

Genetické inženýrství a výroba antibiotik

Ing. PAVEL VYSKOČIL, Dr. KAREL ZELENÝ, Výzkumný ústav antibiotik a bitransformací, Roztoky u Prahy

Úvod

Biotechnologie využívající všech současných znalostí biologie a zahrnující řadu vědních disciplín včetně genetiky, mikrobiologie, biochemie a chemického inženýrství nabývá v současnosti stále významnější úlohy v národním hospodářství každého státu. Genetické inženýrství jako součást a základ biotechnologie má zvláštní, primární a nenahraditelnou roli, neboť umožňuje konstrukci takových modifikovaných mikroorganismů, které mohou sloužit jako velice efektní a efektivní a současně pro životní prostředí vhodné pro průmyslové továrny. Ovšem převedení všech výsledků genetického inženýrství do praxe závisí právě na jeho vhodném skloubení s biotechnologií a s jejím rozvinutím [1, 2].

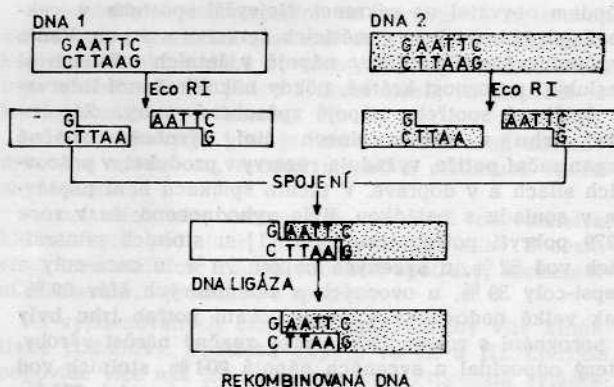
Genetické inženýrství se stává v současnosti středem zájmu mnoha pracovišť zabývajících se nejen molekulární genetikou a biologií, ale vzhledem k předpokládaným vysokým ekonomickým přínosům se stalo atraktivním i pro řadu pracovišť komerčního zaměření [3].

Mimo oblasti farmaceutického průmyslu, kde některé z výsledků jako je příprava lidského interferonu, některých peptidických hormonů nebo výroba antibiotik budou realizovány v nejbližší době, uplatní se genetické inženýrství i v dalších odvětvích, a to dokonce i v těch, kterých se v minulosti biologické procesy dotýkaly pouze okrajově. Předpokládá se výrazný vliv genetického inženýrství na potravinářský průmysl, ale i uplatnění např. při získávání čistých kovů ze surovin s jejich nízkým obsahem, při šlechtění zemědělských plodin, a to hlavně v souvislosti se zvyšováním jejich odolnosti a současně i jejich autotrofnosti. Současně se předpokládá nemalý význam genetického inženýrství v lékařství v souvislosti s přípravou monoklonálních protilátek nebo v budoucnosti i při léčení metabolických chorob, případně při odstraňování jejich příčin. V neposlední řadě se očekávají významné výsledky od genetického inženýrství i v oblasti ochrany životního prostředí.

Princip genového inženýrství

Na počátku 70. let [4, 5] se stalo metodicky možným štěpit specificky molekuly DNA tak, aby vznikaly menší fragmenty, které by bylo možno opětovně spojovat. Bylo to umožněno objevem enzymů označovaných jako res-

