

M. P. Teplitskaya, I. E. Sokolova
Some aspects of genetic control of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*

УДК 577.182:579.253

М. П. Теплицкая, И. Е. Соколова

Днепропетровский национальный университет

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ У *STREPTOMYCES*

Проаналізовано основні гіпотези та експериментальні дані, подані у літературі стосовно регуляції синтезу антибіотичних речовин представниками роду *Streptomyces*. Узагальнено дані про кластерну організацію генів біосинтезу деяких антибіотиків у цих мікроорганізмів. Наведено приклади позитивної та негативної регуляції експресії генів біосинтезу антибіотиків. Крім цього, знайдено докази, що підтверджують участь у процесі ініціації та експресії генів біосинтезу антибіотиків ще кількох генів більш високого рівня. У цьому зв'язку детально розібрано роль А-фактора у механізмі каскадно організованого процесу регуляції біосинтезу стрептоміцину, деяких інших антибіотиків, а також спорування.

These work contain a review of basic hypotheses and experimental information in relation to the problem of antibiotic synthesis regulation by the bacteria of the *Streptomyces* family. Data on cluster organization of antibiotics biosynthesis genes in these microorganisms were generalized. The examples of the positive and negative specific control of antibiotic production genes were resulted. Except for it, proofs that confirm participation of a few genes of more high level in the process of initiation and expression of antibiotics biosynthesis genes also were found. In this connection A-factor role in the mechanism of cascade-organized process of streptomycin biosynthesis control, some other antibiotics and spore determinations is discussed in detail.

Введение

Биосинтез антибиотиков – сложный многоэтапный ферментативный процесс, который обеспечивается координированной работой целого комплекса специфических генов [8]. В результате детального исследования генетической детерминации биосинтеза антибиотиков у ряда микроорганизмов-продуцентов установлено, что комплексы структурных генов и оперонов, участвующих в этом процессе, представляют собой кластеры. Очевидно, как и в случае описанных у бактерий систем оперонного типа, кластерная организация способствует координированной экспрессии, регуляции и эволюции этих генов в составе генома организма-продуцента [13].

Кластерная организация генов антибиотикообразования

В составе изученных кластеров генов биосинтеза антибиотиков обнаружены:

- а) структурные гены, кодирующие ферменты, участвующие в биосинтезе соответствующих антибиотиков;
- б) ген(ы) устойчивости, обеспечивающий защиту микроорганизма-продуцента от образуемого им антибиотика;

© М. П. Теплицкая, И. Е. Соколова, 2006

194

в) специфические регуляторные гены, контролирующие работу структурных генов и генов устойчивости [8].

На основании данных литературы можно выделить три обобщенные схемы структурно-функциональной организации участков инициации транскрипции кластеров генов биосинтеза антибиотиков (рис. 1) [10; 12; 15]. Схема 1 является отражением начального этапа развития представлений об организации механизма транскрипции кластеров генов биосинтеза антибиотиков. Схемы 2 и 3 характеризуют кластер генов биосинтеза актинородина из штамма *S. coelicolor*. По мнению В. Ю. Табакова и Т. А. Воейковой [8], кластеры генов биосинтеза стрептомицина из штамма *S. griseus* и биалафоса из штаммов *S. hydroscopicus* и *S. viridochromogenes* обладают организацией, соответствующей схеме 3.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК кластеров генов биосинтеза антибиотиков у *Streptomyces* выявил высокую степень подобия отдельных генов и их взаимного расположения в кластерах, определяющих синтез аналогичных, родственных или сходных по структуре антибиотиков. Значительные совпадения обнаружены не только между кластерами генов биосинтеза родственных антибиотиков у разных видов *Streptomyces*, но и между собственными генетическими структурами синтеза аналогичных или родственных антибиотиков стрептомицетов и эволюционно удаленных от них организмов, например, низших грибов [8; 12]. Обнаруженные сходства, как считает А. А. Прозоров [7], могут отражать единство источника происхождения кластеров биосинтеза родственных антибиотиков и их латеральное распространение между видами при помощи трансмиссивных плазмид, умеренных фагов и транспозирующихся элементов.

