ОГЛЯД МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ТА ІНЖЕНЕРНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ ВИРОБНИЦТВА СИРОЛІМУСУ

Чаленко М. А., Максімова А.Ю.
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Вступ. Сіролімус, також відомий як рапаміцин, є макроциклічним лактонним антибіотиком (рис.1), що продукується бактеріями Streptomyces hygroscopicus, які були виділені з ґрунту регіону Вай-Атарі на Рапа-Нуї (острів Пасхи) [1]. В огляді було оцінено останні дослідження щодо використання молекулярно-біологічних методів для покращення виходу сиролімусу та зменшення вартості продукту. Рапаміцин — біла кристалічна тверда речовина з температурою плавлення від 183° до 185°C. За структурою це ліпофільний макроциклічний лактон, розчинний у більшості органічних розчинників і практично нерозчинний у воді. Структурно-хімічна формула: C51H79NO13. Молекулярна маса: 914,18 г/моль [2].

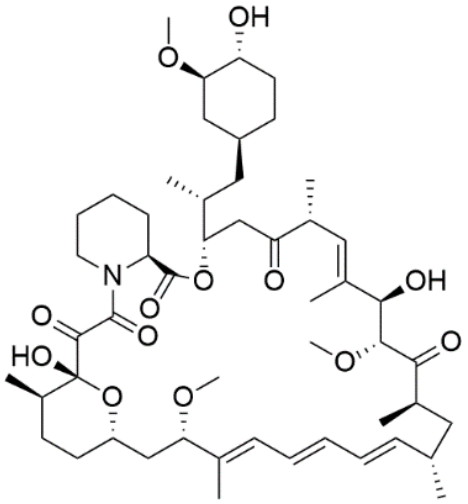

Рис.1 - Структурна формула Рапаміцину

Сиролімус відноситься до класу імуносупресивних препаратів і використовується для запобігання відторгнення трансплантованих органів та лікування деяких видів раку. Продукт діє шляхом зниження активації лімфоцитів, тим самим підтримуючи імунний захист організму від різних захворювань. Також цей препарат може мати протизапальну дію, тому він використовується в лікуванні деяких запальних захворювань.

Матеріали і методи. При підготовці даного огляду були використані наукові публікації, патенти, звіти та інші документи, які стосуються виробництва сиролімусу. Зокрема, додаткові дані отримано з офіційних веб-сайтів виробників та академічних дослідницьких організацій.

Результати та обговорення. Продукт діє як інгібітор мішеневого білка mTOR (молекулярна мішень на рівні рибосоми), відповідального за регуляцію клітинного росту та проліферації. Коли рапаміцин зв'язується з мішеневим білком mTOR, він утворює комплекс, який інгібує фосфорилювання протеїнів,

що регулюють клітинний ріст і поділ, таких як S6K та 4E-BP1. Це призводить до зупинки клітинного циклу та зниження проліферації клітин.

Сиролімус є триєновим макроциклічним полікетидом. У Streptomyces hygroscopicus три великі гени полікетидсинтази відповідають за біосинтез сіролімусу. Ці гени кодують 14 модулів, що містять ферменти (PKS), кожен з яких виконує певну роль у подовженні полікетиду сіролімусу.

Біосинтез рапаміцину здійснюється групою ферментів, відомих як Rapamycin PKS (скорочення від «полікетидсинтази»). Він складається з численних різноманітних ферментів, кожен із яких відіграє певну роль у синтезі рапаміцину. Такі ферменти, як декарбоксилази, редуктази, тіоестерази та інші, є частиною PKS рапаміцину, і кожен з них контролює власну фазу в процесі синтезу рапаміцину. Виробництво рапаміцину та інших полікетидних сполук можна додатково посилити, якщо зрозуміти, як функціонує PKS рапаміцину.

