mucoides* та *E.coli* вирощували на середовищі Лурія [Мідлер Дж., 1976]. В роботі використано 16 найбільш вживаних у лікувальній практиці антибіотиків.

Отримання мутантів, резистентних або чутливих до антибіотиків, аналіз схрещувань проводили згідно методик, описаних Федоренко В.А., 1980.

Виділення сумарної та плазмідної ДНК та їх рестрикційний аналіз, отримання і трансформацію протопластів проводили за методикою, описаною Horwood D., (1985).

Визначення антибіотичної активності штамів *S.erhythraea* після вирощування в рідкому середовищі проводили біологічним методом дифузії в агар з тест-культурою *V.mucoides* HB<sub>2</sub>.

Визначення стрептоміцин-фосфо-трансферазної активності проводили згідно з описаним раніше біологічним методом Tohyama H. et. al. (1986).

ДНК-ДНК гібридизацію проводили згідно "The DIG System Users Guide for Filter Hybridisation" (Boehringer Mannheim) (1994). Фрагмент сумарної ДНК переносили з геля на нейлоновий фільтр Hybond (Amersham) і гібридизували з плазмідною pSE201, яку мітили за допомогою методу випадкових гексануклеотидних праймерів з використанням Кленов-фрагменту ДНК-полімерази I *E.coli* (Fermentas, Вільнюс) та дігексигенін-II-д УТФ (ДІГ). Виявлення ДІГ-міченої ДНК на фільтрах проводили колориметричним методом з використанням кон'югату анти-ДІГ-антитіла із лужною фосфатазою, розчину тетразолію нітроголубого (ТНГ) у 70% диметилформаміді (75мг/мл) та 5-бром-4-хлор-3-індолілі фосфату (X-фосфату) у диметилформаміді (50мг/мл).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

1. Генетична нестабільність ознак природної резистентності до антибіотиків у *Streptomyces coelicolor* A3(2) та продуцента еритроміцину *Saccharopolyspora erythraea*.

1.1. Вивчення властивостей мутантів *S. coelicolor* A3(2), чутливих до хлорамфеніколу.

Досліджувані штами *S.coelicolor* A3(2) A617 (pabA1 uraA1 argA1 strA1 NF SCP2<sup>+</sup>) та S18 (cysD18 adeC(V10) strA1 SCP1<sup>-</sup> SCP2<sup>-</sup>) резистентні до 10-ти з 16-ти використаних антибіотиків, в тому числі до 10 мкг/мл ристоміцину (Rm) та 20 мкг/мл хлорамфеніколу (Cm). З частотою 0,2-0,3% ці штами здатні ут-

ворювати мутанти, чутливі до Cm та інших антибіотиків. Ми вивчали зміни осяг антибіотикорезистентності у незалежних хлорамфеніколчутливих (CmlS) мутантів штамів A617 (S507, S509, S510, S511) та S18 (S459). Три штами були чутливими до 20 мкг/мл Cm (S507, S509, S459), а два - (S510, S511) - до 20 мкг/мл Cm та 10 мкг/мл Rm (RimS). При визначенні рівня чутливості незалежних CmlS-мутантів до хлорамфеніколу було виявлено, що вони суттєво різняться між собою за чутливістю до цього антибіотика. Вивчення спектрів стійкості цих штамів до антибіотиків показало, що відбувається зміна резистентності досліджених CmlS-мутантів і до інших антибіотиків (аміноглікозидів канаміцину, мономіцину, гентаміцину та неоміцину, а також до еритроміцину, олеандоміцину, лінкоміцину, рифампіцину, поліміксину та тетрацикліну).

Однією з властивостей мутантів *S.coelicolor* A3(2), чутливих до антибіотиків, є їх здатність ревертувати до антибіотикорезистентності. Ми визначили частоти утворення спонтанних хлорамфенікол-резистентних (CmlR) ревертантів п'ятьма CmlS-штамами. Було показано, що ці частоти є рівними у незалежних мутантів. Слід відзначити, що утворення хлорамфенікол- та ристоміцин-резистентних ревертантів відбувається із значно нижчими частотами, ніж мутації вихідних штамів до CmlS та RimS-фенотипів. Виділені нами CmlR-ревертанти суттєво відрізняються за стійкістю до Cm від вихідного штаму A617 (рис.1). Тобто повернення до вихідного фенотипу хлорамфенікол-резистентності не спостерігається. Тому фенотип досліджених ревертантів було позначено нами як CmlR<sup>+</sup>. Отже, можна припустити, що утворення ревертантів пов'язане з мутаціями інших генів, а первинна мутація детермінанта хлорамфенікол-резистентності зберігається, про що свідчать також літературні дані про делеції CmlR-генів *S. coelicolor* A3(2) [Flett F. and Cullum J., 1987]. Було визначено спектри стійкості до 16 антибіотиків 8 незалежних CmlR<sup>+</sup>-ревертантів різних штамів. Показано, що ревертанти стали стійкішими до аміноглікозидів, еритроміцину, олеандоміцину, лінкоміцину, рифампіцину та поліміксину, однак рівень їх стійкості до вказаних антибіотиків був вищим, ніж у вихідних штамів A617 та S18. Ці факти можуть свідчити про генетичну взаємодію детермінантів стійкості до різних антибіотиків. Така взаємодія

може бути обумовлена зчепленістю вказаних генів або наявністю спільних регуляторних елементів.

Таким чином, для генетичної нестабільності у *S. coelicolor* A3(2) характерна множинна зміна ознак антибіотикорезистентності.

