

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ЮЩУК ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ



УДК 575+577.21+579.2+579.6

**ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ
ПЕПТИДНИХ ТА ПОЛІКЕТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2023

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей.

Робота виконана в Львівському національному університеті імені Івана Франка МОН України.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України

Волков Роман Анатолійович,
Чернівецький національний університет ім. Юрія Федьковича,
завідувач кафедри молекулярної генетики та біотехнології;

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Іутинська Галина Олександрівна,
Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН
України, головний науковий співробітник;

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН України

Чеботар Сабіна Віталіївна,
Одеський національний університет ім. І.І.Мечнікова,
завідувачка кафедри генетики та молекулярної біології.

Захист відбудеться 20 вересня 2023 року о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а, м. Київ, 04123. Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а, м. Київ, 04123 та на офіційному сайті <http://ifbg.org.ua/uk/pidgotovka-kadriv/specializovana-vchena-rada>

Автореферат розіслано «____» серпня 2023 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради



Наталія ПАСТУХОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Антибіотики – це природні або синтетичні молекули, здатні пригнічувати або припиняти ріст і розмноження різноманітних мікроорганізмів. Антибіотики повністю змінили хід історії, давши змогу ефективно боротися із смертельними бактеріальними інфекціями. Хоча перші синтетичні антибіотики були введені в клінічне застосування Паулем Ерліхом наприкінці 19 століття, природні протимікробні сполуки з'явилися пізніше: бензилпеніцилін і граміцидин С (продукуються грибом *Penicillium chrysogenum* і Грам-позитивною бактерією *Bacillus brevis*) знайшли застосування в медицині в 1942 році. Однак, справжній потенціал природних антибіотиків розкрився з відкриттям стрептоміцину (потрапив до клінічного використання в 1944 році) Селманом Ваксманом. Його роботи вперше показали, що актиноміцети – міцеліальні Грам-позитивні бактерії, що живуть у ґрунті – є фактично необмеженим джерелом природних антибіотиків. Відтоді 24 класи природних антибактеріальних препаратів використовуються в клініці, а актиноміцети продукують представників 14 таких класів.

Цікаво, що більшість із цих антибіотиків є макромолекулярними структурами, біосинтетичні шляхи яких потребують десятків ферментів. Відповідно, ці ферменти кодовані генами, які колокалізуються на хромосомі, забезпечуючи синхронну експресію всіх необхідних компонентів біосинтезу. Такі асамблеї генів отримали назву кластерів біосинтетичних генів (КБГ). До складу КБГ, окрім біосинтетичних генів, також входять гени стійкості, експорту, біосинтезу попередників, та, щонайважливіше, регуляторні гени. Потенціал актиноміцетів до продукції антибіотиків відображається в організації їх геномів: великі хромосоми (наприклад до 13 млн.п.н. у *Nonomuraea* sp. ATCC 55076) містять десятки КБГ для продукції антибіотиків. Зазвичай лише небагато таких КБГ активні за лабораторних умов; інші залишаються мовчазними з різних причин, наприклад внаслідок низької або відсутньої експресії генів. Мовчазні біосинтетичні шляхи часто кодують біосинтез раніше невідомих – криптичних – антибіотиків.

Активне використання актиноміцетів (здебільшого *Streptomyces* spp.) розпочало «золоте століття» відкриття і використання антибіотиків. Певні класи сполук почали також використовувалися у ветеринарії та як стимулятори росту сільськогосподарських тварин. Природне середовище забруднювалося антибіотиками, що надходили з лікарняних, комунальних і промислових стічних вод. Таке широке, часто необґрунтоване використання антибіотиків мало серйозні наслідки. Як фактор природного добору, антибіотики сприяли змінам геномів факультативних і облігатних патогенів, а також еволюції

метамобілому навколишнього середовища, що призвело до накопичення та поширення генів стійкості. Стійкість до протимікробних препаратів зробила багато успішних класів антибіотиків неефективними. Передбачається, що множинно-резистентні штами *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacter* spp. призведуть до 10 мільйонів смертей на рік до 2050 року. Глобальна пандемія COVID-19, спричинена вірусом SARS-CoV-2, стимулює нераціональне використання антибіотиків. Усе згадане вище робить пошук нових антибіотиків і вивчення біосинтезу вже відомих сполук важливим завданням сучасної біомедичної науки.

В цій роботі основний фокус зроблено на вивченні нерибосомних пептидних та полікетидних антибіотиків, які синтезуються представниками різних родів актиноміцетів. Головну увагу приділено глікопептидним антибіотикам (ГПА). Ці сполуки є ліками вибору проти інфекцій, спричинених множинно-резистентними штамми золотистого стафілококу і *Enterococcus* spp. ГПА, що перебувають в клінічному використанні, включають як природні сполуки, такі як ванкоміцин і тейкопланін, так і напівсинтетичні антибіотики далбаванцин, орітаванцин і телаванцин. Ці антибіотики входять до списку критично важливих для медицини препаратів Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я. ГПА інгібують ріст клітинної стінки Грам-позитивних бактерій зв'язуючи ліпід II. Окрім клінічної значущості, ГПА цікаві завдяки складним біосинтетичним шляхам: нерибосомні пептидні ядра цих сполук модифікуються шляхом приєднання залишків цукрів, сульфатуються, хлоруються, тощо. Нажаль, стійкі до ГПА стафілококи і ентерококи чимраз частіше трапляються в довкіллі. Тому гостро стоїть проблема пошуку нових ГПА та покращення продукції вже відомих.

Проблеми, згадані вище, вимагають зусиль, спрямованих у три основні напрямки, що і стали основними напрямками цієї роботи. По-перше, ми вивчали генетичні знаряддя, які можна застосувати для маніпуляцій із відомими та потенційними продуцентами антибіотиків, з метою модифікації рівнів продукції цих сполук. Регуляція біосинтезу антибіотиків здійснюється на шлях-специфічному і глобальному рівнях. Шлях-специфічні регулятори кодовані в межах відповідних КБГ, а їх регулон обмежується генами цього кластера. Такі регулятори, здебільшого, є позитивними, а надекспресія їх генів веде до підвищення рівня продукції антибіотиків. Натомість, регулони глобальних регуляторів включають десятки генів, зокрема і шлях-специфічних регуляторів; це дає глобальним регуляторам здатність одночасно контролювати шляхи біосинтезу різних антибіотиків. Мабуть, найцікавішим

прикладом глобального позитивного регулятора біосинтезу антибіотиків у актиноміцетів є AdpA, що є перспективним знаряддям для покращення продукції антибіотиків. Варто відмітити, що використання згаданих вище регуляторних генів із метою покращення рівнів продукції тих чи інших антибіотиків потребує ефективних платформ експресії цих генів, а також методів перенесення рекомбінантних молекул ДНК у штами продуценти. Зокрема, продуценти ГПА є часто дуже складними об'єктами для генно-інженерних маніпуляцій, тому ряд підходів спочатку необхідно напрацювати на більш доступних моделях.

По-друге, потрібно розвивати підходи для активації мовчазного вторинного метаболізму актиноміцетів. Для цього ми використовували глобальний позитивний регулятор AdpA.

По-третє, потрібно здійснювати постійний геномний скринінг потенційних КБГ з метою пошуку нових та цікавих кандидатів для експериментальної роботи. Такі бази даних як MIBIG, а також алгоритми автоматизованого пошуку і анотації КБГ на кшталт antiSMASH є ефективними знаряддями для ідентифікації нових КБГ.

Розуміння генетики регуляції та біосинтезу антибіотиків було б неповним без вивчення генів стійкості до цих сполук, пошуку первинних резервуарів генів стійкості та шляхів їх поширення.

Наша робота дає відповіді на ряд питань для кожного із напрямків, перелічених вище. У підсумку, ця робота демонструє нові механізми регуляції та активації біосинтезу антибіотиків, як у модельних об'єктах (таких як *Streptomyces albus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces cyanogenus*), так і в продуцента клінічно важливого ГПА A40926 *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727. В світлі усього переліченого вище, вибрана тема дослідження є актуальною і відповідає сучасним напрямкам біомедичної науки.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчити генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків. Для досягнення цієї мети поставлено такі завдання:

- 1) вивчити філогеноміку AdpA-подібних глобальних позитивних регуляторів і дослідити властивості інших компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду на моделі *Streptomyces albus* (= *albidoflavus*) J1074;
- 2) розробити набір методів для генно-інженерних маніпуляцій із *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504 – потенційного продуцента салінамід-подібного пептидного антибіотика;

- 3) розробити набір методів для генно-інженерних маніпуляцій та експресії гетерологічних генів в *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 – потенційного продуцента ГПА;
- 4) створити підходи для створення надпродуцентів промислово-важливого ГПА A40926 в *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 55076;
- 5) дослідити потенціал *Nonomuraea coxensis* DSM 45129 до продукції нових ГПА;
- 6) побудувати філогенетичну модель еволюції КБГ ГПА, з акцентом на пошук нових КБГ подібних до комплестатину;
- 7) вивчити *adpA*-опосередкований глобальний генетичний контроль продукції ландоміцину А та способи активації інших вторинних метаболітів у *Streptomyces cyanogenus* S136, як моделі активації мовчазних КБГ;
- 8) вивчити механізми стійкості до ГПА в продуцента тейкопланіну *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121;
- 9) здійснити порівняльний філогеномний аналіз розповсюдження генів стійкості до ГПА серед бактерій, з метою виявлення вихідного резервуару цих генів та вивчення шляхів їх розповсюдження.

Об'єкт дослідження – механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків, гени стійкості до ГПА.

Предмет дослідження – КБГ ГПА і полікетидних антибіотиків, їх шлях-специфічні регуляторні гени; регуляторні гени *adpA*-опосередкованого каскаду стрептоміцетів – *adpA*, *bldA*, *miaA*, *miaB*; гени регуляторів YtrA-підродини актинобактерій; системи для гетерологічної експресії генів; регуляторні гени біосинтезу хлоробіоцину *novG* і *cloG*; гени стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus*; гени стійкості до ГПА бактерій; гени експортерів пептидних антибіотиків.

