

**Я.П. Грубський, О.В. Аравіцька, М.Л. Мироновський,
О.М. Громико, Б.О. Осташ, В.О. Федоренко**

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

ВПЛИВ N-МЕТИЛ-N'-НІТРО-N-НІТРОЗОГУАНІДИНУ ТА N-МЕТИЛ-N-НІТРОЗОМЕТИЛСЕЧОВИНИ НА АНТИБІОТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТА СІОМІЦИНУ *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81

*Досліджено вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) та N-метил-N-нітрозометилсечовини (НМС) на життєздатність та антибіотичну активність продуцента сіоміцину *S. sioyaensis* Lv81. Встановлено, що оптимальними для отримання клонів з підвищеною антибіотичною активністю є дози НГ і НМС, при яких виживає, відповідно, 20–30 % і близько 0,2 % спор досліджуваного штаму. Для виявлення клонів *S. sioyaensis* Lv81 з підвищеним синтезом сіоміцину можна використовувати метод, що ґрунтується на стимулюванні сіоміцином росту на середовищі з канаміцином штаму *Streptomyces lividans* TK24, який містить плазмиду pMO16 з геном канаміцин-і неоміцин-стійкості neo під контролем tirA-промотора.*

К л ю ч о в і с л о в а: Streptomyces sioyaensis, сіоміцин, N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, N-метил-N-нітрозометилсечовина, мутант.

Актиноміцети продукують більшість відомих сьогодні антибіотиків [8]. Серед вторинних метаболітів актиноміцетів значний інтерес становлять тіопептиди, зокрема тіострептон та найближчий до нього за будовою сіоміцин. Ці антибіотики виявляють активність щодо грампозитивних бактерій, у тому числі *Mycobacterium tuberculosis*, блокуючи білковий синтез. Крім того, вони пригнічують розвиток збудника малярії *Plasmodium falciparum*, а також діють як імуносупресанти та протипухлинні агенти. Тіопептиди відкриті ще в 50-х роках ХХ століття, однак у медицині їх не використовували насамперед через погану розчинність цих сполук у воді [5, 7, 12, 15].

Значне розповсюдження резистентності збудників інфекцій та ракових клітин до антибіотиків зумовлює необхідність пошуку та використання нових антибактерійних і протипухлинних агентів. За цих умов тіопептиди знов привернули велику увагу дослідників, оскільки на їхню мішень у бактерійній клітині, а саме комплекс рибосомного білка L11 і 23S рРНК [5], не діють інші, широко вживані антибіотики.

Сіоміцин продукується штамом *Streptomyces sioyaensis* Lv81 (=NRRL-B5408). Механізм біосинтезу цього антибіотика, його генетичний контроль, а також генетичні особливості штаму-продуцента вивчені недостатньо. Лише нещодавно клоновано кластери генів біосинтезу тіострептон та сіоміцину і доведено, що їхній пептидний



попередник синтезується на рибосомах [11], а також створено систему клонування генів у клітинах *S. sioyaensis* [13]. Умовою успішного вивчення закономірностей біосинтезу сіоміцину, а також отримання його біотехнологічних продуцентів з високим рівнем антибіотичної активності, є створення системи селекції мутантів *S. sioyaensis*.

Метою роботи є визначення умов виділення клонів *S. sioyaensis* зі зміненою здатністю до біосинтезу сіоміцину з використанням алкілувальних мутагенів N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) і N-метил-N-нітрозометилсечовини (НМС).

Матеріали і методи

У роботі використано штами *Streptomyces sioyaensis* Lv81(=NRRL-B5408), *S. globisporus* 1912-2 (продуцент ландоміцину Е), *S. nogalater* IMET 43360 (продуцент ногаламіцину) і *S. kanamyceticus* (продуцент канаміцину) з Колекції культур мікроорганізмів — продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка, а також подібні *S. sioyaensis* Lv81, виділені у цій роботі. Штам *Sarcina lutea* використали як тест-культуру для визначення антибіотичної активності *S. sioyaensis*. Для аналізу біосинтезу сіоміцину використали також штам *Streptomyces lividans* ТК24, який містить плазмиду рМО16.

Для отримання спор штами *S. sioyaensis* вирощували на вівсяному середовищі [3] при температурі 28 °С. Антибіотичну активність *S. sioyaensis* вивчали на соєвому середовищі СС-14 [3] та середовищі SG [10]. Штам *Sarcina lutea* і *Streptomyces lividans* ТК24 (рМО16) вирощували на триптозному агарі [10] при температурі 37 °С та 28 °С, відповідно. У роботі використано N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (НГ) фірми “Fluka” та N-метил-N-нітрозометилсечовину (НМС) фірми “Sigma”.