Три гени полікетидсинтази, rapA, rapB і rapC, кодують мультиферментні полікетидсинтази Raps1, Raps2 і Raps3 відповідно. Raps1 відповідає за перші чотири модулі і містить зону завантаження для стартового блоку. Вихідною ланкою є заміщена циклогексанкарбонова кислота, 4,5-дигідроксициклогекс-1-енкарбонова кислота, похідна шикімату. На початку процесу біосинтезу похідна шикімату закріплюється на CoA-лігазі в «домені завантаження» Raps1.

Після завершення модуля 14 фермент, що включає піпеколат (PIE) (виробляється геном RapP, суміжним з Raps3), зв’язується з активованим L-піпеколатом через тіоефірний зв’язок.

Особливо варто звернути увагу на те, що L-піпеколат є циклізацією L-лізину. Cheng та ін. повідомили про 150% збільшення вироблення сиролімусу S. Hygroscopicus після додавання L-лізину в хімічно визначене середовище [3].

Відомо, що продуктивність рапаміцину у дикого типу S. hygroscopicus низька. Тому були розроблені методи оптимізації середовища ферментації, методи класичного вдосконалення штаму, методи пов'язані з протопластами та методи скринінгу високої продуктивності. Група Демейна отримала вищу кількість рапаміцину від мутантів FC904 S. hygroscopicus, оброблених гентаміцином, що показало 60% підвищення виробництва рапаміцину порівняно з диким штамом [6].

Також було застосувано техніку протопластів, мутації, внутрішньо- та міжвидового злиття, яка не принесла значного прогресу. Однак, комбінація міжвидового злиття протопластів та одного етапу геномного змішування дозволила створити високопродуктивний штам, який виробляв 445 мг/л рапаміцину. Після досліджень, пов'язаних з протопластами та їх злиттям, було помічено, що майже всі високопродуктивні штами, які виробляли рапаміцин, мали схожий фенотип: округлі колонії з морщинистими краями та багато жовтих повітряних міцелію.

Додатково, досягнення покращення виробництва рапаміцину можна досягти за допомогою надекспресії генів, що кодують позитивні регуляторні білки, такі як rapH та rapG, або гетерологічної експресії гену aveR. Такі методи призводять до збільшення виробництва рапаміцину відповідно на 27-55% і 20-32% або в 2 рази [1].

Один з можливих методів генетичної інженерії для покращення виробництва сиролімусу - це інженерія геномів Streptomyces роду за допомогою систем CRISPR-Cas. Застосування CRISPR-Cas в генетичній інженерії дозволяє точно вибирати гени для модифікації і вносити необхідні зміни в геном організмів. У Streptomyces роду ця технологія може бути використана для покращення виробництва сиролімусу. Зокрема, можна вибрати гени, які кодують ферменти, необхідні для біосинтезу сиролімусу, і внести зміни, щоб збільшити їх ефективність. Крім того, можна використати CRISPR-Cas для видалення або внесення змін в гени, що впливають на виробництво сиролімусу або його якість.

Також одним з методів вдосконалення є покращення штаму бактерій, що виробляє рапаміцин, за допомогою мутагенезу в поєднанні з оптимізацією складу середовища та умов культивування. Застосування методів мутагенезу, таких як УФ-опромінення та обробка нітрозогуанідіном, дало змогу отримати штам-мутант, який виробляв 210 мг/л рапаміцину, що було в 5 разів більше, ніж у батьківського штаму. Далі вдалося домогтися додаткового покращення виробництва рапаміцину в 1,7 рази (360 мг/л) за допомогою оптимізації складу середовища, pH, температури та швидкості перемішування [3].

Щодо використання інженерних методів для оптимізації процесів культивування, дослідження останніх років були зосереджені на контролі pH та температури, використання фільтрації та мембранної технології для очищення та концентрування сиролімусу та оптимізації ПС. Дослідження показали, що оптимальний pH для виробництва рапаміцину складає 6,5-7,0, а оптимальна температура - 28-30 °C. Крім того, швидкість перемішування також має вплив на виробництво рапаміцину, і було встановлено, що оптимальна швидкість перемішування становить 300 об/хв [4].