Методи дослідження. В роботі було застосовано набір загальноприйнятих методів досліджень, зокрема:

- мікробіологічні методи досліджень – культивування мікроорганізмів, вивчення їх морфології методами світлової та сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ), вивчення антибіотичних властивостей штамів методами пригнічення росту тест-культур;
- біотехнологічні методи досліджень – культивування штамів актиноміцетів-продуцентів антибіотиків в умовах, наближених до промислових, в колбах Ерленмеєра або лабораторних ферментерах,

- вивчення динаміки росту культур, накопичення біомаси і антибіотиків;
- генетичні й генно-інженерні методи досліджень – отримання і вивчення рекомбінантних штамів бактерій, генетична трансформація клітин *Escherichia coli*, кон'югаційне перенесення плазмід з донорських штамів *E. coli* до різних актиноміцетів; виділення плазмідної та хромосомної ДНК, виділення сумарної РНК та синтез кДНК, рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, горизонтальний гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), секвенування ДНК, напівкількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією.
 - біохімічні методи досліджень – кількісний та якісний аналіз антибіотиків продукції антибіотиків за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та ВЕРХ із мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС) чи тандемною мас-спектрометрією (МС/МС), екстракція антибіотиків, якісний і кількісний аналіз β -глокуронідазної активності.
 - біоінформатичні методи досліджень – аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, аотація генів, пошук та характеристика КБГ, моделювання біосинтетичних шляхів *in silico*, філогенетичний аналіз амінокислотних та нуклеотидних послідовностей.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше здійснено філогеномний аналіз AdpA-подібних регуляторів та продемонстровано важливість окремих доменів цього білка; вперше вивчено інші компоненти *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду на моделі *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074. Вперше вивчено функції YtrA-подібних регуляторів на моделі *S. coelicolor* A3(2). Розроблено ефективні методи для генно-інженерних маніпуляцій продуцента хлоробіоцину і потенційного продуцента салінамід-подібного пептидного антибіотика *S. roseochromogenes* NRRL 3504. Вперше розроблено набір знарядь для генно-інженерних маніпуляцій із потенційним продуцентом нового ГПА *A. rectilineatus* NRRL B-16090. Розроблено нові підходи до покращення біосинтезу клінічно важливого ГПА A40926 в *N. gerenzanensis* ATCC 55076. Відкрито та описано біосинтетичний шлях нового ГПА – названого A50926 – в *N. coxensis* DSM 45129. Показана роль функціональних алелів *adpA* для продукції ландоміцину А в *S. cyanogenus* S136, а також їх важливість як знарядь активації мовчазного вторинного метаболізму.

Вперше описано КБГ полікетидного антибіотика люцензоміцину. Побудовано повноцінну модель функціонування генів стійкості до тейкопланіну в *A. teichomyceticus* ATCC 31121; вперше охарактеризовано глобальне розповсюдження генів стійкості до ГПА на основі даних порівняльної геноміки.

Практичне значення отриманих результатів. В ході виконання роботи автором створено надпродуцентів хлоробіоцину, які за рівнем продукції цього антибіотика не мають аналогів, описаних в літературі. Створено низку платформ для надекспресії генів в штаммах продуцентах ГПА, таких як *Actinoplanes* spp. і *Nonomuraea* spp. Створено надпродуцентів промислово-важливого антибіотика А40926 на основі *N. gerenzanensis* ATCC 55076, що в рази переважають за продуктивністю інших описаних в літературі надпродуцентів А40926. Вперше створено альтернативний продуцент А40926 на основі *N. coxensis* DSM 45129 методом гетерологічної експресії гена *dbv29*. В ході виконання роботи, автор продемонстрував важливість різних алелів *adpA* для активації мовчазних КБГ, зокрема КБГ люцензоміцину в *S. cyanogenus* S136 – на ці результати автор отримав Патент України на винахід. Автором створено повний опис генів стійкості до ГПА серед усіх бактерій, що є важливим доповненням до нагляду за поширенням множинно-резистентних патогенів.

Особистий внесок здобувача. Роботи здобувача, представлені в цій дисертації, засновані на результатах отриманих ним особисто, або за його безпосередньої участі чи під його керівництвом. Мету і задачі дослідження, а також висновки було сформульовано разом із д.б.н., проф. В.О. Федоренком. Вивчення компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду в *S. albus* здійснювалося разом із к.б.н. О.Т. Кошлюю (ЛНУ ім. І. Франка). Дослідження властивостей генів YtrA-регуляторів *S. coelicolor* було виконано разом із асп. О. Ципік (ЛНУ ім. І. Франка). Виділення та ВЕРХ-МС аналіз люцензоміцину було виконано разом із к.б.н. І.С. Остап (ЛНУ ім. І. Франка) та групою проф. Р. Зюсмута (Технічний Університет Берліна, Німеччина). Секвенування та анотація геномів актиноміцетів була здійснена у співпраці із групою проф. Й. Каліновські (Університет Білефельда, Німеччина). ВЕРХ-МС аналіз нового ГПА А50926 виконано у співпраці із доктором Е. Труманом і доктором Н.-М. Біор (Джон Іннес Центр, Великобританія). Вивчення продукції ГПА здійснювалося спільно з доктором Ф. Беріні, доктором Е. Біндою, доктором А. Андрео-Відалем (керівником дисертації доктора філософії – PhD – якого був автор) (Університет Інзубрії, Італія). Сканувальна електронна мікроскопія актиноміцетів виконана спільно із к.ф.-м.н. Ю.Р. Дацюком (ЛНУ

ім. І. Франка). Планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з д.б.н., проф. В.О. Федоренком, а також д.б.н. Б.О. Осташем (ЛНУ ім. І. Франка), проф. Ф. Марінеллі (Університет Інзубрії, Італія), проф. М. Бібом (Джон Іннес Центр, Великобританія), к.б.н. М. Рабик (ЛНУ ім. І. Франка), аспірантками С. Мельник і К. Жукровською (ЛНУ ім. І. Франка), з якими автор має спільні публікації. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертаційній роботі використано тільки ті ідеї та здобутки, що являються особистим внеском здобувача.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в науково-дослідній лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів біологічно активних речовин (НДІ-42) кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Роботу виконано в межах держбюджетних тем БГ-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно-активних речовин стрептоміцетами» (№ держреєстрації 0116U008070), БГ-46Ф «Нові гени актинобактерій, що контролюють продукцію і стійкість до антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану» (№ держреєстрації 0117U001224), БГ-09Ф «Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь» (№ держреєстрації 0120U102039); теми Державного Фонду фундаментальних досліджень України у рамках співпраці з Японським т-вом сприяння науки (JSPS) Ф80-2018 «Посттранскрипційні модифікації тРНК як регулятори первинного й вторинного метаболізму в актинобактерій»; тем у рамках спільної грантової програми Міністерства освіти і науки України й Федерального Міністерства Німеччини освіти і науки Німеччини (BMBF) М/18-2017 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук», М/26-2018 «Плейотропні транскрипційні регулятори родини AdpA як знаряддя відкриття нових природних біоактивних сполук». Частина досліджень виконано під час наукового стажування на факультеті біотехнології та наук про життя Університету Інзубрії (Італія, 2018-2020, 2022 р.) за індивідуальними комерційними грантами та персональним грантом від Університету Інзубрії. За роботи, представлені в цій дисертації, автор був удостоєний Премії Верховної Ради України молодим ученим за 2021 рік (постанова ВРУ № 2833-IX від 13 грудня 2022 року).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на Міжнародній конференції «Integrative Biology & Medicine», Київ (2017); XII Міжнародній конференції молодих

науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків (2017); Міжнародній конференції «Advances in Microbiology and Biotechnology», Львів (2018); XIV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвяченій 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, Львів (2018); XIII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків (2018); XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвяченій 135 річниці від дня народження Я. Парнаса, Львів (2019); 3rd International Conference on Natural Products Discovery and Development in the Genomic Era, San Diego (2020); XVII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», Львів (2021); Міжнародному онлайн конгресі «VAAM Workshop 2021», Тюбінген (2021); Міжнародному онлайн конгресі «ЕхроВАС Zaragoza 2020», Сарагоса (2021); IV Міжнародній науковій конференції «Microbiology and immunology – the development», Київ (2022); XVIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» присвяченій 195 річниці від дня народження Ю. Планера, Львів (2022); на звітних наукових конференціях ЛНУ імені Івана Франка (2018-2022); звітних наукових конференціях факультету біотехнології та наук про життя Університету Інзубрії (2018-2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 44 наукові роботи, із них 3 роботи у наукових фахових виданнях України, 20 у зарубіжних наукових журналах, проіндексованих в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 19 тез доповідей на вітчизняних та закордонних наукових конференціях. Серед цих робіт: 7 експериментальних статей у журналах, що належать до Q1 SCImago; 6 експериментальних статей у журналах, що належать до Q2 SCImago; 3 експериментальні статті у журналах, що належать до Q3 SCImago; 4 літературні огляди у журналах, що належать до Q1 SCImago; 3 експериментальні статті у фахових виданнях України; один розділ монографії видавництва Springer і один патент України на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена на 460 друкованих сторінках. Дисертація складається з наступних структурних елементів: вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень (викладено в 5 розділах), висновків, переліку використаних джерел та додатку. Розділами дисертації є публікації здобувача наукового ступеня в виданнях високого рівня. Список використаної літератури включає 1549 позицій, з яких 1342 є в публікаціях здобувача. Робота містить 127 рисунків і 29 таблиць (в публікаціях здобувача).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **першому розділі** викладено **огляд літератури** за темою дисертації. В цьому розділі розглянуто усі відомі на сьогодні аспекти біосинтезу важливого класу пептидних антибіотиків, а саме глікопептидів (ГПА). Проведено огляд особливостей організації і структури генів нерибосомних пептид синтаз (НРПС), і віділому кластерів генів біосинтезу (КБГ) ГПА. Виконано порівняльний аналіз генів, продукти яких задіяні в основних етапах біосинтезу ГПА, а саме в 1) синтезі амінокислот-попередників, 2) галогенуванні й формуванні поперечних зшивок аглікону ГПА, 3) глікозилюванні ГПА. Розглянуто шлях-специфічні і глобальні генетичні регуляторні механізми, задіяні в контролі біосинтезу ГПА. Охарактеризовано генетику механізмів стійкості до ГПА у актиноміцетів-продуцентів та інших бактерій. Генетика біосинтезу полікетидних антибіотиків розглянута на прикладі біосинтезу ангуциклінового антибіотика ландоміцину А.