Антибіотичну активність *S. sioyaensis* визначали методом дифузії в агар з пригніченням при цьому росту тест-культур. Визначали індекси продуктивності (ІП) окремих клонів культури [2, 4, 14]. Екстракцію сіоміцину з біомаси *S. sioyaensis* і тонкошарову хроматографію (ТШХ) екстрактів проводили як описано [13]. Для порівняльного аналізу рівня біосинтезу сіоміцину вихідним штамом та його мутантами застосували також тест-систему *S. lividans* ТК24 (рМО16) [9, 13].

Спори *S. sioyaensis* обробляли НГ та НМС, як описано [1, 4].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення

Досліджено вплив різних доз НГ і НМС на життєздатність спор *S. sioyaensis* та порівняно його з іншими актиноміцетами за чутливістю до цих мутагенів. НГ використали в трьох концентраціях: 5, 7 і 10 мг/мл і обробляли спори актиноміцетів протягом 10—40 хв. У всіх варіантах дослідів, де використали 10 мг/мл НГ, спостерігали повну загибель спор *S. sioyaensis* та *S. globisporus*. Натомість обробка спор *S. nogalater* НГ у концентрації 10 мг/мл протягом 10 хв зумовлювала лише падіння виживання спор приблизно у 2 рази. Оброблення спор *S. sioyaensis* НГ у концентраціях 5 і 7 мг/мл протягом 10 хв знижувало їхнє виживання до 60 %. Якщо ж спори обробляли НГ у концентрації 5 мг/мл протягом 20 хв, то їхнє виживання знижувалося до 40 %, а через 30 хв — до 20 %. При концентрації 7 мг/мл НГ спостерігали більш істотні відмінності у виживанні спор: близько 20 % при дії мутагену протягом 20 хв і 3 % при 30 хв інкубації. Зростання тривалості обробки



НГ до 40 хв знижує виживання спор ще у 10 разів. Характер кривих виживання свідчить про те, що *S. sioyaensis* значно стійкіший до дії НГ, ніж *S. globisporus*, але чутливіший, ніж *S. nogalater* (рис. 1).

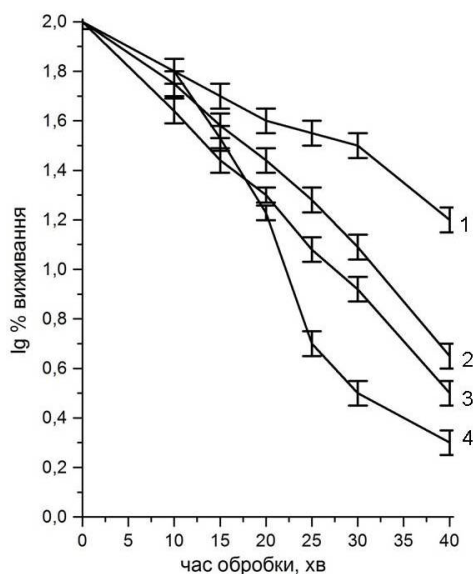


Рис. 1. Вплив НГ на виживання спор штамів: *S. sioyaensis* (1 – концентрація НГ 5 мг/мл; 4 – 7 мг/мл), *S. nogalater* ІМЕТ 43360 (3 – 10 мг/мл), *S. globisporus* 1912-2 (2 – 3 мг/мл)

Fig. 1. The influence of NG on the spores survival of the following strains: *S. sioyaensis* (1 – concentration of NG 5 mg/ml; 4 – 7 mg/ml), *S. nogalater* ІМЕТ 43360 (3 – 10 mg/ml), *S. globisporus* 1912-2 (2 – 3 mg/ml)

НМС використовували в концентраціях 20, 30 та 50 мг/мл. Тривалість обробки спор *S. sioyaensis* – з 2 до 5 год (рис. 2). При концентрації мутагену 20 мкг/мл і збільшенні часу експозиції з 2 до 5 год виживання спор знижується з 96 % до 5 %. Не спостерігали значних відмін між загибеллю спор при концентраціях НМС 30 і 50 мг/мл (рис. 2, 2 і 3). Якщо після 3 год обробки виживало близько 90 % спор, то після 4 і 5 годин – 0,1–0,2 % і 10^{-3} – 10^{-4} %, відповідно. *S. sioyaensis* більш стійкий до НМС порівняно з *S. kanamyceticus* (рис. 2, 4 і 5). Наприклад, 0,2 % спор *S. kanamyceticus* виживали при 30 мг/мл НМС за дії мутагену протягом 30 хв.