### 1.2. Виникнення мутантів, чутливих до ристоміцину, у CmlS-та CmlR<sup>+</sup>-похідних *S. coelicolor* A3(2).

Ми вивчили здатність CmlS-мутантів штаму *S. coelicolor* A3(2) S18 та 1х CmlR<sup>+</sup>-ревертантів утворювати RimS-похідні (рис.2). Штам S459, чутливий до 20 мкг/мл Cm, здатний утворювати з частотою 6,6% мутанти, чутливі до Rm, які зберігають також чутливість і до Cm (фенотип CmlS RimS). Незалежні CmlS RimS мутанти відрізняються за рівнем чутливості до Rm. Було досліджено також здатність CmlR<sup>+</sup>-ревертантів штаму S459 утворювати RimS-мутанти. Майже половина CmlR<sup>+</sup>-ревертантів (41%) є чутливими до ристоміцину. Друга частина CmlR-ревертантів (59%) здатна утворювати RimS-похідні з частотою 4,6%. Виявлені частоти утворення RimS-мутантів значно вищі, ніж у вихідного штаму S18, який утворює RimS-мутанти з частотою 0,2%. Визначення спектру стійкості RimS-похідних до різних антибіотиків показало, що більшість з них стали чутливішими до макролідних антибіотиків, до аміноглікозидів, а також до тетрацикліну, поліміксину, лінкоміцину та хлорамфеніколу. Отже, генетичні зміни, що відбуваються в детермінанті стійкості до Cm, включають цілий каскад подій, одним з проявів якого є підвищена нестабільність детермінанту стійкості до Rm. Оскільки здатність утворювати з високою частотою RimS-клони зберігається і у CmlR<sup>+</sup>-штамів, зміни, які є причиною такої високої мутабельності RimR-детермінанта, збереглися і у ревертантів.

Проведені дослідження дозволили виявити такі особливості множинної зміни ознак антибіотикорезистентності у *S. coelicolor* A3(2), як висока частота появи мутантів, чутливих до хлорамфеніколу, ристоміцину та інших антибіотиків; здатність утворювати резистентні до цих антибіотиків ревертанти; суттєва різниця в рівнях стійкості до антибіотиків ревертантів та вихідного штаму; плейотропний характер досліджених мутацій; підвищення частоти мутацій в детермінанті ристоміцин-резистентності після пошкодження CmlR-детермінанта.

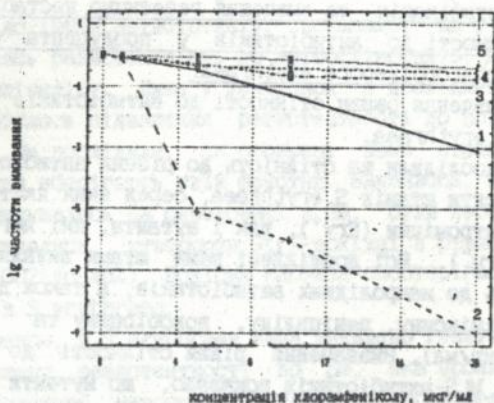


Рис.1. Залежність частоти виживання CmIR\* ревертантів *S.coelicolor* A3(2), похідних штаму S507, від концентрації хлорамфеніколу. 1 - A617, 2 - S507, 3 - R101, 4 - R102, 5 - R103.

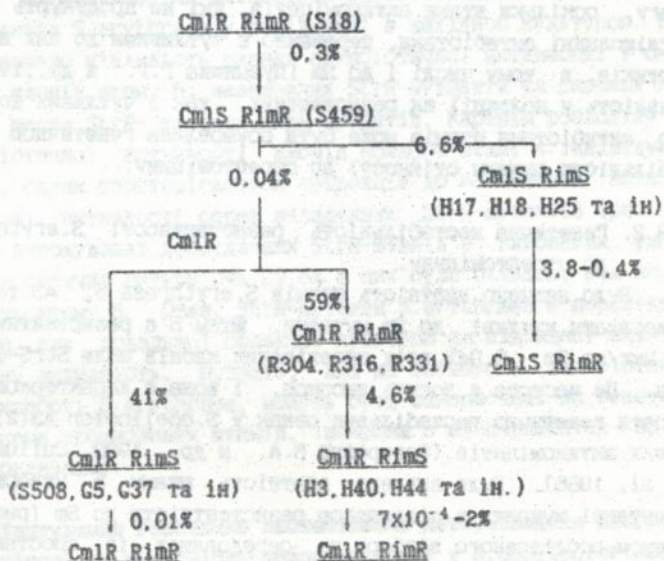


Рис.2. Схема утворення CmIS- та RimS-мутантів *S.coelicolor* A3(2) та їх ревертантів.

1.3. Ідентифікація та вивчення генетично нестабільних ознак стійкості до антибіотиків у продуцента еритроміцину *Saccharopolyspora erythraea*.

1.3.1. Вивчення ознак стійкості до антибіотиків у *S.erythraea*.

Ми дослідили на стійкість до різних антибіотиків колекцію в десяти штамів *S.erythraea*, серед яких як ті, що продукують еритроміцин ( $Egy^+$ ), так і мутанти, які його не синтезують ( $Egy^-$ ). Всі досліджені нами штами виявляли природну стійкість до макролідних антибіотиків, а також до лінкоміцину, поліміксину, пеніциліну, новобіоцину та тетрацикліну (10-30 мкг/мл). Визначення рівня стійкості до еритроміцину та інших MLS-антибіотиків показало, що мутанти *S.erythraea*, які не продукують еритроміцину, є чутливішими до цих антибіотиків, ніж вихідний  $Egy^+$ -штам, що свідчить про пошкодження у цих мутантів гену MLS-стійкості.

Частина досліджених штамів були чутливими, частина - резистентними до стрептоміцину (Sm). Цей факт привернув нашу увагу, оскільки штами актиноміцетів, які не продукують аміноглікозидні антибіотики, переважно є чутливими до цих антибіотиків, в тому числі і до Sm [Пузырина Г.Г. и др., 1977]. Наявність у колекції як резистентних, так і чутливих до цього антибіотика штамів може бути обумовлена генетичною нестабільністю ознаки стійкості до стрептоміцину.