У **другому розділі** дисертаційної роботи наведено **матеріали і методи досліджень**. Зокрема, перелічено штами бактерій і основні плазміди, які використовувалися в роботі. Наведено перелік і деталі основних методів досліджень.

Серед мікробіологічних методів досліджень описано умови і особливості культивування різних штамів бактерій; виконання тестів на пригнічення росту тест-культур, що належать до Грам-позитивних бактерій (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 19637, *Micrococcus luteus* ATCC 4698), Грам-негативних бактерій (*Escherichia coli* DH5α), а також дріжджових грибів (*Debaryomyces hansenii* VKM Y-9, *Saccharomycetales*); мікроскопії. Охарактеризовано методологію культивування актинобактерій з метою продукції пептидних (A40926, A50926) і полікетидних антибіотиків (ландоміцину А, люцензоміцину).

Серед генетичних і генно-інженерних методів досліджень описано способи перенесення плазмід з клітин неметилуючого штаму *E. coli* ET12567 pUZ8002⁺ у вегетативні клітини чи спори стрептоміцетів, *Nonomuraea* spp., *Actinoplanes* spp.; охарактеризовано методи і умови, за яких проводили горизонтальний агарозний гель-електрофорез та елюювання фрагментів ДНК з агарозного гелю, ферментативну обробку ДНК, виділення плазмідної і хромосомної ДНК, виділення сумарної РНК і синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР); охарактеризовано підходи, застосовані для секвенування геномів актиноміцетів.

Серед біохімічних методів досліджень у розділі охарактеризовано здійснення кількісних та якісних тестів на β -глюкуронідазну активність; методи екстракції і аналізу таких антибіотиків як ландоміцини, люцензоміцин, A40926 і A50926, очищення ГПА за допомогою D-Ala-D-Ala-афінної хроматографії.

Наприкінці другого розділу охарактеризовано основні методи біоінформатичних досліджень, застосовані при виконанні дисертаційної роботи.

У третьому розділі роботи охарактеризовано **плейотропні регулятори морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів, що належать до *adpA*-опосередкованого каскаду і YtrA-підродини**, як знаряддя для контролю продукції антибіотиків. Ген *adpA* є найважливішим глобальним регулятором біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів. Регулон AdpA є значним та включає від 100 до 500 генів. Цікавим є регуляторний механізм продукції білка AdpA на трансляційному рівні, що опосередковується трансляцією рідкісного UUA кодона, який знаходиться в мРНК *adpA*; UUA є найменш вживаним кодоном в транскриптомі актиноміцетів, в чийх геномах переважають ГЦ-пари. Відповідно, ген *bldA* кодує єдину в стрептоміцетів лейцинову тРНК (тРНК^{лей}_{UAA}), що забезпечує трансляцію UUA. Функціонування лейцинової тРНК, кодованої *bldA*, в свою чергу може регулюватися посттрансляційними модифікаціями цієї тРНК. Очевидно, що всі ці компоненти *adpA*-опосередкованого каскаду відіграють важливу роль в регуляції продукції антибіотиків.

Хоча функції багатьох AdpA-регуляторів в стрептоміцетів вивчено, їх філогенія досі не вивчалася. Відповідно, нами здійснено пошук ортологів AdpA у стрептоміцетів, геноми яких були доступні в базі даних GenBank на момент виконання роботи (2017 рік), і знайдено 390 послідовностей. AdpA належить до білків AraC/XylS-родини, для яких характерна двохдоменна організація у складі GATase-1 домена (глутамінової амідотрансферази) і НТН_18 ДНК-зв'язувального домена. Рідкісний ТТА кодон модельних *adpA* розміщений між ділянками, що кодують ці два домени. В цій роботі виявлено, що таке положення ТТА-кодона є консервативним в генах ідентифікованої ортологічної групи AdpA (хоча знайдено декілька *adpA*-генів з додатковими ТТА-кодонами). Зокрема, в деяких ортологів *adpA* додатковий ТТА-кодон знайдено в ділянці, що кодує GATase-1 домен; тоді як в *Streptomyces* sp. Hm1cA12 додатковий ТТА-кодон знайдено в ділянці, що кодує ДНК-зв'язувальний домен, а в *S. neyagawaensis* SL-387 додатковий ТТА-кодон виявлено біля стоп-кодона.

В двохдоменній архітектурі AdpA (див. вище) GATase-1 домен, найімовірніше, потрібний для димеризації білка, бо AdpA зв'язує операторний сайт у вигляді гомодимеру. Нами було висунуто припущення, що ДНК-зв'язувальний домен AdpA здатний функціонувати без димеризаційного; відсутність потреби в димеризації, в свою чергу, може вести до розширення репертуару зв'язування такого окремого домена в геномі. Для перевірки припущення, створено вектори для надекспресії генів, що кодують ортологи *adpA*, із низки модельних стрептоміцетів, а саме: із *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 (*XNR_4181*), *S. ghanaensis* (= *viridosporus*) ATCC 14672 (*adpA_{gh}*), *S. clavuligerus* ATCC 7064 (*adpA_{scl}*), *S. coelicolor* A3(2) (*adpA_{sco}*). Паралельно, створено вектори для надекспресії сегментів цих же генів, які кодують лише ДНК-зв'язувальний домен (*XNR_4181_dbd*, *adpA_{gh_dbd}*, *adpA_{scl_dbd}*, *adpA_{sco_dbd}*). Отримані вектори перенесено в штаб *S. coelicolor* A3(2) з нокаутом гена *adpA_{sco}* – *S. coelicolor* M851. Цей штаб має кондиційний «лисий» (**bald**, Bld) фенотип, при якому на середовищі R5 він не здатний до формування повітряного міцелію і споруляції. Очікувалось, що створені конструкти зможуть комплементувати такий фенотипу *S. coelicolor* M851.

Виявлено, що введення повних генів *XNR_4181*, *adpA_{gh}*, *adpA_{scl}* і *adpA_{sco}* відновлювало утворення спор, вказуючи на те, що всі ці регулятори (будучи близькими гомологами) мають когерентні властивості. Введення *XNR_4181_dbd*, *adpA_{gh_dbd}*, *adpA_{scl_dbd}* і *adpA_{sco_dbd}* також відновлювало споруляцію M851. Отже, підтверджено вихідну гіпотезу: наявність GATase-1 димеризаційного домена не обов'язкова для функціонування AdpA.

Вивчення компонентів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду продовжено на моделі *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074. J1074 відрізняється від інших стрептоміцетів доступністю для генно-інженерних маніпуляцій і природно-мінімізованим геномом (прибл. 7 млн.п.н.). Закономірно, J1074 розглядається як потенційний господар для гетерологічної експресії КБГ різних антибіотиків.

У світлі того, що експресія більшості КБГ антибіотиків, які походять із стрептоміцетів, є *adpA*-опосередкована і лімітується трансляцією UUA кодонів, вирішили вивчити властивості гена *bldA* із J1074 методом нокауту. Виявилось, що на відміну від інших модельних об'єктів, відсутність *bldA* не призводить в J1074 до Bld фенотипу, хоча і спостерігали відставання мутантів у споруляції. Натомість, відсутність *bldA* призвела до зупинки продукції пауломіцину, антибіотика активного проти Грам-позитивних бактерій; очевидно, причиною цього є наявність ТТА-кодону в гені

(*XNR_0585*) потенційного шлях-специфічного LuxR-подібного регулятора біосинтезу пауломіцину.

Для того, щоб досягти функціонального стану тРНК бактерій, а зокрема і стрептоміцетів, піддаються різноманітним посттрансляційним модифікаціям. Перші кроки модифікації таких тРНК як тРНК_{XXA}, до яких належить і тРНК^{лей}_{UAA} (кодована геном *bldA*), є найважливішими і включають модифікацію залишку аденіну в положенні 37 (A37), що розміщений в антикодоновій петлі на 3'-кінці антикодона XXA (34-36). Дві послідовні реакції модифікації виконуються ферментами MiaA і MiaB. A37-N6-диметилалілтрансфераза MiaA каталізує утворення N6-ізопентеніл аденозину, а N6-ізопентеніл-A37-C2-метилтіотрансфераза MiaB забезпечує утворення 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенозину. В геномі J1074 нами виявлено гени, які кодують MiaA і MiaB – *XNR_1074* (*miaA*) і *XNR_1078* (*miaB*), відповідно, даючи змогу припустити, що тРНК^{лей}_{UAA} (продукт *bldA*) піддається цим модифікаціям. Щоб перевірити це припущення, виконано нокауті обох генів; ВЕРХ аналіз екстрактів тРНК мутантів продемонстрував, що припущення про функції *XNR_1074* і *XNR_1078* виявилось правильним (Рис. 1а).