trikční endonukleázy. Tyto enzymy působící v buňkách jako ochrana proti cizorodé DNA jsou schopny štěpit molekuly v přesných místech určených pořadím nukleotidů. Tak např. vyskytuje-li se v molekule DNA v jednom řetězci pořadí GAATTC (tomu odpovídá pořadí CTTAAG v řetězci komplementárním) pak enzym označený EcoR I izolovaný z *Escherichia coli* [6] rozpozná tuto sekvenci nukleotidů a rozštěpí vazbu mezi G a A tak, že vzniknou fragmenty s částečně jednořetězcovými konci AATT, resp. TTAA (obr. 1). Vzniklé fragmenty DNA obsahující tyto tzv. kohesivní konce je možno navzájem na základě jejich komplementarity spojovat tak, že se opět tvoří páry bází A—T, G—C. Tímto způsobem se spojují nejen fragmenty původní, ale i fragmenty izolované z různých molekul DNA, které byly rozštěpeny stejným restričním enzymem. Může tak dojít i ke spojování fragmentů DNA z plasmidů či virů s DNA jak prokaryontních, tak eukaryontních organismů. Tím vznikají takové molekuly DNA, které se v přírodě nikdy dříve neobjevily. Dokončení tvorby nové, rekombinované DNA je uskutečněno působením enzymu DNA ligázy, který vytváří kovalentní vazby mezi sousedními nukleotidy v rámci jednoho řetězce (G a A) [7, 8].



Obr. 1. Štěpení molekul DNA restriční endonukleázou Eco RI, spojení komplementárních jednořetězcových konců a následné vytvoření kovalentních vazeb v rámci každého řetězce.

Sestavením molekul DNA však práce nekončí, neboť tuto novou informaci je nutno přenést do buňky a současně dosáhnout toho, aby se tato informace mohla vyjádřit. K tomu slouží vektory — molekuly DNA obsahující 1 cílovou sekvenci pro restriční enzym, umožňující linearizaci molekuly a současně jsou tyto molekuly DNA nositeli rezistence k jednomu nebo i více antibiotikům. Spojením DNA vektorů, kterými bývají nejčastěji plasmidy (malé cirkulární molekuly DNA) nebo viry, s DNA, kterou chceme přenášet, vznikají hybridní DNA, schopné existence v buňce hostitele. Tyto vektory s cizorodou DNA mohou v buňce být přítomny v jedné nebo i v několika desítkách či stovkách kopií. Celý tento proces se označuje jako klonování určité informace v buňce hostitele prostřednictvím vektorů [9].

Přenesení DNA vektoru do hostitele může probíhat normální cestou, kterou se uskutečňuje infekce původní virovou či plasmidovou DNA, nebo se může využívat i dalších způsobů, které vycházejí u většiny organismů z přenesení vektorové DNA do protoplastů, tj. do buněk s odstraněnou buněčnou stěnou. Tohoto způsobu se nejčastěji využívá u aktinomycet, ale je metodicky možný i u aukaryont. Proto se stala příprava a veškeré manipulace s protoplasty jednou ze základních technik pro další využití genetického inženýrství [10].

Zájem o využití technik genetického inženýrství pro žádané úpravy producentů antibiotik stále roste. Je tomu tak mimo jiné proto, že antibiotika v současnosti představují jeden z ekonomicky nejvýnosnějších farmaceutických výrobků produkovaných mikroorganismy, u nichž lze brzy očekávat úpravy genetického materiálu pomocí genetického inženýrství [3].

Už v současnosti je užívána technika fúze protoplastů v průmyslové genetice vláknitých hub [11]. Vypracování metodiky přípravy a regenerace protoplastů u streptomycet [12] umožňuje její aplikaci při vývoji streptomycetových kmenů s lepšími produkčními schopnostmi pomocí fúze protoplastů. Strategie zavedení protoplastové fúze do šlechtitelských programů producentů antibiotik vychází ze snahy převést vlastnosti, které usnadňují fermentaci a vylepšují ekonomiku výroby, z mikroorganismů s nižší schopností tvorby antibiotika do průmyslového kmene. Jako příklady takových vlastností mohou být uvedeny růst a produkce na levnějších surovinách, rychlejší růst, lepší schopnost sporulace, rezistence k materiálům fermentační aparatury a látkám, které znečišťují surovinu, rezistence ke katabolické represí a řada dalších schopností, které produkující mikroorganismus postrádá. Druhým aspektem užití uvedené strategie je předpoklad, že sloučení kmenů z dvou i více vývojových linií rodokmenu povede ke zvýšení produkce, protože je nepravděpodobné, že polygenně založená tvorba antibiotika je u různých linií změněna mutagenními zásahy na týchž místech DNA.