1.3.2. Генетична нестабільність резистентності *S.erythraea* до стрептоміцину.

Було вивчено здатність штамів *S.erythraea* 5, A3 та A12 утворювати чутливі до Sm мутанти. Штам 5 є резистентним до 30 мкг/мл Sm. 0,04% всіх перевірених клонів мали StrS-фенотип. Ця частота є досить високою, і вона є характерною для втрати генетично нестабільних ознак у *S.coelicolor* A3(2) та інших актиноміцетів [Федоренко В.А. и др., 1980, Cullum J., et al, 1986]. Було вивчено здатність штаму 5 утворювати спонтанні мутанти з підвищеною резистентністю до Sm (рис.3). Шляхом послідовного відбору на середовищах із зростаючими концентраціями Sm отримано колекцію спонтанних мутантів з різним рівнем стійкості (від 0,1 до 15 мкг/мл) до цього антибіотика. Визначення спектрів стійкості мутантів, резистент-

них до Sm, до інших антибіотиків, показало, що у деяких з них збільшилась резистентність до аміноглікозидів, хлорамфеніколу та ампіциліну. Лише у декількох з досліджених StrR-мутантів відбулось підвищення резистентності до всіх аміноглікозидів. Ми дослідили, як отримані нами стрептоміцин-стійкі мутанти зберігають свій фенотип. Виявилось, що штами, які не підтримувались на середовищі з Sm, були нестабільними і розщеплювались, утворюючи StrS-похідні з різною частотою (від 0,007 до 46%). Подібна картина спостерігається і у Ery<sup>-</sup>-мутантів *S. erythraea*.

Таким чином, у *S. erythraea* нами виявлено генетично нестабільну ознаку резистентності до Sm, яка проявлялась у здатності спонтанно утворювати чутливі та високорезистентні мутанти, які отримуються шляхом ступінчастої селекції.

### 1.3.3. Біосинтез еритроміцину мутантами *S. erythraea*, стійкими до стрептоміцину.

Ми вивчили, чи змінюється антибіотична активність StrR-мутантів *S. erythraea* у порівнянні з вихідною культурою. Було визначено мінливість ознаки антибіотичної активності у окремих клонів штаму 5, незалежних StrR-мутантів та окремих клонів шести StrR- та двох KmR-мутантів. Картина розподілу антибіотичної активності клонів кожного штаму є індивідуальною, однак спостерігається тенденція до збільшення антибіотичної активності серед незалежних StrR-мутантів (рис. 4). При вирощуванні досліджених StrR-штамів в глибинних умовах антибіотична активність 29,6% з них була більшою, ніж активність штаму 5. Отже, StrR-мутанти *S. erythraea* є перспективними для подальшої селекції культури на підвищену антибіотичну активність. Мутації, які не зменшують антибіотичної активності *S. erythraea*, можуть бути використані як генетичні маркери промислових штамів, зокрема в експериментах по їх гібридації.

## 2. Картування генетично нестабільних детермінантів хлорамфенікол- та ристоміцин-резистентності у *S. coelicolor* A3(2).

Важливе значення для з'ясування механізмів генетичної нестабільності має визначення локалізації в геномі нестабільних генів.

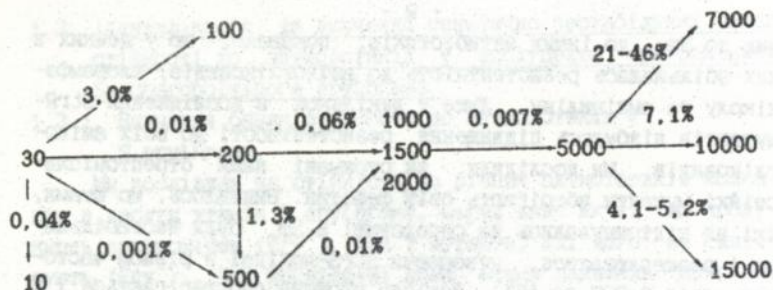


Рис.3. Схема ступінчастої селекції спонтанних мутантів *S.erythraea* з підвищеною стійкістю до стрептоміцину (концентрація стрептоміцину в мкг/мл).

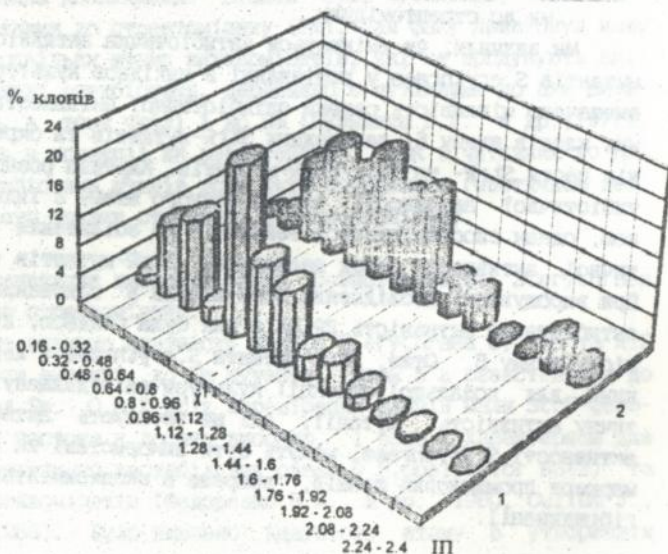


Рис.4. Антибіотична активність незалежних клонів штаму 5 (1) *S.erythraea* та його незалежних StrR-мутантів (2). ІІІ - індекс продуктивності (ІІІ-1 відповідає середній антибіотичній активності штаму 5).