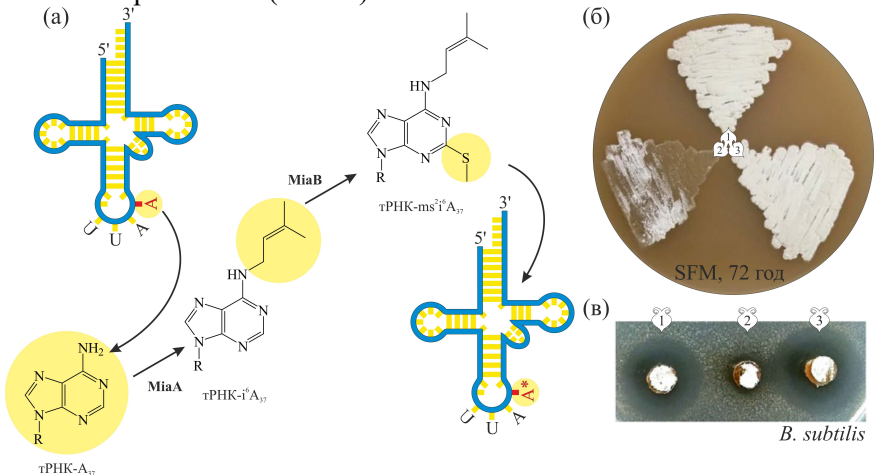


Рис. 1. Модифікації тРНК^{лей}_{UAA}, каталізовані MiaA і MiaB (а), фенотип (б) та антибактерійні властивості (в) *S. albus* Δ*miaA* (1) в порівнянні із Δ*miaB* (2) та диким типом (3).

Більш цікавим було вивчення впливу нокаутів генів *miaA* і *miaB* на продукцію антибіотиків у J1074. Нокауті генів *miaA* і *miaB* не чинили

радикального впливу на морфогенез, хоча в $\Delta miaA$ мутанта спостерігали відставання в споруючій (Рис. 16). Як і $\Delta bldA$, $\Delta miaA$ мутант майже не продукував пауломіцину, тоді як продукція пауломіцину в $\Delta miaB$ не відрізнялася від такої у дикого типу (Рис. 1в). Мабуть, спостережені ефекти спричинені тим, що модифікація тРНК^{лей}_{UAA}, яку забезпечує MiaA, є критичною для правильного розпізнавання UUA-кодону цією тРНК, і, відповідно, трансляції ТТА-вмісних генів. Для того, щоб перевірити це припущення, створено плазмиди pSAGA і pSAGAt. В обох плазмід два алелі гена β -глюкуронідази *gusA* знаходяться під контролем сильного конститутивного промотора *aac(3)IVp* (промотор гена стійкості до апраміцину). При цьому, у плазміді pSAGA використано вихідний ген *gusA*, в якому є лейциновий кодон CTG, розміщений відразу після старт-кодону. Натомість, в pSAGAt замінили CTG кодон на ТТА, що не змінює амінокислотну послідовність білка, але впливає на трансляційну динаміку створеного алеля. Отримані плазмиди перенесли в J1074 і $\Delta miaA$. Порівнявши β -глюкуронідазну активність отриманих рекомбінантних штамів, виявили, що вона порівнянна у SAM2 pSAGA⁺, SAM2 pSAGAt⁺ і $\Delta miaA$ pSAGAt⁺, але практично відсутня в $\Delta miaA$ pSAGAt⁺. Ці дані засвідчують, що вихідне припущення є, скоріше, правильним, а немодифікована тРНК^{лей}_{UAA} не здатна до ефективної трансляції UUA-кодону.

Іншою важливою родиною плеiotропних регуляторів продукції антибіотиків і морфогенезу стрептоміцетів є родина GntR. GntR-родина поділяється на сім підродин, члени яких відрізняються за структурою С-термінального домена. Серед цих підродин є YtrA-підродина, білки якої мають найкоротший олігомеризаційний домен, що складається лише із двох α -спіралей; регулятори цієї підродини вивчені мало для актиноміцетів. Представники YtrA-підродини зацікавили нас, бо один із них – LndYR – є залученим в регуляції біосинтезу полікетидного антибіотика ландоміцину Е в *S. globisporus* 1912. Тому, ми вирішили вивчити особливості розповсюдження та філогенії YtrA-регуляторів в актинобактерій, а також їх властивості у модельного стрептоміцета *S. coelicolor* M145.

Використовуючи *ytrA B. subtilis* як запит, проаналізовано всі доступні в базі даних GenBank на момент виконання роботи (2016 рік) геноми актинобактерій на наявність гомологів. Всього виявлено 17 гомологів в 6 геномах підкласу *Coriobacteridae*, 3 гомолога в 2 геномах підкласу *Rubrobacteridae* і 76 гомологів в 80 геномах підкласу *Actinobacteridae*. Вивчення геномного контексту та філогенії знайдених генів показало, що ці

гени найчастіше колокалізовані з генами ABC-транспортерів, і поділяються на 7 клад. В модельного штаму *S. coelicolor* було знайдено три гени YtrA-регуляторів, а саме *SCO0823*, *SCO1728* і *SCO3812*, що належали до різних клад. Дослідивши мутанти *S. coelicolor* за генами *SCO0823*, *SCO1728* і *SCO3812*, ми не виявили радикального впливу відсутності цих генів на продукцію антибіотиків та морфогенез, лише певні маргінальні зміни. Це дає змогу нам припустити, що YtrA-регулятори стрептоміцетів забезпечують адаптивну мінливість організмів до невстановлених чинників зовнішнього середовища, але не відіграють ключової ролі.

У підсумку, за результатами **третього розділу** вдалося оновити уявлення про розповсюдження і еволюцію AdpA-подібних білків; вивчено *adpA*-опосередкований каскад в *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 і описано нові його компоненти.

В **четвертому розділі** описано підходи до **генно-інженерних маніпуляцій із *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090 і *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504**. Публічно-доступні геноми актиноміцетів дають змогу проаналізувати потенціал цих бактерій до продукції вторинних метаболітів і обрати пріоритетних кандидатів для експериментального вивчення. У цій роботі, обрано такі організми як *A. rectilineatus* NRRL B-16090 і *S. roseochromogenes* NRRL 3504, в геномах яких нами знайдено потенційні КБГ пептидних антибіотиків. В NRRL B-16090 виявлено КБГ ГПА подібний до КБГ ристоцетину, а в NRRL 3504 – КБГ, подібний до КБГ депсипептидного антибіотика салінамідю. Створюючи підґрунтя до подальшого вивчення цих перспективних КБГ, необхідно розробити ефективні методи генно-інженерних маніпуляцій із NRRL B-16090 і NRRL 3504. Доступність NRRL B-16090 для генно-інженерних маніпуляцій дотепер не вивчалася. NRRL 3504 же, хоча і є відомим продуцентом амінокумаринового антибіотика хлоробіоцину, був описаний як надзвичайно складний об'єкт для генно-інженерних маніпуляцій.

Для того, щоб знайти оптимальні умови споруляції, вивчено морфологію NRRL B-16090 за умов росту на різних агаризованих середовищах. За допомогою сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ) виявлено, що спорангії формуються в NRRL B-16090 на середовищі ISP3 за умов пролонгованого культивування (>240 год) (Рис. 2а). Використовуючи культури, вирощені за таких умов, відпрацьовано методику отримання концентрованих спорових суспензій, що є важливою передумовою для перенесення плазмід.

Інтегративні вектори, засновані на системах інтеграції актинофагів широко використовуються в генетиці актиноміцетів як знаряддя для експресії генів. Це вектори, що використовують *int-attP* модулі актинофагів ϕ C31, VWB1 і ϕ BT1. Додатково використовуються реплікативні вектори на основі pSG5-реплікона. Тому, нами було досліджено чи доступний NRRL B-16090 для перенесення таких плазмід методом міжродової кон'югації з використанням клітин *E. coli* ET12567 pUZ8002⁺ як донорів, а спор NRRL B-16090 – як клітин-реципієнтів.

В результаті, вдалося досягти перенесення плазмід на основі систем інтеграції фага ϕ C31 і pSG5 реплікона. Частота перенесення pSAGA (система інтеграції ϕ C31) становила прибіл. 10^{-3} , а pKAGA1 (на основі pSG5 реплікона) – прибіл. 10^{-5} . Плазмід на основі систем інтеграції фагів ϕ BT1 і VWB1 в NRRL B-16090 перенести не вдалося.

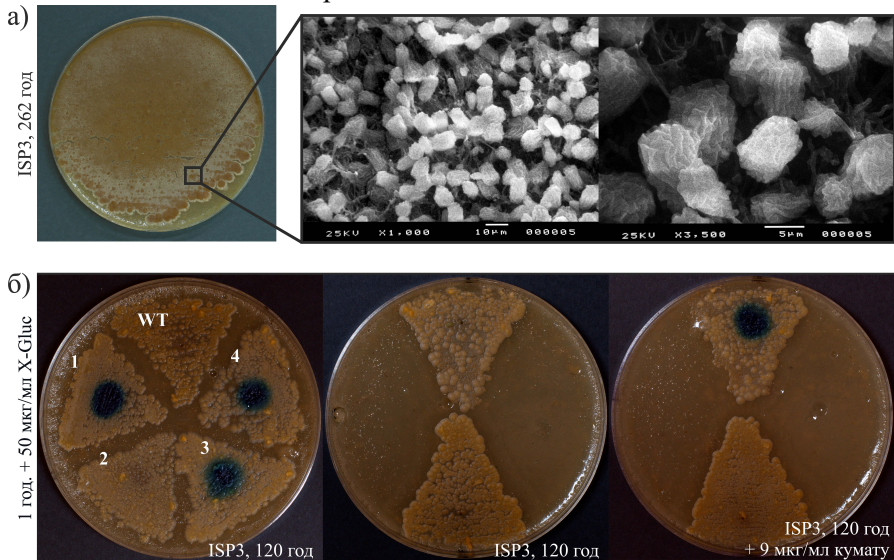


Рис. 2. а) морфологія і мікроморфологія *A. rectilineatus* за умов росту на середовищі ISP3; **б)** якісний аналіз β -глюкуронідазної активності в штаммах *A. rectilineatus* дикого типу (WT) і таких, що несуть pSAGA (1), pTEGA (2), pGUSmoeE5script (3), pGT2p (4), pGCymRP21 (5).