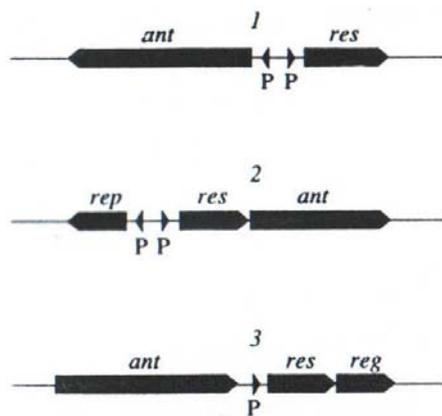


Рис. 1. Три принципиальные схемы организации кластеров генов биосинтеза антибиотиков у *Streptomyces* [15]: 1 – схема дивергентной транскрипции генов резистентности и антибиотикообразования; 2 – схема, предполагающая участие гена-репрессора, продукт которого осуществляет негативный контроль транскрипции ориентированного в противоположном направлении гена резистентности; 3 – схема специфической регуляции координированной транскрипции генов устойчивости; *ant* – структурные гены биосинтеза антибиотиков; *res* – ген устойчивости к синтезируемому антибиотику; *rep* – ген, кодирующий репрессор гена устойчивости и/или генов биосинтеза; *reg* – ген, осуществляющий позитивную регуляцию транскриптов кластера.

Хорошим подтверждением этой гипотезы является обнаружение генов устойчивости к аминогликозидным антибиотикам, в том числе генов, кодирующих аминогликозидфосфотрансферазы (*aph*) у клинических штаммов бактерий, аналогичных *aph*-генам стрептомицетов [5].

Как уже было сказано выше, гены специфической регуляции были обнаружены в составе подавляющего большинства изученных кластеров генов биосинтеза анти-

биотиков. Большая часть этих генов относится к классу позитивных регуляторов. Плазмидная амплификация этих генов в штаммах-продуцентах, как правило, вызывает усиление синтеза соответствующих антибиотиков. Такие данные получены относительно ряда генов: гена *act 11-ORF4* – регулятора биосинтеза актинородина; продуктов гена *red D*, активирующего биосинтез ундецилпродигиозина в штамме *S. coelicolor*; гена *dnr I*, активирующего биосинтез даунорубицина у *S. peucetius*; гена *brp A*, стимулирующего образование биалафоса у штамма *S. hydroscopicus*; а также для позитивного регулятора биосинтеза стрептомицина – *str R* из штамма *S. griseus* [2].

Менее распространенным типом специфической регуляции на уровне кластеров генов биосинтеза антибиотиков является негативная регуляция, контролируемая генами-репрессорами. Примером может служить кластер генов биосинтеза метиленимицина у *S. coelicolor* под влиянием локализованного в его составе гена-репрессора – *mmu R*, исследованного в работе А. С. Гусева [1].

Но расположенные в составе кластеров гены специфической регуляции типа *act 11-ORF4*, *red D*, *brp A*, *dnr I*, *str R* и другие представляют собой один из нижних уровней управления в каскадно организованной генетической системе контроля вторичного метаболизма [8]. Сложная система структурно-функциональной организации промоторов многих генов и оперонов стрептомицетов обуславливает гибкий ситуационный контроль синтеза ферментов в зависимости от состояния внешней и внутренней среды микроорганизма [8]. Наличие характерных для стрептомицетов оператороподобных участков в районах предполагаемой инициации транскрипции оперонов и кластеров свидетельствует об участии в процессе инициации транскрипции кластеров генов антибиотикообразования дополнительных факторов регуляции – продуктов регуляторных генов более высокого уровня, чем гены специфической регуляции, действующие на уровне этих оперонов и кластеров. Данные генетических и молекулярно-биологических исследований, в свою очередь, свидетельствуют, что в процессе инициации и экспрессии генов биосинтеза антибиотиков могут участвовать несколько генов, обладающих свойствами регуляторов высокого уровня [11; 14].

Значительные успехи в изучении механизма инициации кластера генов биосинтеза стрептомицина в штамме *S. griseus* достигнуты в лаборатории Т. Беппу (Япония) [9]. Основой для этих исследований послужили работы группы А. С. Хохлова, открывшей и описавшей физиологические свойства особого, экскретируемого дифференцирующимися колониями *S. griseus*, А-фактора – низкомолекулярного гормоноподобного вещества семейства γ -бутиролактонов [6]. В цитоплазме *S. griseus* обнаружен специфический рецептор А-фактора – А-фактор-связывающий белок (АСБ), который играет роль репрессора генетических структур, ответственных за спорообразование и синтез стрептомицина у штамма дикого типа.

Т. Беппу [9] была предложена следующая гипотетическая схема, объясняющая механизм зависимости регуляции биосинтеза стрептомицина от А-фактора и его связи с процессом дифференциации штамма *S. griseus* (рис. 2).

Можно представить следующую цепочку событий. На ранней стадии роста, когда продукция А-фактора еще не достигла критического уровня, АСБ репрессирует экспрессию общего гипотетического активатора биосинтеза стрептомицина и спорообразования. По мере накопления А-фактор инактивирует АСБ и индуцирует транскрипцию общего активатора. Общий активатор, в свою очередь, является позитивным регулятором обнаруженного цитоплазматического активатора кластера генов биосинтеза стрептомицина и, очевидно, активаторов процесса спорообразования, не отраженных на данной схеме. Цитоплазматический активатор, связываясь с ДНК в районе промотора гена специфической регуляции кластера биосинтеза стрептомицина *str R*, индуцирует его транскрипцию и транскрипцию лежащего вслед за ним гена устойчивости к собственному антибиотику – *aph D*.