Для локалізації детермінанту стійкості до *Sm* було проведено схрещування між резистентним до цього антибіотика штамом S18 (SCP1<sup>-</sup>SCP2<sup>-</sup> - реципієнт) та чутливим до *Sm* мутантом штаму A617 S509 (NF SCP2<sup>+</sup> - донор). За градієнтом алейних співвідношень маркерів, що аналізувались, маркер *cmIS509* локалізовано на хромосомі *S.coelicolor* A3(2) між маркерами *cysD18* і *argA1* (рис. 5, А).

Для локалізації мутації, яка визначає *SmI<sup>R</sup>*-фенотип, було проведено схрещування між *Sm*-резистентним ревертантом штаму S510 R202 та *Sm*-чутливим мутантом S459 штаму S18. За результатами цього схрещування маркер *cmIR202* картується на хромосомі *S.coelicolor* A3(2) між маркерами *cysD18* та *ugaA1*, тобто у районі хромосоми, відмінному від району локалізації мутації *Sm*-чутливості (рис. 5, Б). Отже, зміни геному, які приводять до *SmIS*- та до *SmI<sup>R</sup>*-фенотипів, це мутації у різних генах. Очевидно, що це обумовлює фенотипові відмінності між вихідним штамом та *SmI<sup>R</sup>*-ревертантами. Отримані результати дозволяють припустити, що попередня мутація *cmIS510* збереглась в геномі цього штаму.

Для локалізації детермінанту ристоміцин-резистентності було проведено схрещування між резистентним до *Rm* штамом S18 та спонтанним *RimS cmIS*-мутантом S509, похідним штаму A617. Виходячи з градієнта алейних співвідношень маркерів, мутацію чутливості до *Rm* можна розмістити на хромосомі *S.coelicolor* A3(2) між маркерами *cysD18* та *cmIS1* (рис. 5, В). Крім того, існує кореляція між успадкуванням маркерів *cysD18*, *rims22* та *cmIS1*, що також вказує на їх зчепленість.

Таким чином, результати проведених схрещувань свідчать про хромосомну локалізацію нестабільних детермінантів стійкості *S.coelicolor* A3(2) до *Sm* та *Rm*. Вони є зчепленими між собою. Мутація, яка обумовлює *SmI<sup>R</sup>*-фенотип, картується у відмінному від мутації *cmIS* районі генетичної карти, що може свідчити про функціонування в геномі *S.coelicolor* A3(2) декількох різних детермінантів хлорамфенікол-резистентності. Детермінанти *cmIR* та *rimsR* локалізуються на одному з кінців хромосоми, в якому, як і припускають [Cullum J., et al., 1994], відбуваються інтенсивні перебудови, що може обумовлювати їх нестабільність.

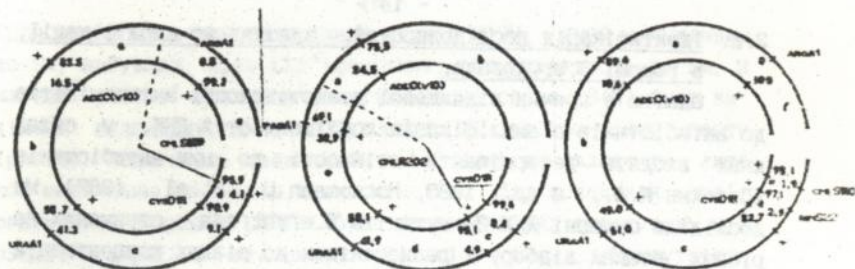
### 3. Вивчення структурних змін у геномах мутантів *S.coelicolor* A3(2) та *S.erythraea*.

#### 3.1. Ідентифікація послідовностей ДНК, здатних до ампліфікації, в геномі мутантів *S.coelicolor* A3(2).

Цікаво було з'ясувати, чи супроводжуються мутаційні зміни у отриманих нами мутантів перебудовами ДНК. Ми дослідили колекцію із 53 мутантів *S.coelicolor* A3(2), похідних штамів A617 та S18, яка включала CmlS-мутанти, їх CmlR<sup>+</sup>-ревертанти, CmlS RimS- і CmlR<sup>+</sup> RimS-штами, а також CmlR<sup>+</sup> RimR-ревертанти. Дослідження цих штамів викликало особливий інтерес, оскільки більшість з них виникла за рахунок більше, ніж однієї, генетичної події. Електрофоретичний аналіз їх сумарної ДНК, розщепленої ендонуклеазами рестрикції Bam HI, PvuII, PstI, SmaI, Sal GI, XhoI, HindIII та BglII, не виявив в геномах CmlS-мутантів штамів S18 і A617 та їх CmlR<sup>+</sup>-ревертантів таких перебудов, як ампліфікації та деампліфікації послідовностей ДНК, крупні делеції або додаткові фрагменти.

Однак в геномах двох мутантів (S508 та R103) з CmlR<sup>+</sup> RimS-фенотипом, виявлено фрагменти ДНК розміром 15 (AUD-Sc1) та 20 (AUD-Sc2) т.п.н. відповідно в ампліфікованому стані. AUD-Sc1 дає один фрагмент при розщепленні сумарної ДНК штаму S508 PstI та XhoI, два фрагменти - PvuII, чотири - BamHI та більше восьми - SmaI, а AUD-Sc2 дає один фрагмент ампліфікації при обробці сумарної ДНК R103 рестриктазами HindIII та XhoI, два - PvuII, чотири - BamHI, PstI та SalGI. Копійність AUD-Sc1 складає 50, а AUD-Sc2 - 40 копій/геном. Рестрикційний аналіз сумарної ДНК з клітин RimR-ревертантів штаму S508 показав, що в геномах цих штамів AUD-Sc1 знаходиться в деампліфікованому стані. BamHI фрагменти AUD-Sc2 розміром 2,2; 3,2; 4,5 та 11,0 т.п.н. клоновано на плазміді pUC19 по BamHI-сайту та побудовано їх рестрикційні карти (рис.6).