Zatím nebyly vyvinuty vektory pro přenos DNA u filamentních hub ve spojení s antibiotickou produkcí. Zkušenosti s transformací kvasínek plasmidy [13, 14] stejně jako existence četných mykovirů [15] ukazují na schůdnost budoucího užití genových manipulací i u takových producentů jako je *Penicillium chrysogenum* nebo *Cephalosporium acremonium*.

Streptomycety představují v současnosti intenzivně studované objekty technikami genového inženýrství. Na této skutečnosti se podílí vedle objevu přípravy a regenerace protoplastů též zjištění, že v přítomnosti polyetylglykolu je umožněna transformace vektorové DNA do protoplastů hostitelů [16]. Nalezení řady plasmidů a fágů u streptomycet usnadňuje vyjádření genetické informace při překonání řady limitací v regulaci. Vývoj a užití streptomycetových plasmidů a fágů jako vektorů poskytuje navíc užitečnou informaci o mnoha aspektech jejich biologie a významu.

Zvláště přítomnost plasmidů má u mnoha streptomycet nesporný vliv na tvorbu antibiotik. Přítomnost strukturálních genů metylenomycinu A byla u druhu *S. coelicolor* A 3 [2] prokázána na plasmidu SCP 1. Přenesení tohoto plasmidu do *S. lividans* nebo *S. parvulus* vede k tvorbě antibiotika. U většiny antibiotik se však předpokládá spíše vliv plasmidů na regulaci tvorby a na schopnost rezistence vůči vlastnímu produktu. Účast extrachromozomální DNA na produkci byla popsána například u *S. bikiniensis* a *S. griseus* při tvorbě streptomycinu [17, 18], u *S. fradiae* při produkci tylosinu [19], u *S. venezuelae* při produkci chloramfenikolu [20, 21] a tvorbě vzdušného mycelia a melaninu [22]. Přítomnost plasmidu byla zjištěna u producenta chlortetracyklinu *S. aureofaciens* [23] i oxytetracyklinu *S. rimosus* [24], u něhož byl pozorován infekční přenos rezistence k vlastnímu produktu spojený s transportem plasmidů.

V souvislosti se studiem účasti plasmidů na biosyntéze neomycinu u *S. fradiae* i plasmidovým zapojením při determinaci rezistence k tomuto antibiotiku u různých batkérií byla vyslovena úvaha o možnosti přenosu genetické informace mechanismu rezistence z producentů antibiotik do jiných mikrobiálních druhů [25]. Mutace na plasmidu *S. fradiae* vedou ke změnám rezistence vůči antibiotiku i ke změnám produkční schopnosti [26]. Mutace byly umístěny na malém úseku restričně endonukleázové mapy plasmidu a vedly též ke zvýšení počtu plasmidových kopií na chromozom, což způsobilo několikanásobné zvýšení produkce.

Ačkoliv klonování antibiotické produkce do dobře prozkoumaných mikroorganismů jakým je např. *Escherichia coli* má nesmírnou analytickou hodnotu, dá se předpokládat, že techniky genového inženýrství aplikovatelné v průmyslu budou probíhat při užití vektorového systému z antibiotika produkujících mikroorganismů. Streptomycetová DNA je charakteristická vysokým obsahem guanosinu a cytosinu. Proto restriční endonukleázy rozpoznávající sekvence s nízkým obsahem guanosinu a cytosinu (např. Eco RI, Hind III, Kpn I) ji štěpí do relativně malého počtu velkých fragmentů, zatímco endonukleázy pro sekvence s vysokým obsahem guanosinu a cytosinu (např. Bam HI, Pst I, Sal G I) štěpí do mnoha malých částí. Z porovnání rozdělení plasmidové a chromozomální DNA streptomycet v gradientech chloridu cézného vyplývá, že plasmidová DNA se co do obsahu nukleotidů podstatně neliší od chromozomální [27]. Streptomycetové fágy mají podstatně nižší obsah guanosinu a cytosinu a některá cílová místa restričních endonukleáz jsou na nich mnohem vzácnější.

