

ЛЕКЦИЯ № 3

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ –
ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДАМИ
МУТАГЕНЕЗА И СЕЛЕКЦИИ.**

**СОЗДАНИЕ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ
МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ИНЖЕНЕРИИ**

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология»
(профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Биотехнология в производстве антибиотиков»

ПЛАН ЛЕКЦИИ

- 1. Совершенствование продуцентов антибиотиков методами мутагенеза и селекции**
- 2. Селекция продуцентов вторичных метаболитов**
- 3. Селекция продуцентов антибиотиков**
 - 3.1. Антибиотики бактериального происхождения**
 - 3.2. Антибиотики актиномицетного происхождения**
 - 3.3. Антибиотики грибного происхождения**
 - 3.4. Аспекты селекции продуцентов антибиотиков**
- 4. Создание продуцентов антибиотиков методами клеточной и генетической инженерии**

СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ (В ОТЛИЧИЕ ОТ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ) ИМЕЕТ РЯД ОСОБЕННОСТЕЙ:

- ✘ у селекционера имеется неограниченное количество материала для работы: за считанные дни в чашках Петри или пробирках на питательных средах можно вырастить миллиарды клеток;
- ✘ более эффективное использование мутационного процесса, поскольку геном микроорганизмов гаплоидный, что позволяет выявить любые мутации уже в первом поколении;
- ✘ простота генетической организации бактерий: значительно меньшее количество генов, их генетическая регуляция более простая, взаимодействия генов просты или отсутствуют.

- ✘ Селекция микроорганизмов (в отличие от селекции растений и животных) имеет ряд особенностей:
- ✘ 1. у селекционера имеется неограниченное количество материала для работы: за считанные дни в чашках Петри или пробирках на питательных средах можно вырастить миллиарды клеток;
- ✘ 2. более эффективное использование мутационного процесса, поскольку геном микроорганизмов гаплоидный, что позволяет выявить любые мутации уже в первом поколении;
- ✘ 3. простота генетической организации бактерий: значительно меньшее количество генов, их генетическая регуляция более простая, взаимодействия генов просты или отсутствуют.

ИНДУЦИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ

- ✘ Вероятность возникновения мутаций у микроорганизмов ($1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-6}$) ниже, чем у всех других организмов ($1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$). Однако, вероятность выделения мутаций по данному гену у бактерий значительно выше, чем у растений и животных, поскольку получить многомиллионное потомство у микроорганизмов достаточно просто и быстро.
- ✘ Для выявления мутаций используют селективные среды, на которых способны расти мутанты, но погибают родительские клетки дикого типа. Кроме того, проводится отбор по окраске, форме колоний, скорости роста мутантов и диких форм и т.п.

СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

- ✘ Функции (биологическая роль) вторичных метаболитов несущественны для роста микроорганизмов. Однако, данные соединения осуществляют важнейшие физиологические функции, имеющие большое значение в процессах морфогенеза, адаптации, репродукции и генетического обмена.
- ✘ Основным подходом в селекции продуцентов вторичных метаболитов является регуляция углеродного, азотного и фосфорного метаболизма, а также регуляция энергетического состояния клетки.

-
- ✘ Антибиотики широко используются человеком в своей практической деятельности. При этом области их применения весьма разнообразны:
 - ✘ 1. они обладают высокой физиологической активностью в отношении многих бактерий, вирусов, грибов, водорослей и простейших;
 - ✘ 2. задерживают или полностью останавливают развитие злокачественных новообразований (опухолей);
 - ✘ 3. применяются в качестве лекарственных препаратов для терапии заболеваний человека и животных.

АНТИБИОТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✗ грамицидин С (*B. brevis*);
- ✗ полимиксины (*B. polymyxa*, *B. circulans*);
- ✗ бацитрацины (*B. licheniformis*);
- ✗ низины (*Streptococcus lactis*)
- ✗ В частности, грамицидины, имеют 5 форм (А, В, Сd, С(S), D), и отличаются своим аминокислотным составом; полимиксины, имеют порядка 22 форм (А₁, А₂, В₁, В₂, С, D₁, D₂, Е₁, Е₂, М, Р₁, Р₂ и др.), и содержат в своем составе диаминомасляную и метилоктановую кислоты; бацитрацины имеют 10 форм (F, F₁, В, С, D, F₁, F₂, F₃, G); низины имеют 7 форм белковой природы.

АНТИБИОТИКИ АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✘ 1. Аминогликозиды представляют собой антибиотики, содержащие гликозидные связи. К ним относятся:
- ✘ стрептомицин (*Streptomyces griseus*);
- ✘ неомицин (*Streptomyces fradiae*, *Streptomyces albogriseolus*);
- ✘ канамицины (*Streptomyces kanamyceticus*);
- ✘ гентамицины (*Micromonospora purpurea*);
- ✘ фортомицины (*Saccharopolyspora hirsuta*, *Streptomyces sannanensis*).

АНТИБИОТИКИ АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✘ 2. Тетрациклины представляют собой антибиотики, имеющие в своем составе четыре бензольных кольца. К ним относятся:
 - ✘ хлортетрациклин (*Str. aureofaciens*);
 - ✘ окситетрациклины (*Str. rimosus*);
 - ✘ тетрациклины (*Str. aureofaciens*).

АНТИБИОТИКИ АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✘ 3. Актиномицины представляют собой антибиотики, содержащие в своем составе хромофорную часть, соединенную с двумя полипептидами. Каждый полипептид содержит лактонный цикл, раскрытие которого приводит к потере биологической активности.
- ✘ Разнообразие антибиотиков связано с различием аминокислот, входящих в состав функции полипептида. Наиболее широко используемыми продуцентами актиномицинов являются *Str. antibioticus*, *Str. chrysomallus* и *Str. flavus*. Отличительной чертой актиномицинов является их способность задерживать рост злокачественных опухолей.

АНТИБИОТИКИ АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✘ 4. Макролиды представляют собой антибиотики, несущие в своей структуре макроциклическое лактонное кольцо, связанное с несколькими углеводными остатками. Среди них различают:
 - ✘ а) макролиды, подавляющие развитие грамположительных бактерий:
 - ✘ эритромицин (*Str. erythreus*);
 - ✘ олеандомицин (*Str. antibioticus*);
 - ✘ магнамицин (*Str. halstedii*).
 - ✘ б) антифунгального действия;
 - ✘ филиппин (*Str. filippensis*);
 - ✘ пимарицин (*Str. notalensis*).

АНТИБИОТИКИ АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- × 5. Анзамицины представляют собой антибиотики, в структуре молекулы которых присутствует ароматическое ядро и связанная с ним алифатическая цепь. Антибиотики данной группы оказывают антибактериальное и противовирусное действие, а также подавляют развитие ряда эукариот:
- × стрептоварицины (*Str. spectabilis*);
- × рифампицин (*Nocardia mediterranea*, некоторые *Micromonospora*);
- × толипомицин (*Str. tolypophorus*);
- × галамицин (*Micromonospora halophilic*);
- × майтанзиноиды (*Nocardia*);
- × нафтомицин (*Str. collinus*);
- × гельданамицин (*Str. hygrosopicus*).

АНТИБИОТИКИ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- ✘ Мицелиальные грибы являются продуцентами большого числа антибиотиков (описано около 1200 видов). При этом наибольший практический интерес представляют β -лактамы:
- ✘ пенициллины (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *Asp. flavus*, *Asp. flavipes*, *Asp. nidulans*);
- ✘ цефалоспорины (*Cephalosporium acremonium*).
- ✘ К другим антибиотикам грибного происхождения относятся:
- ✘ фумагиллин (*Asp. fumigatus*);
- ✘ гризофульвин (*P. nigricans*, *P. urticae*);
- ✘ трихотецин (*Trichothecium roseum*) и др.

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА.