Отже, мутанти з CmlR<sup>+</sup> RimS-фенотипом рівняться не тільки за своїми властивостями, а і за структурою геномів. Елементи AUD-Sc1 та AUD-Sc2 є першими послідовностями, здатними до ампліфікації, ідентифікованими в геномі *S.coelicolor* A3(2). Їх поява, очевидно, є результатом декількох генетичних подій, першою з яких є пошкодження детермінанту хлорамфенікол-резистентності.



A.

B.

B.

Рис.5. Граденти алейних відношень маркерів неселективного аналізу генотипів рекомінантів, отриманих у схрещуваннях штамів *S.coelicolor* A3(2):

- A. S509 (NF SCP2<sup>+</sup>uraA1 argA1 cmlS509) та S18 (SCP1<sup>-</sup>SCP2<sup>-</sup> adeC(V10) cysD18 cmlS509<sup>+</sup>);
- B. R202 (NF SCP2<sup>+</sup> pabA1 uraA1 cmlR202) та S459 (SCP1<sup>-</sup> SCP2<sup>-</sup> adeC(V10) cysD18 cmlR202<sup>+</sup>);
- B. S510 (NF SCP2<sup>+</sup> uraA1 argA1 cmlS510 rimS22) та S18 (SCP1<sup>-</sup>SCP2<sup>-</sup> adeC(V10) cysD18 cmlS510<sup>+</sup> rimS22<sup>+</sup>).

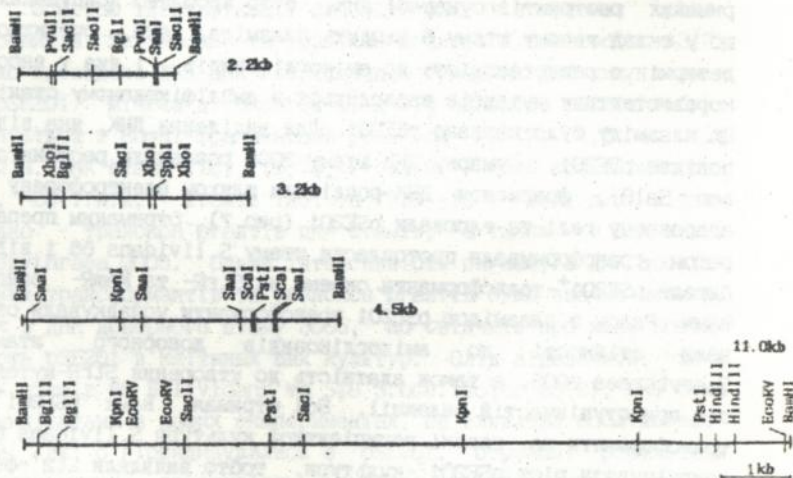


Рис.6. Рестрикційні карти BamHI фрагментів AUD-Sc2 клонованих на pUC19.

### 3.2. Ідентифікація послідовностей, здатних до ампліфікації, в геномі *S. erythraea*.

Однією з причин підвищеної резистентності актиноміцетів до антибіотиків є ампліфікація послідовностей ДНК, у склад яких входять детермінанти стійкості до цих антибіотиків [Потехин Я.А., и др., 1985, Hognemann U., et.al., 1987]. Ми дослідили сумарні ДНК 24 мутантів *S. erythraea*, отриманих на різних етапах відбору і резистентних до різних концентрацій Sm, на наявність таких ДНК-перебудов. Було проведено аналіз цих ДНК 14 ендонуклеазами рестрикції. Розщеплення ферментами PvuI, SalGI, SmaI, SacI, SacII, SphI, XhoI HindIII, EcoRI та EcoRV дозволило виявити в геномах 9-ти StrR-мутантів (що становить 37,5% від кількості досліджених штамів), резистентних до 1, 7, 10 та 15 мг/мл стрептоміцину, послідовність розміром близько 25 т.п.н. в ампліфікованому стані. Ампліфікацію було виявлено лише у геномах мутантів, у яких був підвищений рівень стійкості не тільки до Sm, а і до інших аміноглікозидних антибіотиків.

Виходячи з результатів електрофоретичного розподілу отриманих рестриктів сумарної ДНК, було зроблено припущення, що у склад геному штаму 5 входить плазмід, яка, очевидно, детермінує резистентність до аміноглікозидів, і яка у високорезистентних мутантів знаходиться в ампліфікованому стані. Цю плазмідку було названо pSE201. Для виділення ДНК, яка відповідає pSE201, сумарну ДНК штаму 3005 розщепили рестриктазою SalGI, фрагменти ДНК розділили шляхом електрофорезу в агарозному гелі та елювали pSE201 (рис.7). Отриманим препаратом трансформували протопласти штаму *S. lividans* 66 і відбирали pSE201<sup>+</sup>-трансформанти окремо за StrR- та KmR- ознаками. Разом з плазмідом pSE201 трансформанти успадкували ознаки стійкості до аміноглікозидів донорного штаму *S. erythraea* 3005, а також здатність до утворення StrR-мутантів при ступінчастій селекції. Всі отримані нами pSE201<sup>+</sup>-трансформанти на газоні реципієнтної культури *S. lividans* 66 пригнічували ріст pSE201<sup>-</sup>-культури, тобто виявляли Ltz<sup>+</sup>-фенотип. Плазмідну ДНК з клітин трансформантів, резистентних до різних концентрацій Sm, виділити не вдалося, тому ми використали генетичний метод ідентифікації криптичних плазмід - скрещування з безплазмідними штамми *S. coelicolor* A3(2).