Frekvence transformace plasmidovou DNA v přítomnosti polyetylglykolu se pohybují mezi 10–80 % regenerovaných protoplastů [16, 28], zatímco dosažené frekvence transfekce maximálně okolo 1 % regenerovaných protoplastů [29]. Frekvence přenosu DNA do protoplastů mohou být podstatně vylepšeny použitím umělých liposomů [30].

Některé plasmidy jsou po přenesení do hostitelů schopny vyvolávat jev, který bývá označován jako letální zygosy [27]. Jestliže jsou streptomycety obsahující uvedený plasmid vysety ve vhodném ředění na kulturu, která nenese plasmid, vznikají kolem kolonií obsahujících plasmid nevelké zóny, v kterých je snížen růst a sporulace bezplasmidové kultury. Tento jev je velmi užitečný při zjišťování transformovaných buněk, a proto plasmidy se schopností letální zygosy jsou velmi dobrým materiálem pro konstrukci vektorů pro manipulace genového inženýrství.

SCP 2* je plasmid poprvé izolovaný ze *S. coelicolor* [27], přítomný v jedné kopii na chromozom. Způsobuje letální zygosy. Vyskytuje se na něm několik cílových sekvencí pro restriční endonukleázy, do nichž je možno

vkładat úseky DNA bez poškození funkcí nutných pro zachování plasmidu [31]. SCP 2* může být přenesen konjugací do *S. lividans* a *S. parvulus*.

Série plasmidů SLP 1.1 až SLP 1.9 se vyskytuje u *S. lividans*. Původ plasmidů, které mají určité oblasti DNA stejné, je v chromozomu *S. coelicolor* [32]. Vyskytují se ve 4–5 kopiích na chromozom [33]. Za velmi atraktivní vektor je považován SLP 1.2, který kromě toho, že způsobuje letální zygosu, obsahuje jediné místo pro Bam HI a dvě pro Pst I v neesenciálních oblastech. Jako příklad tvorby značených plasmidů je možno uvést přenos DNA pro metylenomycinovou rezistenci z plasmidů SCP 1 do SCP 2* a SLP 1.2 [33].

Byly konstruovány rekombinované molekuly DNA z plasmidů streptomycet a z vektorů z *E. coli* pACYC 184 a pACYC 177, což vedlo k vyjádření jak znaků streptomycetových plasmidů, tak znaků z *E. coli* [33]. Při přenosu fragmentů DNA ze streptomycet do *E. coli* se však většinou vložené informace nevyjadří [34].

Streptomycetové fágy jsou z mnoha důvodů vhodnými vektory. Jejich hlavní výhodou je široké spektrum hostitelů. Nejlépe prostudovaným fágem pro účely genových manipulací je ϕ C 31 fág. Jeho DNA podle výsledků elektron-mikroskopických studií 37,7 kb dlouhá [35], je lineární a obsahuje delecí 1,63 kb oproti divokému fágu. Transfekce je zjišťována plaky na půdě pro regeneraci protoplastů [36, 37]. Stejně jako u streptomycetových plasmidů bylo i u fágů úspěšně využito tvorby rekombinovaných molekul DNA s plasmidy *E. coli* [38]. Tyto molekuly je možno namnožit v *E. coli*, kde se chovají jako plasmidy, a po vyjmutí použít k transfekci streptomycet, kde se projevují jako fágy. Rozpoznávací místa restričních endonukleáz umístěná v oblastech nedůležitých pro zachování molekuly dovolují vložení potřebné genetické informace. Navíc je možné před transfekcí zvětšit množství vkládané DNA po vyštěpení plasmidu z fága.