Далі було перевірено активність ряду гетерологічних промоторів у NRRL B-16090. Для цього, використовували такі плазмід: pSAGA, pTEGA (несе *gusA* під контролем конститутивного промотора *ermEp*),

pGUSmoeE5script (*gusA* під контролем *moeE5p*), pGT2p (*gusA* під контролем *tei2p*) і pGCymRP21 (*gusA* під контролем кумат-індуцибельного *P21*). Кількісний та якісний аналіз β -глюкуронідазної активності отриманих рекомбінантів показав, що промотори *aac(3)IVp*, *moeE5p* і *tei2p* забезпечують сильну експресію гена *gusA* (Рис. 26), а отже є ефективними знаряддями для надекспресії генів в NRRL B-16090 (Рис. 4.16).

Для *S. roseochromogenes* NRRL 3504 на сьогодні описане використання лише векторів на основі системи інтеграції фага ϕ C31. Нами проаналізовано послідовність генома NRRL 3504, і виявлено наявність *attB*-сайтів інших двох актинофагів, а саме VWB1 і ϕ BT1. Дотепер, трансформація протопластів була основним методом перенесення плазмід в NRRL 3504. Цей підхід не підходить для рутинних робіт. Тому, розроблено методику для приготування концентрованих спорових суспензій NRRL 3504. Використовуючи спори як клітини-реципієнти, вдалося успішно перенести в NRRL 3504 плазмиди pSAGA (ϕ C31), pRAGA1 (ϕ BT1), pSoAGA2 (VWB1) і pKAGA1 (pSG5).

Для подальшого вивчення вторинного метаболу NRRL 3504 необхідний штам, не здатний до продукції хлоробіоцину. Відповідно, нас зацікавило, чи можна застосувати суїцидні плазмиди для інсерційного нокауту генів в NRRL 3504 за один етап гомологічної рекомбінації. Для цього створено плазмиду pKOClo на основі суїцидного вектора pKC1132, що несе внутрішню ділянку ключового оперона *cloH-I*. pKOClo перенесено в NRRL 3504 з використанням розробленого протоколу для кон'югаційного перенесення. Отриманий рекомбінантний штам виявився не здатним до продукції хлоробіоцину (Рис. 36), а отже його в подальшому можна використати для вивчення інших компонентів вторинного метаболу NRRL 3504.

У попередньому розділі нами описано роль елементів *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду, а саме генів *adpA* і *bldA*, у продукції антибіотиків у *S. albus* (= *albidoflavus*). Відповідно, вирішено перевірити, чи мають ці гени вплив на вторинний метабол NRRL 3504. Відповідно, здійснено експресію гетерологічних генів *adpA* і *bldA*, отриманих із *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 в NRRL 3504. Рекомбінантні штами NRRL 3504 з надекспресіями генів *adpA* і *bldA* продукували прибіл. в 3 і 2,5 рази більше хлоробіоцину, відповідно (Рис. 3в, г).

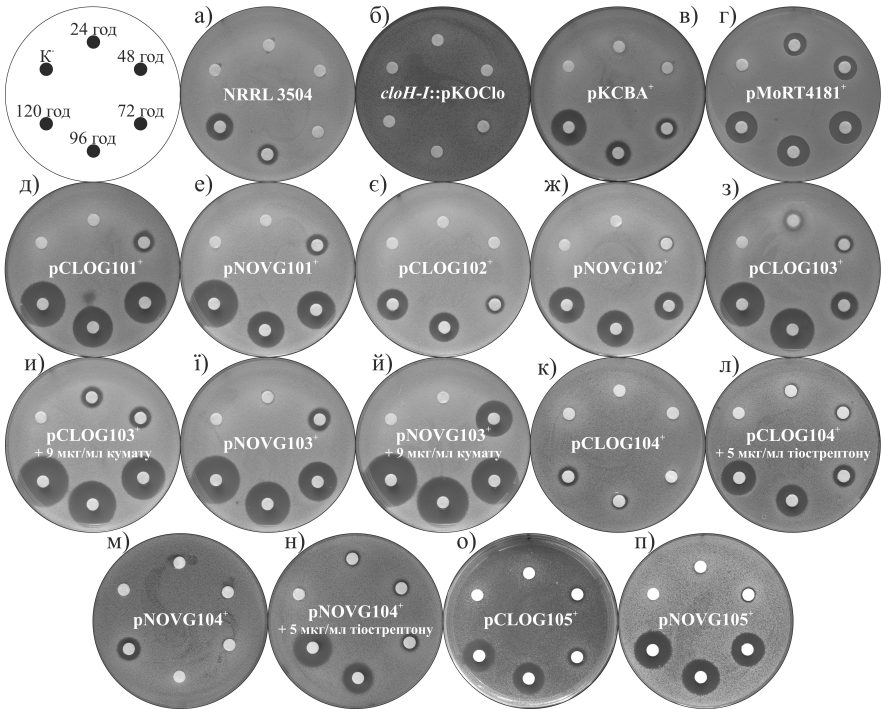


Рис. 3. Зони пригнічення росту *M. luteus* екстрактами з культур (середовище GYM) рекомбінантних штамів *S. roseochromogenes* з нокаутом *clo* (б), надекспресіями генів *bldA* (в), *adpA* (г), *cloG* і *novG* (д-п) у порівнянні із диким типом (а). К – порожній розчинник (метанол).

Для завершення створення генетичних інструментів для маніпулювання вторинним метаболітом NRRL 3504 важливо вивчити ефективність платформ для надекспресії генів. Як репортерні гени використано ген шлях-специфічного регулятора біосинтезу хлоробіцину *cloG*, а його ортолог із КБГ новобіцину (спорідненого амінокумаринового антибіотика) – *novG*. Гени клонували в такі вектори: pmoeE5script; pTES (система інтеграції ϕ C31, під контроль конститутивного промотора *ermEp*); pGcymRP21; pIJ6902 (система інтеграції ϕ C31, під контроль тіострептон-індуцибельного промотора *tipAp*); pOOB83e (pSG5-реплікон, під контроль конститутивного *ermEp*). Отримані вектори перенесено в NRRL 3504, а всі отримані рекомбінантні штами надпродукували хлоробіцин, демонструючи високу ефективність обраних платформ експресії (Рис. 3д-

п). Найвищі показники продукції продемонстрували рекомбінанти, які несли *cloG* і *novG* у складі pGСymRP21, продукуючи в 20 і 32 рази більше хлоробіоцину, ніж вихідний NRRL 3504. В кількісному перерахунку це становило 169 і 239 мг/л, що є найвищим зареєстрованим в літературі показником продукції хлоробіоцину.

Отримані в четвертому розділі результати роблять *A. rectilineatus* NRRL B-16090 доступним для генно-інженерних маніпуляцій і значно оновлюють та розширюють інструментарій для генно-інженерних маніпуляцій з *S. roseochromogenes* NRRL 3504, відкриваючи шлях для подальшого вивчення цих штамів в якості продуцентів нових пептидних антибіотиків.

В п'ятому розділі дисертаційної роботи вивчали гени, що контролюють продукцію глікопептидних антибіотиків в бактерій роду *Nonomuraea*. *Nonomuraea* є родом так званих «рідкісних» актиноміцетів, чий потенціал до продукування вторинних метаболітів досі вивчений лише поверхнево. Найбільш важливим вторинним метаболітом, що походить з *Nonomuraea*, є ГПА типу IV A40926, який продукується *N. gerenzanensis* ATCC 39727. A40926 є попередником напівсинтетичного клінічного ГПА другого покоління – далбаванцину. Далбаванцин використовують в клініці для лікування інфекцій шкіри, спричинених стійкими до антибіотиків патогенами. Відповідно, вивчення продукції A40926 та створення його надпродуцентів є пріоритетною задачею.

Представники роду *Nonomuraea* визнані доволі складними об'єктами для генно-інженерних маніпуляцій. Зокрема, дотепер системи для надекспресії генів у *N. gerenzanensis* раціонально не вивчалися; використовувався загальноприйнятий для надекспресії генів у стрептоміцетів промотор гена стійкості до еритроміцину – *ermEp*. Дані літератури свідчать, що *ermEp* не є оптимальним вибором для надекспресії генів в т.зв. «рідкісних» актиноміцетів. Тому, перевірено активність ряду нативних і гетерологічних промоторів в *N. gerenzanensis* ATCC 39727 і *N. coxensis* DSM 45129 з метою виявлення оптимального промотора для експресії генів у цих організмах. Штам *N. coxensis* зацікавив нас тим, що в ході аналізу його геному виявлено КБГ подібний до КБГ A40926. Для цього створено набір інтегративних плазмід, що несли ген β-глюкуронідази *gusA* під контролем серії нативних і гетерологічних промоторів. Отримані плазмідні перенесено в *N. gerenzanensis*. З огляду на те, що методи перенесення плазмід до *N. coxensis* дотепер невідомі, також розроблено методику кон'югаційного перенесення плазмід до *N. coxensis* із

використанням спор цього штаму як реципієнтів, а клітин *E. coli* ET12567 pUZ8002⁺ як донорів.