Транскон'юганти одного з таких штамів M138, який є чутливим до Sm, набували, крім Ltz<sup>+</sup>-фенотипу, резистентності до Sm. З клітин pSE201<sup>+</sup>-транскон'югантів *S.coelicolor* A3(2) було виділено плазмідну ДНК, побудовано її рестрикційну карту (рис.8). Здатність визначати Ltz<sup>+</sup>-фенотип властива лише кон'югативним плазмідам актиноміцетів. Для доведення кон'югативних функцій pSE201 було проведено ряд схрещувань між pSE201<sup>+</sup> та pSE201<sup>-</sup>-штамами *S.coelicolor* A3(2). Присутність плазмиди pSE201 змінює успадкування генетичних маркерів хромосоми. В таких схрещуваннях з'являється додаткова точка початку переносу хромосомних маркерів (рис.9). Так, у схрещуванні між pSE201<sup>-</sup> штамми S18 та A617 маркер донорного штаму A617 *adeC(V10)*<sup>+</sup> несуть 78,6% рекомбінантів, *ugaA1* - 46,2%, *cysD18*<sup>+</sup> - 22,2%, *argA1* - 0,9%. У схрещуванні ж, в якому один з батьківських штамів несе плазмиду pSE201, градієнт успадкування маркерів інакший: *adeC(V10)*<sup>+</sup> несуть 63,7% рекомбінантів, *ugaA1* - 1,9%, *cysD18*<sup>+</sup> - 69,4%, *argA1* - 4,4%. Отримані дані вказують, що в клітинах *S.lividans* 66 та *S.coelicolor* A3(2) pSE201 виконує кон'югативні функції.

З метою ідентифікації плазмиди pSE201 в геномах трансформантів *S.lividans* та транскон'югантів *S.coelicolor* A3(2) було проведено ДНК-ДНК гібридизацію сумарних ДНК цих штамів з pSE201. Мічена дігексиген-II-д УТФ плазмиди pSE201 гібридується з BamHI-фрагментами розміром 8, 7, 4,5 та 4,2 т.п.н. ДНК штаму T101, 10, 8, 7 т.п.н. - його транскон'юганта, ~20 т.п.н. - штамів T201 та T710 ~16 і ~20 т.п.н. відповідно - транскон'югантів цих штамів, а також - з ДНК штаму *S.erythraea* 3005. Однак інтенсивність сигналу в ДНК досліджених трансформантів та транскон'югантів була значно меншою, ніж в ДНК донорного штаму 3005, що свідчить про малу копіюність pSE201 в клітинах цих культур. Слід відзначити, що в ДНК штамів 66 *S.lividans* та S18 *S.coelicolor* A3(2), які були реципієнтами в наших експериментах, не виявлено послідовностей, які б гібридувались з pSE201. Отримані результати підтверджують присутність в геномах трансформантів і транскон'югантів *S.lividans* 66 та *S.coelicolor* A3(2) плазмиди pSE201.

Отже, в геномі *S.erythraea* ідентифіковано плазмиду

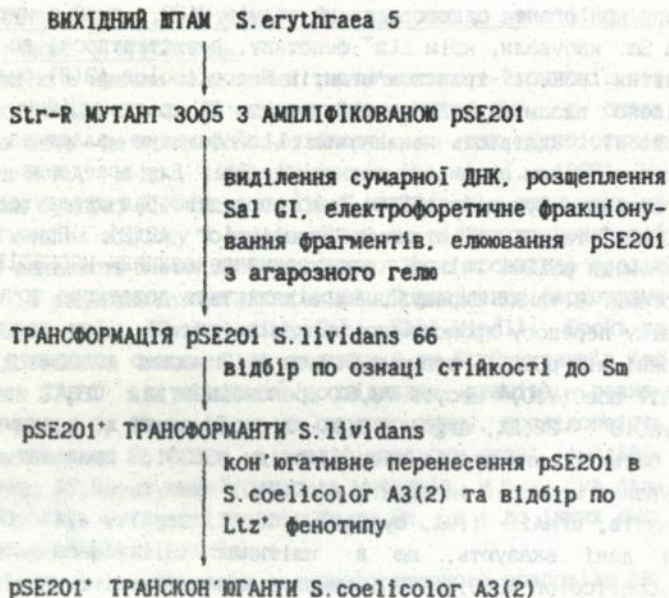


Рис.7. Схема переносу pSE201 з *S. erythraea* у інші види *Streptomyces*.

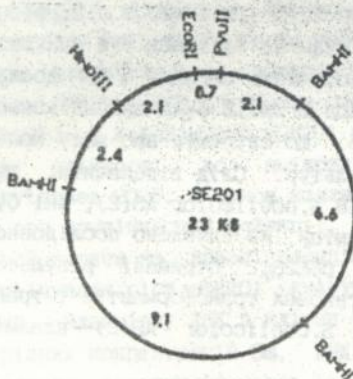


Рис.8. Рестрикційна карта плазміди pSE201.

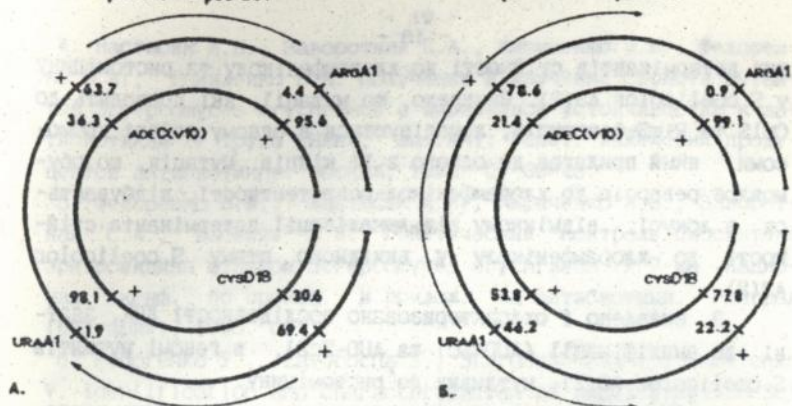


Рис.9. Градієнти успадкування хромосомних маркерів у схрещуваннях між pSE201<sup>+</sup> і pSE201<sup>-</sup> штамми S18 (SCP1<sup>-</sup>SCP2<sup>-</sup>) та pSE201<sup>-</sup> штамом A617 (SCP1<sup>+</sup>SCP2<sup>+</sup>).