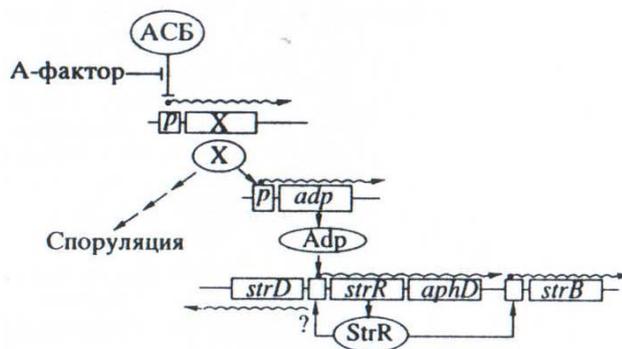


Рис. 2. Гипотетическая модель регуляции экспрессии генов биосинтеза стрептомицина у штамма *S. griseus* [1].

Регуляторный продукт гена *str R* обуславливает начало транскрипции структурных генов биосинтеза в составе кластера *co Str R*-зависимых промоторов. Начало экспрессии с промотора гена *str R* под влиянием цитоплазматического активатора обеспечивает также синтез *D*-аминогликозидфосфотрансферазы – продукта гена *aph* и установление базального уровня устойчивости штамма к собственному антибиотику.

Следует отметить, что помимо А-фактора стрептомицеты синтезируют целую группу веществ, являющихся гомологами и близкими аналогами А-фактора (рис. 3) [3]. Например, *S. coelicolor A3 (2)* не имеет А-фактора, но образует не менее шести веществ сходного строения и с такой же функцией, названных *Acl*-факторами.

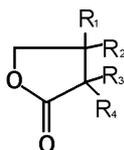
В работе В. Д. Грузиной с соавт. [4] обнаружена еще одна регуляторная роль А-фактора – стимуляция прорастания спор стрептомицетов, выражающаяся в увеличении численности образовавшихся колоний. Показано, что на среде с А-фактором (0,01–10 мкг/мл) численность проросших спор у штаммов *S. griseus 773* и *S. coelicolor A3 (2)* увеличилась соответственно на 67 и 75 %. При изучении влияния А-фактора на биосинтез антибиотиков, а именно валиномицина у *S. cyaneofuscatius* и рифампицина В у *Amycolatopsis mediterranei*, также отмечена зависимость уровня продуктивности от концентрации вносимого регулятора.

Следует также отметить избирательность стимулирующего действия А-фактора: она проявляется только в отношении спор штаммов, синтезирующих регуляторы группы А-фактора [4].

Говоря о механизме регуляции экспрессии генов биосинтеза антибиотиков у стрептомицетов, необходимо также упомянуть о гипотезе первоначальной активации генов устойчивости в кластерах биосинтеза антибиотиков, согласно которой активация генов биосинтеза происходит только после установления определенного уровня устойчивости [8]. Гипотеза основана на данных ряда авторов об особенностях структурно-функциональной организации кластеров генов биосинтеза ряда антибиотиков у *Streptomyces*.

Показано, что участки некодирующей ДНК, расположенные «выше» по ходу транскрипции генов устойчивости, содержат дивергентно-ориентированные промоторы генов, транскрибирующихся в противоположном направлении. В этой связи интересны предположения о том, что продукт гена устойчивости может выполнять две биохимически различные функции: защиту микроорганизма от образуемого им антибиотика и функционирование в качестве компонента системы активации транскрипции генов биосинтеза. На основании этого существует мнение о том, что высокая резистентность штамма к антибиотику свидетельствует о высокой продуктивности его относительно данного антибиотика [8; 12].

А-фактор



Регуляторы	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
А-фактор	—H	—CH ₂ OH	—CO—(CH ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂	—H
Гомолог А-фактора	—H	—CH ₂ OH	—CO—(CH ₂) ₃ —CH(CH ₃) ₂	—H
Гомолог А-фактора	—H	—CH ₂ OH	—CO—(CH ₂) ₂ —CH(CH ₃) ₂	—H
АсI-1a	—H	—CH ₂ OH	—СНОН—(СН ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂	—H
АсI-1b	—H	—CH ₂ OH	—H	—СНОН—(СН ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂
АсI-2a	—H	—CH ₂ OH	—СНОН—(СН ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂	—H
АсI-2b	—H	—CH ₂ OH	—H	—СНОН—(СН ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂
АсI-2c	—H	—CH ₂ OH	—СНОН—(СН ₂) ₃ —CH(CH ₃) ₂	—H
АсI-2d	—CH ₂ OH	—H	—СНОН—(СН ₂) ₄ —CH(CH ₃) ₂	—H

Рис. 3. Химическое строение А-фактора, его гомологов* и АсI-факторов** [15]:

* и ** – вещества аналогичные А-фактору по биологическому действию, поэтому в литературе обычно употребляют понятие «регуляторы группы А-фактора» либо расширительный термин «А-фактор».