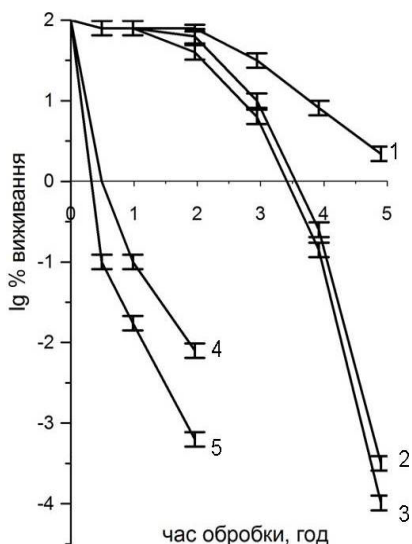


Рис. 2 Вплив НМС на виживання спор штамів: *S. sioyaensis* (1 – концентрація НМС 20 мг/мл, 2 – 30 мг/мл, 3 – 50 мг/мл) та *S. kanamyceticus* (4 – 20 мг/мл), 5 – 30 мг/мл)

Fig. 2. The influence of NMU on the spores survival of the following strains: *S. sioyaensis*, (1 – concentration of NMU 20 mg/ml, 2 – 30 mg/ml, 3 – 50 mg/ml) та *S. kanamyceticus* (4 – 20 mg/ml), 5 – 30 mg/ml)



Важливою особливістю НГ як мутагену є його здатність індукувати виникнення мутацій, не спричиняючи високої летальності клітин. Діапазон ефективних доз НГ досить широкий. Для актиноміцетів це дози, при яких виживає від 10 до 50 % спор [6]. Натомість НМС дає найкращий ефект в іншому діапазоні доз — тих, що зумовлюють виживання на рівні 0,1–1,0 % [1]. Тому на наступному етапі роботи, присвяченому вивченню впливу НГ і НМС на антибіотичну активність *S. siouyaensis* використали мутагени у дозах, при яких досягалися такі рівні виживання спор штаму — 7 мг/мл НГ і час обробки 15–30 хв, а також 30 мг/мл НМС і час обробки 4 год (табл. 1).

В таблиці 1 наведено порівняння за ІП спонтанних клонів вихідного штаму дикого типу Lv81 з клонами культури, яку обробили мутагенами. Дійсно, використані дози НГ збільшували мінливість *S. siouyaensis* за рівнем антибіотичної активності: коефіцієнт варіації CV зріс на 5–10 %. Спостерігається незначне збільшення цього коефіцієнту після обробки НМС. У всіх випадках після мутагенізації спор зростало середнє значення ІП, особливо сильно (на 40,3 %) при використанні 7 мг/мл НГ протягом 15 хв. За цих умов більш, ніж в п'ять разів зростала частка «плюс»-варіантів з рівнем антибіотичної активності, вищим від $+2\sigma$. Саме ці варіанти вважають найбільш цінними у селекційному відношенні [2]. Більш, ніж вдвічі зростала частка «плюс»-варіантів і за інших режимів мутагенної обробки НГ і НМС. Натомість лише в одному випадку (30 хв обробки НГ) спостерігали значне зростання частки „мінус”-варіантів, які мають антибіотичну активність, меншу від -2σ . Після обробки НГ вдалося виділити один мутант, який не продукує біоміцину зовсім.

Таблиця 1
Вплив НГ та НМС на антибіотичну активність *S. siouyaensis* Lv81

Table 1
The NG and NMU influences on antibiotic activity of *S. siouyaensis* Lv81

Мутаген	Час обробки спор, хв	Кількість клонів	Середнє значення ІП, %	Частка «плюс»-варіантів, %	Частка «мінус»-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
Контроль	0	395	100,0	4,5	1,4	39,8
НГ	15	186	140,3	26,2	0	45,3
НГ	20	185	103,8	11,3	1,6	49,0
НГ	30	164	103,8	9,7	4,3	48,1
НМС	240	533	109,6	9,3	0,6	41,3

Примітка: за 100 % приймали середнє значення ІП спонтанних клонів штаму *S. siouyaensis* Lv81, вирощених на ВС.