Závěr

Metody genetického inženýrství tak, jak jsou rozpracovány v současnosti pro některé významné metabolity a bakteriální buňky, se ve velice krátké době významnou měrou uplatní i u mikroorganismů produkujících antibiotika. V současnosti byla připravena řada vektorů, které mohou přenášet geny pro produkci antibiotik a dokonce některé z těchto genů se podařilo klonovat v hostitelském organismu. K plnému uplatnění těchto metod dojde nejprve u prokaryontních producentů jako jsou např. streptomycety, zatímco u eukaryontních producentů antibiotik (např. u hub) je další pokrok podmíněn hlubším poznáním vlastní struktury genetického materiálu a problematiky regulace exprese všech genů.

Skupina pracovníků v genetických laboratořích VÚAB rozpracovala zásadní metodiky přípravy regenerace a fúzí protoplastů jak u streptomycet, tak u nižších i vyšších hub. Tyto metodické základy by měly vyústit v studium genetického inženýrství v souvislosti s produkcí všech významných antibiotik.

Literatura

- [1] CAPE R. E., AMON W. F., NEIDLEMAN S. I.: Biotechnol. Lett. 2, 1980, s. 199.
- [2] CAPE R. E.: Dev. Ind. Microbiol. 21, 1980, s. 29.
- [3] Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 1981, s. 677.
- [4] SMITH H. O., WILCOX K. W.: J. Mol. Biol. 51, 1970, s. 379.
- [5] KELLY T. J., SMITH H. O.: J. Mol. Biol. 51, 1970, s. 393.
- [6] HEDGPETH J., GOODMAN H. H., BOYER H. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1972, s. 3448.
- [7] SETLOW J. K., HOLLAENDER A. (eds.): Genetic engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1980.
- [8] BOYER H. W., NICOSIA S. (eds.): Genetic Engineering, Elsevier, 1978.

- [9] CHAKZABARTY A. M. (eds.): Genetic engineering, CRC Press, 1978.
- [10] HOPWOOD D. A.: Annu. Rev. Microbiol. 35, 1981, 237.
- [11] HAMLYN, P. F., BALL C.: Genetics of Industrial Microorganisms pp. 185, Sebek a Laskin, eds., 1979.
- [12] OKANISHI, M., SUZUKI, K., UMEZAWA, H.: J. Gen. Microbiol. 80, 1974, s. 389.
- [13] HINNEN, A., HICKS, J. B., ILGEN, G., FINK, C. R.: Genetics of Industrial Microorganisms [O. K. Sebek, A. I. Laskin, Eds.] Washington D. C., ASM, 1979, s. 36.
- [14] BEGGS, J. D.: Nature 275, 1978, s. 104.
- [15] ZELENÝ, K.: Biol. listy 41, 1978, s. 282.
- [16] BIBB, M. J., WARD, J. M., HOPWOOD, D. A.: Nature 274, 1978, s. 400.
- [17] SHAW, P. D., PIVOWARSKI, J.: J. Antibiot. 30, 1977, s. 404.
- [18] KIRBY, R., LEWIS, E.: J. Gen. Microbiol. 122, 1981, s. 351.
- [19] BALTZ, R. H., SENO, E. T., STONESIFFER, J., MATSUSHODIMA P., WILD, G. M.: Microbiology 1981 [D. Schlessinger, Ed.], Washington D. C., ASM, 1981, s. 363.
- [20] OKANISHI, M., UMEZAWA, H.: Genetics of the Actinomycetales [E. Freeksen, I. Tarnok, J. H. Thumin, Eds.], Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1978, s. 19.
- [21] AKAGAWA, H., OKANISHI, M., UMEZAWA, H.: J. Antibiot. 32, 1979, s. 610.
- [22] OKANISHI, M., OHTA, T., UMEZAWA, H.: J. Antibiot. 23, 1970, s. 45.
- [23] GODÁNY, A., ZELINKOVÁ, E., ZELINKA, J., ŠTOKROVÁ, J.: Biológia 36, 1981, s. 1179.
- [24] BOLONIN, A. M., MINDLIN, S. Z.: Genetika 7, 1971, s. 125.
- [25] DOWNING, J. DAVIES, J.: Microbiology 1974 [D. Schlessinger, Ed.], Washington D. C., ASM, 1975.
- [26] KOMATSU, K., LEBOL, J., HARFORD, S., DAVIES, J.: Microbiology 1981 [D. Schlessinger, Eds.], Washington D. C., ASM, 1981, s. 384.
- [27] BIBB, M. J., FREEMAN, R. F., HOPWOOD D. A.: Molec. Gen. Genet. 154, 1977, s. 155.
- [28] BIBB, M. J., WARD, J. M., HOPWOOD, D. A.: Dev. Ind. Microbiol. 21, 1980, s. 55.
- [29] SUAREZ, J. E., CHATER, K. F.: J. Bact. 142, 1980, s. 8.
- [30] MAKINS, J. F., HOLT, G.: Nature 293, 1981, s. 871.
- [31] BIBB, M. J., SCHOTTEL, J. L., CHEN, S. N.: Nature 284, 1980, s. 526.
- [32] BIBB, M. J., WARD, J. M., HOPWOOD, D. A.: Dev. Ind. Microbiol. 21, 1980, s. 55.
- [33] BIBB, M. J.: Microbiology 1981 [D. Schlessinger, ed.] Washington D. C., ASM 1981, s. 363.
- [34] SAKAGUCHI K., OKANISHI M. (Eds.), Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms, Academic Press, 1980.
- [35] LOMOVSKAJA N. D., VOEYKOVA R. A., SLADKOVA I. A., CHIRONOVA T. A., MKRTUMIAN, N. M., SLAVINSKAYA, E. V.: In: Genetics of Industrial Microorganisms. [O. K. Sebek, A. I. Laskin, eds.], ASM, 1979, s. 141.
- [36] CHATER, K. F.: In Genetics of Industrial Microorganisms. [O. K. Sebek, A. I. Laskin eds.], ASM, 1979, s. 123.
- [37] SUAREZ, J. E., CHATER, K. F.: J. Bact. 142, 1980, s. 8.
- [38] SUAREZ, J. E., CHATER, K. F.: Nature 286, 1980, 527.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Genetické inženýrství a výroba antibiotik. Kvas. prům. 28, 1982, č. 8, s. 186–189.