β-глюкуронідазну активність рекомбінантних штамів *Nonomuraea* оцінювали якісно і кількісно. Обидва штами дикого типу *N. gerenzanensis* і *N. coxensis* не проявляли β-глюкуронідазної активності. Всього протестовано такі гетерологічні промотори: *aac(3)IVp* (за допомогою плазмиди pSAGA) – промотор гена апраміцинової ацетилтрансферази, отриманий з pSET152A; *ermEp* (за допомогою плазмиди pTEGA); *moeE5p* (за допомогою плазмиди pGUSmoeE5script); *tei2p* (за допомогою плазмиди pGT2p) – промотор гена стійкості до тейкопланіну *tei2* з *A. teichomyceticus*; *P21* (за допомогою плазмиди pGCymRP21). Паралельно також перевіряли активність шести нативних промоторів, що належать генам домашнього господарства *N. gerenzanensis*: *gyrB_{ngp}* – промотор гена β-субодиниці ДНК-гірази (за допомогою плазмиди pGBP); *hrdB_{ngp}* – промотор гена σ-фактора РНК-полімерази RpoD (за допомогою плазмиди pHBP); *ssb_{ngp}* – промотор гена білка зв'язування одноланцюгові ДНК (за допомогою плазмиди pSBP); *rpsL_{ngp}* – промотор гена S12p рибосомного білка SSU (за допомогою плазмиди pRLP); *rpoBR_{ngp}* – промотор гена β-субодиниці РНК-полімерази, стійкої до рифампіцину (за допомогою плазмиди pRBP2); *rpoB_{ngp}* – промотор гена β-субодиниці РНК-полімерази, чутливої до рифампіцину (за допомогою плазмиди pRBP1).

Рекомбінанти *N. gerenzanensis* pSAGA⁺ (Рис. 4а) і *N. coxensis* pSAGA⁺ (Рис. 4б), що несуть *aac(3)IVp-gusA*, демонстрували найінтенсивнішу β-глюкуронідазну активність, як за умов вирощування на чашках, так і в зануреній культурі. Натомість, у *N. gerenzanensis* pTEGA⁺ і *N. coxensis* pTEGA⁺, що несуть *ermEp-gusA*, β-глюкуронідазна активність спостерігалася на низькому рівні (Рис. 4). У штамів, що несуть плазмиду pGCymRP21, β-глюкуронідазна активність була індукована додаванням 50 мкМоль кумату, що підтверджує індукцибельну експресію гена *gusA*. Однак, у *N. gerenzanensis* pGCymRP21⁺ базальний рівень GusA-активності був виявлений навіть за відсутності кумату (Рис. 4а). На відміну від цього, у *N. coxensis* pGCymRP21⁺ не було виявлено базального рівня експресії *cmt-P21p-gusA* (Рис. 4б). У підсумку, *aac(3)IVp* поведився як сильний промотор як у *N. gerenzanensis*, так і в *N. coxensis*, а активнішим за нього був лише *cmt-P21p*, за умов індукції шляхом додаванням 50 мкМоль кумату (Рис. 4). Це робить обидві системи експресії потенційними кандидатами для надекспресії генів в обох штамів *Nonomuraea*.

В подальшому нас зацікавила можливість застосування розроблених систем експресії генів для створення надпродуцентів A40926 в *N. gerenzanensis*. Найефективнішим існуючим способом для покращення продукції важливих ГПА є маніпуляції з генами шлях-специфічних регуляторів відповідних КБГ. КБГ для A40926, названий *dbv*, містить два гени, що кодують транскрипційні регулятори: *dbv3* і *dbv4*. Ген *dbv3* кодує регулятор типу LuxR, а ген *dbv4* – StrR-подібний регулятор.

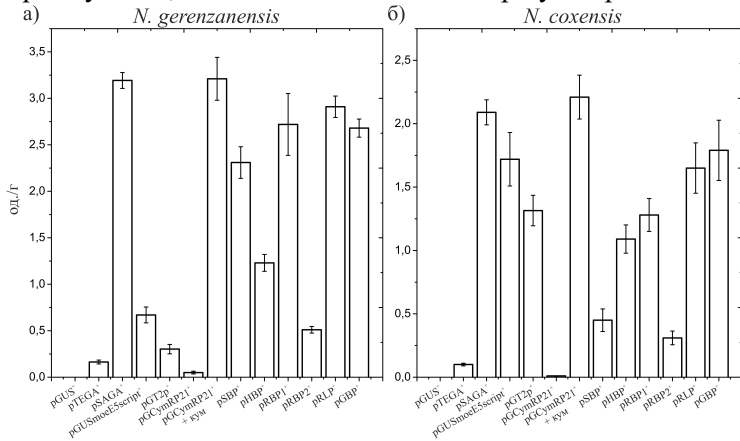


Рис. 4. Результати кількісного вимірювання глюкуронідазної активності у рекомбінантних штаммах *N. gerenzanensis* (а) і *N. coxensis* (б), вирощених у рідких середовищах FM2 та ISP2, відповідно, що несуть плазміди, в яких ген *gusA* злито з рядом нативних та гетерологічних промоторів. Наведені результати є середніми значеннями трьох незалежних біологічних повторів. Планки похибок показують стандартні відхилення.

Оскільки *aac(3)IVp* було ідентифіковано як найактивніший конститутивний промотор для *Nonomuraea* spp., його використали для надекспресії регуляторних генів *dbv3* і *dbv4* у *N. gerenzanensis*. Обидва гени клоновано в інтегративний вектор pSET152A, що дало рекомбінантні плазміди pSAD3 і pSAD4, відповідно. Користуючись послідовним розташуванням генів *dbv3* і *dbv4*, також клоновано обидва гени разом, створюючи плазмиду pSAD3-4. Всі створені плазміди перенесено в *N. gerenzanensis*.

Для того, щоб оцінити вплив надекспресії генів шлях-специфічних регуляторів, здійснено порівняння росту і продукції антибіотика в

рекомбінантних штаммах за умов культивування в колбах Ерленмеєра і лабораторному ферментері (3 л). Штами *N. gerezanensis*, що несуть плазмиди pSET152A, pSAD3, pSAD4 або pSAD3-4, паралельно вирощували протягом 192 год в промисловому середовищі FM2 в колбах Ерленмеєра, вивчаючи динаміку накопичення сухої біомаси, змін pH, споживання глюкози і продукції A40926 (кожні 24 год). Усі три рекомбінантні штамми починали накопичувати помітну кількість A40926 раніше, ніж контрольний штам (Рис. 5а). Продукція A40926 досягала піку після 120 год росту в *N. gerezanensis* pSAD3⁺ (прибл. 500 мг/л) і pSAD4⁺ (майже 650 мг/л), тоді як у pSAD3-4⁺ максимальна продуктивність (прибл. 600 мг/л) досягалася на 144 год культивування (Рис. 5а). Контрольний штам продукував близько 300 мг/л через 144-168 год після інокуляції (Рис. 5а). Глюкоза споживалася швидше у порівнянні з контрольним рекомбінантними штамми, що містять надекспресовані регуляторні гени, ці ж штамми накопичували менше біомаси, ніж *N. gerezanensis* pSET152A⁺ (Рис. 5а).

Рекомбінантні штамми поводити себе інакше в лабораторних ферментерах на 3 л, що містять 2 л робочого об'єму FM2. Виявилося, що усі штамми продукували значно більше A40926 і росли краще, ніж у в колбі, за винятком *N. gerezanensis* pSAD3⁺. Контрольний штам досягав піку продукції A40926 – майже 400 мг/л – через 120 год інкубування (Рис. 5б). Рекомбінантний штам pSAD4⁺ досягав піку продукції антибіотика – 700 мг/л – через 168 год (Рис. 5б). Найкращі показники щодо продукції A40926 у ферментері продемонстрував штам pSAD3-4⁺, який продукував максимальну кількість антибіотика – 800 мг/л – після 168 год культивування (Рис. 5б). Штам pSAD3⁺ слабо накопичував біомасу, а продукція A40926 починалася дуже пізно (після 168 год культивування) і ніколи не перевищувала 100 мг/л (Рис. 5б).

Отримані результати демонструють створення і ефективного застосування нових систем експресії генів в бактерій роду *Nonomuraea*, що дозволило створити надпродуцентів промислово-важливого антибіотика A40926.

Як вже згадувалося вище, нами знайдено потенційний КБГ ГПА в геномі *N. coxensis*. Однак, проект генома *N. coxensis*, доступний в базі даних GenBank, містив послідовність низької якості. Як наслідок, потенційний КБГ ГПА був фрагментований на декількох контигах, а деякі важливі частини КБГ були відсутні. Тому, в цій роботі заново секвеновано і створено збірку генома *N. coxensis* із комбінацією HiSeq

Plumina і GridION ONT. Аналіз генома за допомогою antiSMASH 5.0 виявив 26 потенційних КБГ, включно з новим КБГ ГПА.

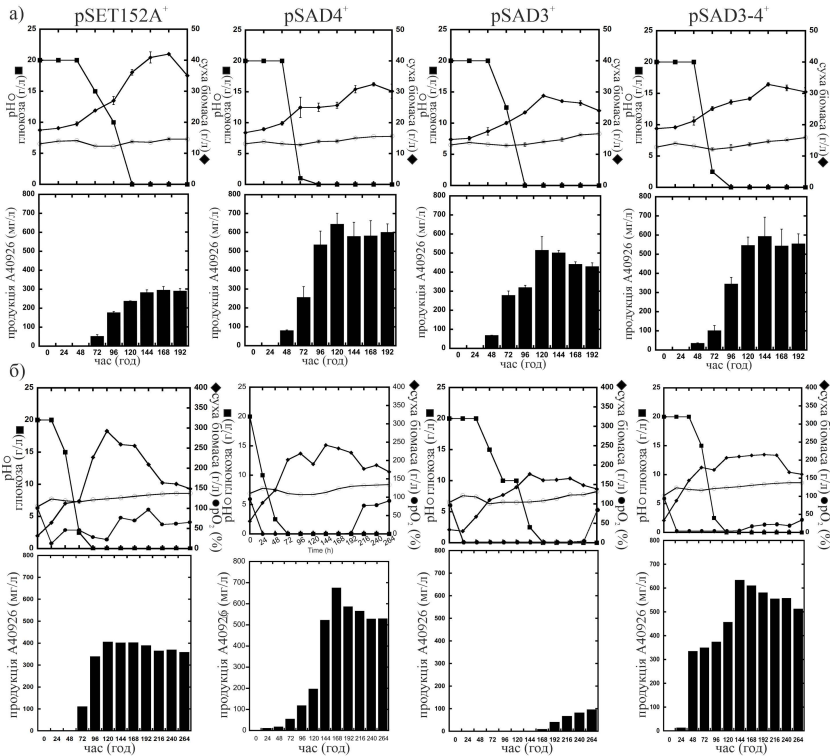


Рис. 5. Динаміка росту та продукції A40926 у *N. gerenzanensis* pSET152A⁺ і рекомбінантних штамів, що надекспресують *dbv4*, *dbv3* і *dbv3-4* в індустріальному середовищі FM2 в колбах Ерленмеєра (а) і ферментерах (б).