Отримані дані свідчать про те, що обробку НГ у вказаних дозах доцільно використовувати для мутагенізації *S. siouyaensis* з метою виділення клонів зі збільшеним рівнем синтезу сіоміцину. Найкращі результати отримано при обробці спор штаму НГ у концентрації 7 мг/мл протягом 15–20 хв, коли виживання спор становить 20–30 %.



У результаті виділено та проаналізовано 87 “плюс”-варіантів, індукованих НГ і 23 — НМС. На рис.1 наведено порівняння їхніх ІП з показниками “плюс”-варіантів, виділених серед окремих клонів вихідного (немутагенізованого) штаму. Більше половини (52,2 %) “плюс”-варіантів вихідного штаму мали ІП від 9,8 до 11,0, третина (34,8 %) — від 11,1 до 14,0 і 13,0 % — від 14,1 до 17,0. Зі збільшенням часу експозиції спор *S. siolyaensis* з 15 до 30 хв при концентрації НГ 7 мг/мл зростала частка “плюс”-варіантів з відносно найменшими ІП — від 9,8 до 11,0. Серед клонів, отриманих після мутагенізації протягом 20 і 30 хв, їх навіть більше, ніж в контролі. Однак частка клонів з більшими ІП (від 11,1 до 14,0) майже однакова як у контролі, так і після обробки НГ протягом 15 і 20 хв. За більшого інтервалу часу (30 хв), за якого сильно знижується виживання спор (до 3,5 %), таких клонів вже значно менше. Максимальні ІП, які спостерігали як у контролі, так і після дії НГ становили 14,1–17,0. Найбільше клонів з такими ІП (18 %) виявили серед тих, що отримані після 15 хв обробки мутагеном. У той же час застосування НМС дало змогу виділити 30,5 % клонів з найвищими ІП — 17,1–20,0 (рис. 3). Ідентичність сіюміцину тих антибіотичних сполук, які синтезують досліджені “плюс”-варіанти, доведено за допомогою ТШХ.

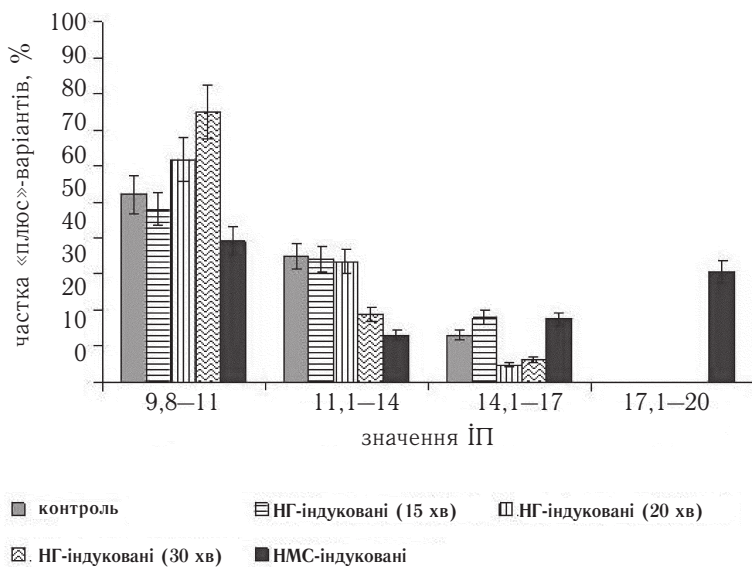


Рис. 3. Розподіл “плюс”-варіантів *S. siolyaensis*, отриманих після обробки НГ (у концентрації 7 мг/мл протягом 15 – 30 хв) і НМС (30 мг/мл, 4 год) за індексами продуктивності

Fig. 3. The productivity index distribution of “plus”-variants of *S. siolyaensis* obtained after treatment with NG (in concentration of 7 mg/ml for 15–30 minutes) and NMS (30 mg/ml, 4 hours)

Проведено порівняння вихідного штаму *S. siolyaensis* Lv81, 14 НГ- та 10 НМС-індукованих „плюс”-варіантів за здатністю стимулювати ріст *S. lividans* ТК24 (рМО16). На диски наносили однакові кількості екстрактів, виділених з однакової кількості біомаси досліджуваних штамів та накладали їх на поверхню середовищ, засіяних газоном *S. lividans* ТК24 (рМО16). Плазміда рМО16 містить ген стій-