pSE201, здатну до ампліфікації, яка викликає в ампліфікованому стані значне збільшення резистентності до Sm та до інших аміноглікозидів. pSE201 не вдалося виділити з клітин мутантів *S.erythraea* як позахромосомну ДНК. Це може бути пов'язано з цілим рядом причин, головною з яких є інтеграція pSE201 в хромосому 1, можливо, її здатність до ампліфікації в складі хромосоми. В літературі описано ряд плазмід, ідентифікованих в геномі різних штамів *S.erythraea* [Brown D.P., et.al., 1988, Ухаботина Л.С., и др., 1988]. Порівняння структури цих плазмід з pSE201 показало, що нами ідентифіковано неописаний раніше елемент геному *S.erythraea*. Важливою особливістю плазмиди pSE201 є її здатність до кон'югативного перенесення в клітини актиноміцетів, які належать до іншого роду - *Streptomyces*: *S.coelicolor* A3(2) та *S.lividans*, обумовлюючи в них зміни прояву ознак стійкості до аміноглікозидів, подібно до тієї, яка властива для вихідного штаму *S.erythraea*.

### ВИСНОВКИ

1. Вивчено множинну зміну ознак антибіотикорезистентності *S.coelicolor* A3(2). Виявлено, що мутація хлорамфенікол-чутливості збільшує ступінь генетичної нестабільності детермінату стійкості до ристоміцину.

2. Показано хромосому локалізацію генетично нестабіль-

них детермінантів стійкості до хлорамфеніколу та ристоміцину у *S.coelicolor* A3(2). Виявлено, що мутації, які приводять до Sm<sup>r</sup>S та Rlm<sup>r</sup>S-фенотипів, локалізуються в одному районі хромосоми, який прилягає до одного з її кінців. Мутація, що обумовлює реверсію до хлорамфенікол-резистентності, відбувається в локусі, відмінному від локалізації детермінанта стійкості до хлорамфеніколу у вихідного штаму *S.coelicolor* A3(2).

3. Виявлено і охарактеризовано послідовності ДНК, здатні до ампліфікації (AUD-Sc1 та AUD-Sc2), в геномі мутантів *S.coelicolor* A3(2), чутливих до ристоміцину.

4. Ідентифіковано та охарактеризовано генетично нестабільну ознаку стрептоміцин-резистентності у продуцента еритроміцину *S.erythraea*. Селекція стрептоміцин-резистентних мутантів рекомендована як один з етапів в отриманні штамів *S.erythraea*, які здатні до підвищеного біосинтезу еритроміцину.

5. В геномі мутантів *S.erythraea*, стійких до стрептоміцину, виявлено плазмиду pSE201 розміром 23 т.п.н. в ампліфікованому стані. Ця плазміда детермінує резистентність *S.erythraea* до аміноглікозидних антибіотиків. Показано здатність pSE201 трансформувати *S.lividans* 66 та переноситись кон'югативно з трансформантів у *S.coelicolor* A3(2), обумовлюючи прояв ознак стійкості до аміноглікозидів у цих штамів.

#### СПИСОК

##### робіт, опублікованих по матеріалах дисертації

1. Федоренко В.А., Стародубцева Л.И., Заворотная С.А., Ломовская Н.Д., Даниленко В.Н. Характеристика множественного изменения признаков устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Генетика. 1989. 25. 4. С.626-634.
2. Заворотная С.А., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Генетическая нестабильность признака стрептомицинустойчивости у *Streptomyces erythraeus* // Антибиот. и химиотер. 1990. т.35. N12. С.18-21.
3. Заворотная С.А., Федоренко В.А., Стародубцева Л.И., Даниленко В.Н. Амплифицирующиеся последовательности в геноме *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Антибиотики и химиотерапия. 1990. т.35. N 12. С. 21-23.

4. Настасяк И.Н., Заворотная С.А., Кириченко Н.В., Федоренко В.А., Даниленко В.Н. Получение и изучение свойств мутантов *Streptomyces erythraeus* с измененной устойчивостью к антибиотикам // Труды ВНИИА, вып. XXI. Генет. инженерия продуцентов антибиотиков. Москва, 1992. С. 39-45.

5. Федоренко В.А., Настасяк И.Н., Кириченко Н.В., Заворотная С.А., Базилия Л.И. Генетический контроль биосинтеза эритромицина штаммом *Streptomyces erythraeus* // 7-ма Национал. конф. по произв. и прилож. на антибиотици. Разград (Болгария), 1990. С.11.

6. Fedorenko V., Zavorotna S., Starodubtseva L., Danilenko V. Identification and characterization of amplifying AUD-Sc1 and AUD-Sc2 sequences of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Abstr. Int. Symp. Gen. and Product. Formation, Erfurt, GDR, 1990. P.48.

7. Fedorenko V., Zavorotnaya S. Genetic instability of streptomycinresistance in the erythromycin-producing organism *S.erythraeus* // Abstr. 6th Int. Symp. Genet. Ind. Microorgan., Strasburg, 1990. P.94.

8. Заворотная С.А., Фурс А.Р., Настасяк И.Н., Базилия Л.И., Кириченко Н.В., Коновалова Т.В., Федоренко В.А. Создание рекомбинантных штаммов-продуцентов антибиотика эритромицина. Тез. докл. 1 Всесоюз. план.-отчет. конф. по напр. "Ген. и клеточ. инженерия". Пушино-на-Оке, нояб.-дек., 1990, М. 1991. С.163-164.