Ідентифікований КБГ ГПА названо *nos*. Виявилось, що до складу *nos* входить 36 відкритих рамок зчитування, з яких 35 гомологічні до генів *dbv* (негомологічний ген кодував ймовірну транспозазу) (Рис. 6а). Помітна відмінність полягала в тому, що *nos* не мав ортолога *dbv29*. Dbv29 є гексозооксидазою, відповідальною за окислення GlcN-ацильної частини A40926 (Рис. 6а). Не дивлячись на подібність генів *dbv* і *nos*, організація обох КБГ значно відрізнялася (Рис. 6а). Враховуючи відомості про шлях біосинтезу A40926, вдалося передбачити біосинтетичний шлях

потенційного ГПА в *N. coxensis* DSM 45129, що є аналогом A40926, який не має карбоксильної групи на GlcN-ацильному залишку (Рис. 6б).

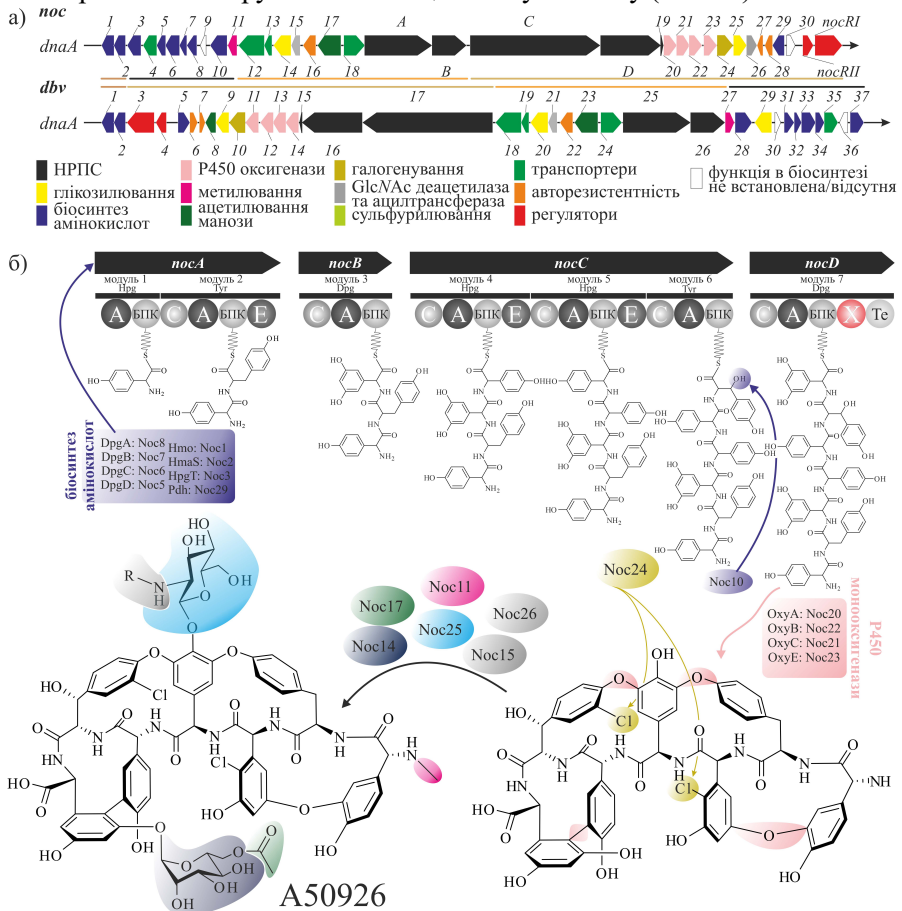


Рис. 6. Порівняння генетичної організації кластера генів біосинтезу A40926 *dbv* і описаного в цій роботі кластера генів біосинтезу A50926 *noc* (а) та моделювання біосинтетичного шляху для A50926 (б).

Окрім біосинтетичних генів, *noc* і *dbv* містять аналогічний набір регуляторних генів (Рис. 6а). Два головних регулятори біосинтезу A40926 – Dbv3 і Dbv4 – мають ортологів кодованих в *noc* – NocRI (94.4% ідентичності амінокислотної послідовності, і.ак.п.) і NocRII (86.3% і.ак.п.), відповідно. Також, *noc* кодує єдиний білок стійкості до

ГПА – це Noc27, близький (87,3% і.ак.п.) ортолог Dbv7 (VanYn), який є D,D-карбоксипептидазою стійкості до A40926 у *N. gerenzanensis*.

Здатність *N. coxensis* до продукції антибіотиків дотепер не перевірялася. Антимікробну активність вдалося виявити у культур *N. coxensis*, вирощених в середовищах ISP21 і TM1, відповідно застосовано D-Ala-D-Ala-афінну хроматографію для виділення ГПА з цих культур. Аналіз отриманих зразків за допомогою ВЕРХ-МС показав присутність сполук, що утворюють іони з m/z 852,3 і 859,3 ($[M+2H]^{2+}$), на 28 і 14 Да, відповідно, меншим ніж стандарт A40926 ($[M+2H]^{2+}=866,3$, що відповідає A40926 B) (Рис. 7а). Отриманий комплекс було названо A50926. Подальший аналіз за допомогою МС/МС дав змогу локалізувати цю відмінність від A40926 у залишку глюкозаміну. Тобто, в A50926 залишок GlcN-ацилу містить 6-гідроксильну групу (Рис. 7б). Це корелює з відсутністю гомолога *dbv29* в *noc*

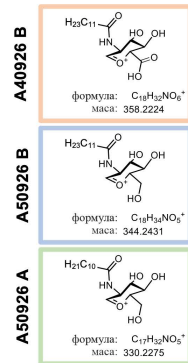
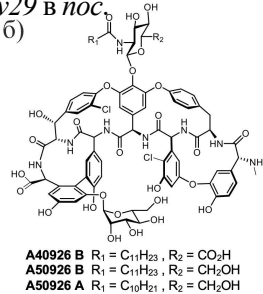
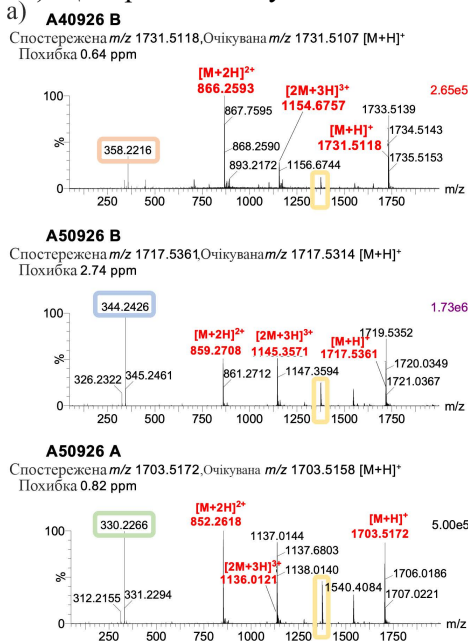


Рис. 7. МС-характеристика нового комплексу A50926 з *N. coxensis* (а) і запропонована структура для A50926 (б) у порівнянні з A40926.

Виходячи з того, що надекспресія генів *dbv4* і *dbv3* мала позитивний вплив на продукцію A40926, нас зацікавило, чи можна застосувати ці гени і

для покращення продукції A50926 у *N. coxensis*. Для цього, в клітині *N. coxensis* перенесено плазмиди pSAD4 і pSAD3, а продукцію A50926 вивчено в отриманих рекомбінантних штаммах. Виявилося, що в продукційних середовищах ISP2l, і TM1, штами *N. coxensis* pSAD3⁺ і pSAD4⁺ продукували більше A50926, ніж дикий тип. У ISP2lm *N. coxensis* pSAD3⁺ досягав піку продукції антибіотика на 192 год, продукуючи прибіл. 45 мг/л, що перевищує продуктивність як дикого типу (прибіл. 20 мг/л), так і *N. coxensis* pSAD4⁺ (прибіл. 30 мг/л). У середовищі TM1m продукція антибіотика в штамі *N. coxensis* pSAD3⁺ була трохи вищою, досягаючи прибіл. 50 мг/л на 192 год культивування. У той самий момент часу в TM1m дикий тип і *N. coxensis* pSAD4⁺ продукували прибіл. 16 і 22 мг/л антибіотика, відповідно.

Враховуючи, що *N. gerenzanensis* є єдиним відомим продуцентом A40926, а також те, що нами створено ефективні системи експресії генів в *N. coxensis*, вирішили перевірити, чи можна створити нового продуцента A40926 на основі *N. coxensis*. Для цього в *N. coxensis* надекспресовано ген *dbv29* з *N. gerenzanensis*, який кодує гексозооксидазу, необхідну для окислення C-6 гідроксильної групи GlcN-ацилу у відповідну карбонову кислоту. Ген *dbv29* клоновано в pSET152A, створюючи плазмиду pSAD29, яка потім була перенесена в *N. coxensis*. *N. coxensis* pSAD29⁺ вирощували в середовищі ISP2lm протягом 168 год, а отриманий комплекс ГПА очищали за допомогою D-Ala-D-Ala афінної хроматографії.