кості до неоміцину та канаміцину *neo*, що злитий з промотором *tipA*. Тіопептидні антибіотики, у тому числі сіоміцин та тіострептон, індукують експресію генів, які знаходяться під контролем цього промотора [9]. Якщо сіоміцин присутній у середовищі, то штам *S. lividans* ТК24 (рМО16) набуває стійкості до неоміцину та канаміцину та росте на ньому. За цих умов інтенсивність росту *S. lividans* ТК24 (рМО16) зростає із збільшенням кількості сіоміцину в екстрактах, нанесених на диски [13]. Діаметри зон росту *S. lividans* ТК24 рМО16 навколо дисків з екстрактами з клітин цих мутантів були на 30 – 50 % більшими, ніж діаметри зони росту навколо дисків з екстрактом з клітин вихідного штаму Lv81.

На рис. 4 наведено приклад стимулювання росту штаму *S. lividans* ТК24 (рМО16) екстрактами, виділеними з двох “плюс”-варіантів *S. sioyaensis*: Sng50 та Sms275. Отримані дані свідчать про доцільність використання *S. lividans* ТК24 (рМО16) для виявлення штамів з підвищеним синтезом сіоміцину поряд з методом оцінювання антибіотичної активності *S. sioyaensis* по пригніченню росту тест-культури *Sarcina lutea*.

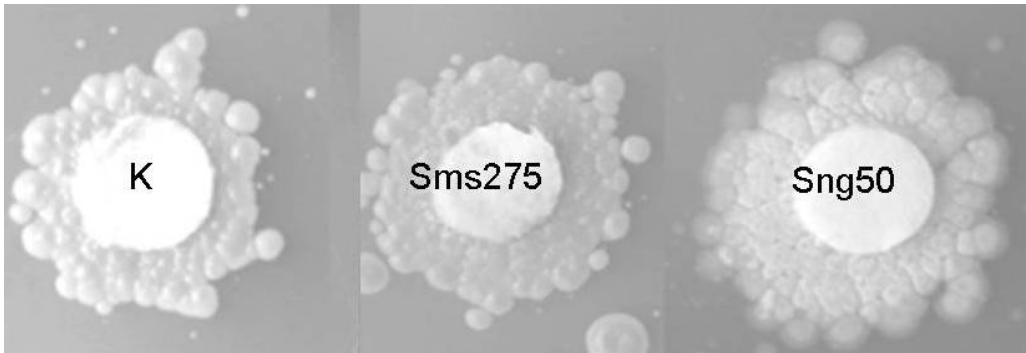


Рис. 4. Зони росту *S. lividans* ТК24 рМО16 навколо дисків з екстрактами сіоміцину з клітин *S. sioyaensis* Lv81 (К) та його мутантів Sms275 і Sng50

Fig. 4. The growth zones of *S. lividans* ТК24 рМО16 around the discs with siomycin extracts from *S. sioyaensis* Lv81 (K) cells and its mutants Sms 275 and Sng 50

Таким чином, у результаті проведених експериментів визначено залежність виживання штаму *S. sioyaensis* Lv81 від дози НГ та НМС, а також вивчено вплив цих мутагенів на антибіотичну активність. Обробка *S. sioyaensis* Lv81 НГ у дозах, що знижують виживання спор до 20–30 %, є ефективним способом отримання клонів культури з підвищеним рівнем синтезу сіоміцину.