- ✘ Для получения пенициллина в количестве, достаточном для терапии одного больного, требовалось переработать около 1000 л «грибного бульона». Кроме того, необходимо было найти более активный продуцент данного антибиотика, научиться его культивировать в больших количествах, а также разработать способ выделения пенициллина в чистом виде. Этот комплекс проблем решили в 1943 г. в США. При получении высокоактивного продуцента пенициллина культуру гриба *Penicillium chrisogenum* подвергали воздействию физических (рентгеновское или ультрафиолетовое излучение) или химических (азотистый иприт) мутагенов, а затем отбирали наилучшие (по производительности) продуценты. После повторения данной процедуры более 20 раз был выделен подходящий штамм продуцента данного антибиотика, производительность которого, в сравнении с диким штаммом, увеличилась в 10000 раз. При этом концентрация пенициллина в культуральной жидкости составила порядка 2 %. Следует отметить, что в настоящее время поиск новых более производительных продуцентов пенициллина продолжается. В частности, продуктивность лучших из них составляет около 50 г пенициллина на 1 л питательного раствора.

СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

- ✘ В целях создания новых более продуктивных штаммов необходимо решить следующие задачи:
- ✘ 1. повышение эффективности традиционного мутагенеза за счет его направленности;
- ✘ 2. создание клонирующих векторов на основе трансмиссивных плазмид или фагов;
- ✘ 3. разработка методов обнаружения внехромосомной ДНК у штаммов продуцентов;
- ✘ 4. создание рекомбинантного генома путем слияния протопластов продуцентов и путем их трансформации;
- ✘ 5. получение новых антибиотиков на основе мутасинтеза.

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

- ✘ ключевое значение в современной селекции продуцентов антибиотиков придается конструированию клонирующих векторов на основе трансмиссивных плазмид и фагов. О существенной роли плазмид в процессе образования антибиотиков свидетельствуют полученные данные по продуцентам аминогликозидов, тетрациклинов, хлорамфеникола, цефамезина и др. Однако, гены, непосредственно ответственные за биосинтез антибиотиков, расположены на хромосоме и объединены в кластеры. Эти кластеры включают, кроме генов синтетаз, гены устойчивости к собственным антибиотикам и регуляторные элементы с позитивными и негативными ответами на их синтез. Введение данных фрагментов, содержащих весь кластер генов биосинтеза, в конструируемый штамм позволит получить сверхпродуценты БАВ, в том числе и антибиотиков.

- ✘ Процесс биосинтеза антибиотика состоит из десятков ферментативных реакций, так что клонирование всех генов его биосинтеза является очень сложной задачей. Один из подходов к выделению полного набора таких генов основан на трансформации одного или нескольких мутантных штаммов, не способных синтезировать данный антибиотик, банком клонов, созданным из хромосомной ДНК штамма «дикого» типа. После введения банка клонов в мутантные клетки проводят отбор трансформантов, способных синтезировать антибиотик. Затем выделяют плазмидную ДНК клона, содержащего функциональный экспримирующийся ген антибиотика (т.е. ген, восстанавливающий утраченную мутантным штаммом функцию), и используют ее в качестве зонда для скрининга другого банка клонов хромосомной ДНК штамма «дикого» типа, из которого отбирают клоны, содержащие нуклеотидные последовательности, перекрывающиеся с последовательностью зонда. Таким путем идентифицируют, а затем клонируют элементы ДНК, примыкающие к комплементирующей последовательности, и воссоздают полный кластер генов биосинтеза антибиотика. Данная процедура относится к случаю, когда такие гены сгруппированы в одном сайте хромосомной ДНК. В случае, если гены биосинтеза разбросаны в виде небольших кластеров по разным сайтам, то необходимо иметь, по крайней мере, по одному мутанту на кластер, чтобы получить клоны ДНК, с помощью которых можно идентифицировать остальные гены кластеров.