Під час дослідження впливу різних джерел вуглецю на виробництво рапаміцину у S. rapamycinicus, було випробувано 35 джерел вуглецю, і зокрема, целобіоза, фруктоза, галактоза, інозитол, маноза, манітол і ксилоза призвели до збільшення виробництва рапаміцину. З позитивних джерел вуглецю 2 г/л фруктози було визнано найкращим для виробництва рапаміцину. При випробуванні вторинних джерел вуглецю, використовуючи фруктозу в концентрації 2 і 5 г/л, маноза давала найкращий вихід [3].

Аналогічно, було досліджено вплив амінокислот як джерел азоту на зростання S. hygroscopicus C9 та виробництво рапаміцину. Було випробувано 20 різних амінокислот у концентраціях 0,5–4 г/л на виробництво рапаміцину в якості попереднього дослідження [5].

У результаті ферментацію було доповнено аспартовою кислотою, аргініном та гістидином, і ця комбінація виявилася ефективною для розробки хімічно визначеного середовища для виробництва рапаміцину. З використанням хімічно визначеного середовища і живлення лізином, прекурсором піпеколінової кислоти, біосинтез рапаміцину збільшився в 1,5 рази [4]. Однак фенілаланін та метіонін у концентрації 0,5 г / л зменшили виробництво рапаміцину приблизно на 0,6 разів.

Висновки. Для покращення виробництва рапаміцину було розроблено кілька методів. Оптимізація середовища ферментації, методи класичного вдосконалення штаму, методи пов'язані з протопластами та методи скринінгу високої продуктивності використовуються для збільшення виробництва рапаміцину. Мутагенез у поєднанні з оптимізацією складу середовища та умов культивування також використовується для покращення штаму, що виробляє рапаміцин. Додатково, надекспресія генів, що кодують позитивні регуляторні білки, або гетерологічна експресія гену aveR також можуть призвести до збільшення виробництва рапаміцину. Також було випробувано 20 різних амінокислот у концентрації 0,5 г/л, і виявлено, що додавання L-лізину призвело до найбільшого зростання виробництва рапаміцину. Дослідження також показали, що оптимальна концентрація L-лізину для виробництва рапаміцину складає 2 г/л.

З огляду на надану інформацію, можна зробити висновок, що краще застосовувати комплексний підхід, використовуючи кілька методів одночасно, щоб досягти найбільш ефективного підвищення виробництва сиролімусу. Наприклад, поєднання міжвидового злиття протопластів та генетичної інженерії з використанням CRISPR-Cas може дати значні позитивні результати.

Список використаної літератури:

1. Huang, M., Li, M., Feng, Z., Liu, Y., Chu, Y., & Tian, Y. (2011). Enhanced rapamycin production in Streptomyces hygroscopicus by integrative expression of aveR, a LAL family transcriptional regulator. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, 2103-2109.

2. Chen X, Wei P, Fan L, Yang D, Zhu X, Shen W, et al. 2009. Generation of high-yield rapamycin-producing strains through protoplasts-related techniques. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 507-512

3. Kojima, I., Cheng, Y. R., Mohan, V., & Demain, A. L. (1995). Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in Streptomyces hygroscopicus. Journal of industrial microbiology, 14, 436-439.

4. Sinha, R., Singh, S., & Srivastava, P. (2014). Studies on process optimization methods for rapamycin production using Streptomyces hygroscopicus ATCC 29253. Bioprocess and biosystems engineering, 37, 829-840.

5. Lee, M. S., Kojima, I., & Demain, A. L. (1997). Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by Streptomyces hygroscopicus. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19(2), 83-86.

6. Demain, A. L. Pickles, pectin, and penicillin. Annu. Rev. Microbiol. 58, 1–42 (2004).