Заключение

Вопросы изучения системной организации генетического аппарата *Streptomyces* приобретают в настоящее время все большую актуальность. Разработка адекватных моделей механизмов активации и регуляции экспрессии генов биосинтеза антибиотиков может быть использована для обеспечения методов генетической и биохимической инженерии для увеличения продуктивности промышленных штаммов.

Библиографические ссылки

1. Гусев А. С. Исследование кластера генов биосинтеза метиленомицина в штамме *S. coelicolor* / А. С. Гусев, К. П. Минеева, С. О. Клименко // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 52, № 13. – С. 1439–1450.
2. Ершов А. Е. Позитивные регуляторы биосинтеза антибиотиков у *Streptomyces* / А. Е. Ершов, Т. Г. Катеринова // Молекулярная генетика. – 2000. – Т. 30, № 12. – С. 1533–1549.
3. Ефременкова О. В. Регуляторы дифференциации актиномицетов (обзор) / О. В. Ефременкова, Л. Н. Анисова, Ю. Э. Бартошевич // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1985. – № 9. – С. 687–707.

4. **Обнаружение** новой регуляторной функции А-фактора стимуляции прорастания спор стрептомицетов / В. Д. Грузина, Е. В. Горбатюк, О. В. Ефременкова и др. // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 6. – С. 770–774.
5. **Определение** нуклеотидной последовательности и характеристика нового аминокликозидфосфотрансферазного гена aph VIII из штамма *Streptomyces rimosus* / В. Н. Даниленко, К. Э. Аюпянц, И. А. Сизова, Т. А. Мичурина // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 11. – С. 1478–1486.
6. **Поиск** А-факторзависимых вариантов в популяциях актиномицетов / О. В. Ефременкова, В. Д. Грузина, И. Г. Сумарукова, В. Д. Кузнецов // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 6. – С. 766–769.
7. **Прозоров А. А.** Горизонтальный перенос генов у бактерий // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120, № 6. – С. 515–528.
8. **Табаков В. Ю.** Элементы систем регуляции биосинтеза антибиотиков / В. Ю. Табаков, Т. А. Воейкова // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 11. – С. 1461–1477.
9. **Beppu T.** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation // Gene. – 1992. – Vol. 115. – P. 159–165.
10. **Hopwood D. A.** *Streptomyces* // Genetics and breeding of industrial microorganisms / D. A. Hopwood, K. F. Chater. – Rosa Raton: CRC, Inc, Fla, 1984. – P. 7–42.
11. **Horinouchi S.** Ustable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycinproducing organisms; cloning and characterization / S. Horinouchi, Y. Kumada, T. Beppu // J. Bacteriology. – 1984. – Vol. 158. – P. 481–487.
12. **Lancini G.** Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites / G. Lancini, R. Lozansetti. – L.: Plen. Press, 1993. – 236 p.
13. **Stone M.** On the evolution of functional secondary metabolites (natural products) / M. Stone, D. Williams // Mol. Microbiology. – 1992. – Vol. 6. – P. 29–34.
14. **The A-factor regulatory cascade** leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor / Y. Ohnishi, S. Kameyama, H. Onaka, S. Horinouchi // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 34, № 1. – P. 102–111.
15. **Why oure secondary metabolites** biosintesised / D. H. Williams, M. J. Stone, P. R. Hauck, S. K. Rahman // J. Natl. Prod. – 1989. – Vol. 52. – P. 1189–1208.

Надійшла до редколегії 16.12.05.

УДК 595.763.33

Л. І. Фали

Дніпропетровський національний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЖИВЛЕННЯ *PHILONTHUS DECORUS* (COLEOPTERA: STAPHYLINIDAE) У ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

Вивчено біологічні особливості та біотопічний розподіл *Ph. decorus* (Gravenhorst, 1802). Досліджено спектр живлення та коло ворогів даного виду. Охарактеризовано показники оптимальних умов утримання філонтусів у лабораторних умовах.

Biological features and biotopical distribution of *Philonthus decorus* (Gravenhorst, 1802) have been studied. Diet spectrum and enemies list have been fixed. Parameters of optimal captive conditions for *Ph. decorus* are described.

Вступ

Жуки-стафілініди відіграють суттєву роль в утриманні екологічної рівноваги штучних і антропогенно трансформованих біогеоценозів [3]. Дослідження живлення

© Л. І. Фали, 2006

199