Натомість інший алкілувальний мутаген НМС — доцільно використовувати з цією метою у дозах, що зменшують виживання спор приблизно до 0,2 %. Виявлення штамів з підвищеною продукцією сіоміцину можна здійснювати використовуючи метод, що ґрунтується на стимулюванні сіоміцином росту штаму *S. lividans* ТК24, який містить плазмиду рМО16 з геном канаміцин- і неоміцин-стійкості *neo* під контролем *tipA*-промотора. Отримані результати будуть використані у подальшій селекції штамів *S. sioyaensis*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голец Л.М., Базилия Л.И., Мазена А.И., Федоренко В.А. Получение и изучение свойств мутантов *Streptomyces kanamyceticus* с нарушениями биосинтеза канамицина // Антибиот. химиотер. — 1995.— т. 40, №1. — С. 3-7.
2. Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И., Терешин И.М., Журавлева Н.П., Шабас М.Н. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. — Л.: Медицина, 1978. — 160 с.
3. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. — М.: Агропромиздат, 1990. — 240 с.
4. Федоренко В.О., Остах Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 279 с.
5. Bagley M.C., Dale J.W., Merritt E.A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. — Vol.105, N2. — P. 685-714.
6. Baltz R. Mutation in *Streptomyces* // The bacteria. The treatise on structure and function. Vol.IX. Antibiotic-producing *Streptomyces* / Ed. by S.W.Qbeener, E.Day. — Orlando: Academic Press Inc., 1986. — P.61-94.
7. Bhat U.G., Zipfel P.A., Tyler D.S., Gartel A.L. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells // Cell Cycle. — 2008. —Vol.7. № 12. —P. 1851- 1855.
8. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress // J. Antibiot. — 2009. — Vol. 62, N1. — P. 5-16.
9. Holmes D.J., Caso J.L., Thompson C.J. Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans* // EMBO. J. — 1993. — Vol. 12, N8. — P. 3183-3191.
10. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. — Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. — 634 p.
11. Liao R., Duan L., Lei C. Liao R, Duan L, Lei C, Pan H, Ding Y, Zhang Q, Chen D, Shen B, Yu Y, Liu W. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications // Chem. Biol. — 2009. — Vol.16. № 2. — P. 141-147.
12. McConkey G.A., Rogers M. J., McCutchan T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol.272, N4. — P. 2046-2049.
13. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408 // Folia Microbiologica 2009. — Vol. 54, №2 — P. 91-96.
14. Trilli A., Costanzi I., Lamanna F., DiDio N. Development of agar disc method for the rapid screening of strains with increased productivity // J. Chem.Technol. Biotechnol. — 1982. — Vol.32. — P. 281-291.
15. Ueno M, Furukawa S, Abe F, Ushioda M, Fujine K, Johki S, Hatori H, Ueda H. Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody production // J. Antibiot. — 2004. — Vol. 57, № 9. — P. 590-596.



Я.П. Грубский, А.В. Аравицька, М.Л. Мироновский, А.Н. Громыко, Б.Е. Осташ,
В.А. Федоренко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,
тел.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

**ВЛИЯНИЕ N-МЕТИЛ-N'-НИТРО-N-НИТРОЗОГУАНИДИНА И
N-МЕТИЛ-N-НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ НА АНТИБИОТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ ПРОДУЦЕНТА СИОМИЦИНА *STREPTOMYCES
SIOYAENSIS* LV81**

Реферат

Исследовано влияние N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ) та N-метил-N-нитрозометилмоченины (НММ) на жизнеспособность и антибиотическую активность продуцента сиомицина *S. sioyaensis* Lv81. Установлено, что оптимальными для получения клонов с повышенной антибиотической активностью являются дозы НГ и НММ, при которых выживает, соответственно, 20–30 % и около 0,2 % спор штамма. Для обнаружения клонов *S. sioyaensis* Lv81 с повышенным синтезом сиомицина можно использовать метод, основанный на стимулировании сиомицином роста на среде с канамицином штамма *Streptomyces lividans* TK24, несущего плазмиду pMO16 с геном канамицин- и неомицин-устойчивости *neo* под контролем *tipA*-промотора.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Streptomyces sioyaensis*, сиомицин, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, N-метил-N-нитрозометилмочевина, мутант.

Y.P. Hrubsky, O.V. Aravitska, M.L. Myronovskyy, O.M. Gromyko, B.O. Ostash,
V.O. Fedorenko

Ivan Franko National University of Lviv, Grushevkiy str., 4, Lviv, 79005, Ukraine
tel.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE AND N-METHYL-N-NITROSOMETHYLUREA INFLUENCE ON ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81

Summary

The influences of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG) and N-methyl-N-nitrosomethylurea (NMU) on both viability and antibiotic activity of *S. sioyaensis* Lv81 were investigated. We have determined that the optimal doses of NG and NMU for screening of the clones with increased antibiotic production are those leading to 20-30% and approximately 0,2 % spore survival, respectively. For detection of *S. sioyaensis* Lv 81 clones with increased level of siomycin biosynthesis, a *tipA*-based reporter method can be used. It is based on stimulation of the growth of *S.lividans* TK24 carrying pMO16 plasmid (carries kanamycin/neomycin resistance gene fused to thiopeptide-responsive *tipAp* promoter) by siomycin on the medium supplemented with kanamycin.

К е у w o r d s: *Streptomyces sioyaensis*, siomycin, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-methyl-N-nitrosomethylurea, mutant.