Metody genetického inženýrství, které jsou v současné době rozpracovány pro několik metabolitů a jejich expresi v bakteriálních buňkách, budou hrát v nejbližší době významnou roli i u organismů produkujících antibiotika. Je diskutována řada možností využití těchto technik pro klonování genetické informace v mikroorganismech produkujících antibiotika.

Вискочил, П., Зелены, К.: Генная инженерия и производство антибиотиков. Квас. прум. 28, 1982, Но. 8, стр. 186–189.

Методы генной инженерии, которые в настоящее время разработаны для нескольких метаболитов и их экспрессию в бактериальных клетках будут в будущем играть важную роль также в случае организмов образующих антибиотики. Дискутированы возможности использования этих методов для клонирования генетической информации в микроорганизмах образующих антибиотики.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Genetic Engineering and Antibiotic Production. Kvas. prům. 28, 1982, č. 8, pp. 186–189

Genetic engineering methods which are at present time worked out for some metabolites and expression of

their genes in bacterial cells (host) will play serious role in the antibiotics producing microorganisms in the nearest future too. Some of the possibilities for using these methods for cloning of genes in microorganisms producing antibiotics are discussed.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Genetikingeniérwesen und Production von Antibiotika. Kvas. prům. 28, 1982, č. 8, s. 186—189.

Die Methoden des Genetikingeniérwesens, die zu dieser Zeit für etliche Metaboliten und ihre Expression in den Bakterienzellen ausgearbeitet sind, werden in der nächsten Zeit auch bei den Organismen, die Antibiotika produzieren, eine bedeutungsvolle Rolle spielen. Eine Reihe von Ausnutzungsmöglichkeiten dieser Techniken für das Klonieren der genetischen Information in der Mikroorganismen, die Antibiotika produzieren, wird diskutiert.