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

- ✘ Среди наиболее распространенных антибиотиков, применяющихся для лечения различных инфекционных заболеваний, отдельное место принадлежит лекарственным препаратам из группы цефалоспоринов.
- ✘ Цефалоспорины – одни из наиболее обширных классов антибиотиков. Вследствие высокой терапевтической эффективности и низкой токсичности, цефалоспорины получили широкое распространение в клинической практике. Цефалоспорины, применяющиеся в клинике, как правило, синтезируются из общего предшественника – цефалоспорина С (цефС), продуцируемого грибом-аскомицетом *Acremonium_chrysogenum*.

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

- ✗ Для создания генно-инженерных (рекомбинантных) штаммов *A. chrysogenum* с повышенным уровнем биосинтеза цефС генетики выделили гены *A. chrysogenum*, кодирующие ключевые белки биосинтеза и транспорта данного цефалоспориноидов С – экспандазу *cefEF*, превращающую пенициллин N в деацетоксицефалоспорин С с последующим образованием дезацетилцефалоспориноидов С, и мембранный транспортер *cefT*, отвечающий за экспорт цефС из клеток *A. chrysogenum* в среду культивирования. Вслед за этим были сконструированы «кассеты экспрессии» гена *cefEF* и гена, кодирующего N-концевой гибридный белок *cefT* с желтым флуоресцентным белком *YFP* под контролем промотора *gpdA* *A. nidulans*.

МЕТОД СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

- ✘ Значительный вклад в селекцию продуцентов антибиотиков внесло применение метода слияния протопластов (протопласт – содержащее растительной или бактериальной клетки, за исключением внешней клеточной оболочки (клеточной стенки), однако вместе с клеточной (плазматической) мембраной). При реализации метода слияния протопластов бактериальных, дрожжевых или растительных клеток после удаления клеточной стенки механическим или ферментативным путем и воздействия полиэтиленгликоля, клеточная мембрана частично растворяется и осуществляется слияние протопластов двух различных штаммов и последующая рекомбинация генетического материала. После регенерации клеточной стенки микроорганизм приобретает новые (другие) свойства. Такие микроорганизмы менее стабильны, в сравнении с «дикими» штаммами, поэтому необходимо применять соответствующие методы сохранения их активности. К таким методам, прежде всего, относятся: лиофилизация и хранение под жидким азотом.

МУТАСИНТЕЗ

- ✘ Данный метод получения новых лекарственных препаратов основан на развитии резистентности продуцента к химическим аналогам уже полученных антибиотиков, в результате этого нарушаются регуляторные механизмы антибиотикообразования. В данном случае генетики и химики действуют однонаправленно.
- ✘ На первом этапе генетики получают из продуцентов мутанты, которые для образования антибиотиков требуют специфических предшественников. Затем химики синтезируют разнообразные аналоги фрагментов молекулы антибиотика. В итоге образуются, так называемые «мутасинтетические антибиотики».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЛАГОПРИЯТНЫХ (ОПТИМАЛЬНЫХ) УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ

- ✘ При разработке состава питательных сред должно учитываться то обстоятельство, что азот усваивается многими продуцентами антибиотиков только в окисленной форме (в виде нитратов). Концентрация фосфора в питательной среде строго видоспецифична. При этом для продуцентов тетрациклина, например, она не должна превышать 10 %, стрептомицина – 15 %, новобиоцина и грамицидина – 20 %.
- ✘ Источники углерода в питательной среде также подбираются индивидуально для каждого микробного штамма. В частности, для биотехнологического производства пенициллина культурой *P. chrysogenum* оптимальным источником углерода является сочетание глюкозы и лактозы, для продуцента стрептомицина (*Str. griseus*) – глюкоза, для продуцента неомицина (*Str. fradiae*) – синтетическая среда с глюкозой. При этом концентрация источника углерода в питательных средах различна для различных продуцентов. Так, для продуцента тетрациклина (*Str. aureofaciens*) – 50 мг/мл глюкозы, причем увеличение этой концентрации до 80 мг/мл вызывает явление катаболитной репрессии.