9. Заворотна С.А., Федоренко В.О. Ідентифікація послідовності, адатної до ампліфікації, в геномі *Streptomyces erythraeus* // Тези доповідей на VI з'їзді УТТС. Полтава. 1991. С.16-17.

10. Заворотная С.А., Настасяк И.Н., Кириченко Н.В., Федоренко В.А. Создание рекомбинантных штаммов-продуцентов антибиотика эритромицина. Тез. докл. 2 Всесоюз. план.-отчет. конф. по направл. "Ген. и клеточ. инженерия". Пушино-на-Оке, нояб.-дек. 1991. М. 1992. С.111-112.

11. Федоренко В.О., Настасяк І.М., Кириченко Н.В., Базилия Л.І., Заворотна С.А. Генетичне та генноінженерне конструювання штамів-продуцентів еритроміцину *Saccharopolyspora erythraea* // Мікробіол. журнал. 56. 1. 1994. С.108.

12. Заворотна С.А. Вивчення механізмів генетичної нестабіль-

ності ознак у *Saccharopolyspora erythraea* // Мікроб. журнал. №1. 1994. 56. С. 106.

13. Fedorenko V., Zavorotna S. Expression of streptomycin-resistance determinant from *Saccharopolyspora erythraea* in *Streptomyces lividans* and *S.coelicolor* A3(2) // Theses the 9th Int. Symp. of the Biology of Actinomycetes, 1994. Moscow, Russia. P. 108.

14. Nastasiak I., Zavorotna S., Shengofer N., Kiritchenko N., Maryina O., Fedorenko V. Properties of *Streptomyces ambofaciens* mutants with altered resistance to antibiotics. // Theses the 9th Int. Symp. of the Biology of Actinomycetes, 1994. Moscow, Russia. P.104.

15. Zavorotna S., Fedorenko V. The pSE201 plasmid of *Saccharopolyspora erythraea*.//7th Int. Symp. Gen. Ind. Microorg. Abstr., Montreal, Canada. 1994. P.252.

16. Fedorenko V., Nastasiak I., Zavorotna S., Shengofer N., Kiritchenko N. Genetic instability of chloramphenicol-resistance in *Saccharopolyspora erythraea* and *Streptomyces ambofaciens*.// 7th Int. Symp. Gen. Ind. Microorg. Abstr., Montreal, Canada. 1994. P.25.

17. Fedorenko V., Zavorotna S., Basilia L., Kiritchenko N. Genetic instability in *Saccharopolyspora erythraea* //10 VAAM Tagung "Biologie der Actinomyceten" Abstr., Jena, 1994. P.7.

18. Zavorotna S., Nastasiak I., O'lynik M., Basilia L., Fedorenko V. Genetic improvement of the erythromycin produced strains *Saccharopolyspora erythraea* //7th European congress on biotechnology. Nice. 1995. Abstract Book. 2. P.56.

#### **Заворотная С.А.**

**Изучение молекулярно-генетических механизмов нестабильности признаков устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces coelicolor* A3(2) и *Saccharopolyspora erythraea*.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 - генетика. Украинский научный центр гигиены, Киев, 1996.

Показано, что происходит множественное изменение признаков антибиотикорезистентности у *S.coelicolor* A3(2). С высокой частотой появляются мутанты, чувствительные к хлорамфениколу (Cm) и ристомицину (Rm), которые способны реверти-

ровать к CmR<sup>R</sup> и RmR-фенотипу. Наблюдается различие в уровнях устойчивости к антибиотикам ревертантов и исходного штамма. Мутация cmIS увеличивает степень генетической нестабильности детерминанта устойчивости к Rm. Гены резистентности к Cm и Rm сцеплены и локалируются на одном из концов хромосомы *S.coelicolor* A3(2). В геноме мутантов с множественными изменениями признаков резистентности к антибиотикам идентифицированы амплификации последовательностей ДНК.

У *S.erythraea* обнаружен генетически нестабильный признак резистентности к стрептомицину (Sm). В геноме штаммов *S.erythraea* выявлена плаزمида pSE201. В амплифицированном состоянии эта плазмида обеспечивает повышение устойчивости к Sm и другим аминогликозидам.

Ключові слова: актиномицети, стрептоміцин, генетична нестабільність, резистентність, біосинтез антибіотиків, плазмідн.

#### Zavorotna S.

**Molecular-genetic instability mechanisms of antibiotic-resistance studying in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Saccharopolyspora erythraea*.**

The Candidate Thesis for a Philosophy Degree, a Speciality 03.00.15 - Genetics, Ukrainian Research Hygienic Center, 1996.

Multiple changes of antibiotic resistance properties were characterised in *S.coelicolor* A3(2). When reverting to chloramfenicol (Cm) and ristomycin (Rm) resistance they demonstrated different that initial strains' levels of antibiotic resistance. Cm-sensitive (CmIS) mutation resulted in the increase of genetic instability of Rm-resistance determinant. Cm- and Rm-resistance genes are closely linked and localised on one of the ends of *S.coelicolor* A3(2) chromosome. Amplifying DNA sequences were identified in the genomes of mutants with multiple changes of antibiotic resistance.

Genetically unstable streptomycin-resistance determinant was found in *S.erythraea*. pSE201 plasmid was detected in the genome of *S.erythraea* strains. Increasing of streptomycin and aminoglycoside resistance is determined by the amplification of this plasmid.

308  
445589

АВ 34.474

Підписано до друку 18.03.1996. Формат 60x84. 1/16  
Ум. друк. арк. 1,25. Тираж 100 пр. Зам. N 180

---

Фотопринт Львівської обласної книжкової друкарні  
290000, Львів, вул. Стефаніка, 11