Аналіз за допомогою ВЕРХ-МС показав, що створений штам *N. coxensis* pSAD29⁺ здатний продукувати молекулу з ідентичним часом виходу та МС-спектром, як у A40926 (спостережене значення m/z 1731,5181, розраховане для A40926 $[M+H]^+$ m/z 1731,5107) (Рис. 8а, б). МС/МС продукту *N. coxensis* pSAD29⁺ продемонструвала, що він має фрагментаційний спектр ідентичний до стандарту A40926, включаючи фрагмент з m/z 358,22, що відповідає карбоксильованому залишку GlcN-ацилу (Рис. 8в).

У підсумку, ідентифіковано продукцію нового ГПА, який було названо A50926, в *N. coxensis*, створено надпродуцентів цього ГПА, а також продуцента A40926 на основі *N. coxensis*.

Результати, отримані в п'ятому розділі роботи, поглиблюють уявлення про представників роду *Nonomuraea* як про продуцентів ГПА і створюють передумови для подальшого вивчення бактерій цього роду з метою пошуку нових ГПА, а також використання вже відомих продуцентів ГПА для комбінаторного біосинтезу нових похідних.

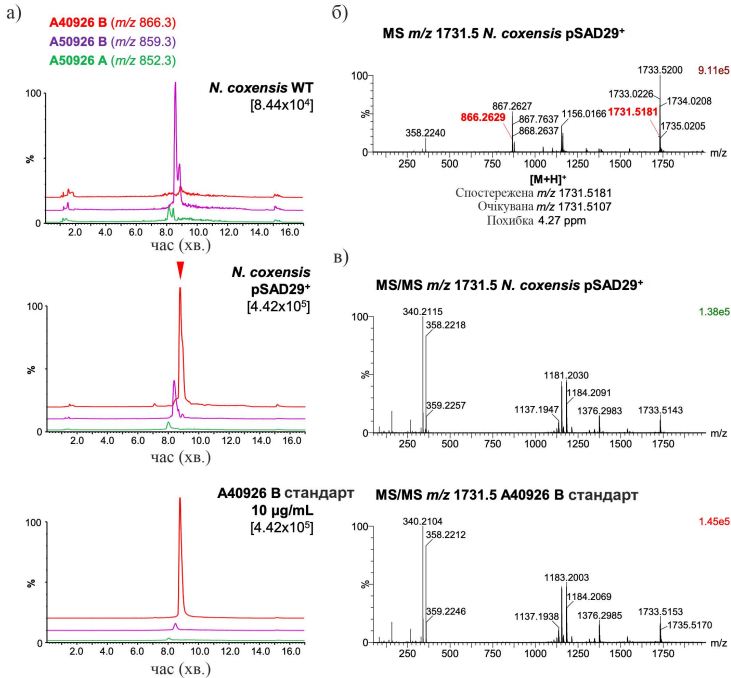


Рис. 8. Підтвердження продукції A40926 в *N. coxensis* pSAD29⁺ за допомогою VEPX (а), VEPX-МС (б) і МС/МС (в).

В шостому розділі роботи вивчали особливості порівняльної філогеноміки кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Досліджені в попередньому розділі A40926 і A50926 є типовими ГПА типу IV, що, як і представники типів I-III, активні проти Грам-позитивних бактерій шляхом зв'язування ліпиду II. На противагу, нещодавно було виявлено, що ГПА типу V, такі як комплестатин, мають іншу мішень дії, а саме автолізини – ферменти утилізації компонентів клітинної стінки Грам-позитивних бактерій. На відміну від ГПА інших типів, КБГ ГПА типу V зустрічаються майже виключно в представників роду *Streptomyces*.

Прототипом ГПА типу V є комплестатин. На даний момент різноманітність типу V є вивченою недостатньо. Порівнявши 17 модельних КБГ ГПА (включно із КБГ біосинтезу комплестатину – *com*), виявлено, що гени *com* є зовнішньою групою для всіх інших генів біосинтезу ГПА, даючи змогу ствердити, що КБГ ГПА типу V еволюційно відмежовані від КБГ ГПА типів I-IV. Далі проаналізовано 2664 геномів стрептоміцетів в пошуках

КБГ, подібних на КБГ комплестатину, за допомогою Multi Gene Blast та виявлено такі КБГ в 53 геномах. Більше детальний аналіз дав змогу отримати 33 повні послідовності таких КБГ. Створено мультилокусну філогенію 33 віднайдених КБГ і виявлено 5 окремих клад. КБГ в межах однієї класи мали однакову генетичну організацію. Моделювання *in silico* біосинтетичних шляхів, кодованих в знайдених КБГ, дозволило припустити, що КБГ класи V кодують біосинтез комплестатину, класи IV і II – гіпотетичного *N*-малоніл-норкомплестатину, класи III – норкомплестатину, а класи I – *N*-ацетил-норкомплестатину.

Отримані у шостому розділі результати вказують на стрептоміцетів як на джерело нових ГПА антибіотиків типу V, подібних до комплестатину.

У сьомому розділі роботи характеризували механізми регуляції продукції антибіотиків в *Streptomyces cyanogenus* S136 – моделі активації мовчазних кластерів біосинтетичних генів. У розділі шість нами наведено докази того, що стрептоміцети є потенційно багатим джерелом ГПА типу V, подібних до комплестатину. Але ці антибіотики досі не були описані, даючи змогу припустити, що знайдені КБГ є мовчазними. КБГ актиноміцетів залишаються мовчазними із різних причин, зокрема через низьку або відсутню транскрипцію відповідних генів. Відповідно, необхідно вивчати підходи до активації мовчазних КБГ.

S. cyanogenus S136 є продуцентом перспективного протиракового полікетидного антибіотика ландоміцину А (КБГ – *lan*). *S. cyanogenus* привабив нас як модель вивчення мовчазних КБГ із низки причин: (1) даний штам є доступним для генно-інженерних маніпуляцій, він невибагливий до умов культивування та швидко росте; (2) попередні роботи давали певні натяки, що цей штам здатний продукувати певні вторинні метаболіти, крім ландоміцинів; (3) нарешті, штам *S. cyanogenus* S136 дикого типу не здатний до споруючості, що може свідчити про зміни в глобальних регуляторних механізмах біосинтезу антибіотиків і морфогенезу.

Цільовим знаряддям, роль якого для активації продукції антибіотиків у *S. cyanogenus* вивчалася, став глобальний позитивний регуляторний ген *adpA*. Ми припустили, що надекспресія такого транскрипційного фактора може привести до зв'язування з численними (ймовірно, неспецифічними за фізіологічних умов) ділянками хромосоми, впливаючи на експресію багатьох генів і оперонів.

Щоби отримати уявлення, які саме КБГ несе хромосома *S. cyanogenus* S136, секвеновано геном цього штаму. Секвенування генома здійснено за допомогою комбінації Illumina HiSeq і Oxford Nanopore Technologies (ONT)

GridION. Отримана послідовність репрезентувала лінійну хромосому розміром 8773899 п.н., на якій було анотовано 7700 генів, з яких: 7590 потенційно кодують білки, 91 ген тРНК, 1 ген транспортно-матричної РНК і 6 оперонів генів 16S-5S-23S рибосомних РНК. Усереднений ГЦ склад генома становить 71,8%. Отриману послідовність проаналізували за допомогою antiSMASH 5.0. Було ідентифіковано 41 КБГ для різноманітних вторинних метаболітів (включно із *lan*).

В геномі *S. cyanogenus* S136 ідентифіковано ортолог AdpA (названий AdpA_{scy}), а в нуклеотидній послідовності *lan* виявлено потенційні сайти зв'язування для AdpA на відстані 9 п.н. від старт-кодону гена *lanX* (кодує ацил-КоА мутазу), а також на відстані 1000 і 800 п.н. від 5'-кінця гена *lanI*, який кодує ключовий шлях-специфічний активатор транскрипції всіх структурних генів *lan*. Це дає змогу припустити, що експресія *lan*-генів може контролюватися за допомогою AdpA. Властивості *adpA*_{scy} дослідили *in vivo* та *in silico*, виявивши, що білок неактивний.

Наявність кількох операторних ділянок для AdpA в КБГ *lan* (див. вище) дала нам змогу припустити, що цей транскрипційний фактор був частиною регуляторної мережі біосинтезу ландоміцину А до того, як втратив свою функціональність. Якщо так, то гетерологічні гени *adpA* можуть впливати на морфогенез *S. cyanogenus* і продукцію антибіотиків. Тому, ряд *adpA*-генів з добре вивчених видів *Streptomyces*, зокрема *S. coelicolor* M145, *S. ghanaensis* (= *viridosporus*) ATCC 14672, *S. clavuligerus* ATCC 27064 і *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 надекспресовано в *S. cyanogenus* S136.

Виявилося, що гетерологічні *adpA*-гени справляли позитивний вплив на продукцію ландоміцину А в *S. cyanogenus*. А саме, штами накопичували більше ландоміцину А на різних агаризованих середовищах (Рис. 9а).

У рідкому середовищі SG рекомбінантні штами продукували до 250 мг/л ландоміцину А, тоді як рівень продукції антибіотика в штамі дикого типу був прибіл. у 6 разів нижчий. У мінімальному середовищі ISP51 продукція ландоміцину А рекомбінантними штамами становила в середньому 275 мг/л, що перевищувало продукцію дикого типу більше ніж у 15 разів (Рис. 9б). Також виявилося, що продукція ландоміцину А рекомбінантними штамами індукується за умов, коли дикий тип не здатний продукувати цей антибіотик, зокрема за умов культивування в рідкому середовищі TSB.

Щоби чітко прослідкувати зв'язок між фенотипами та експресією генів, проаналізовано експресію гена *lanI*, а також деяких інших генів з КБГ *lan* (зокрема, *lanA*, *lanJ* і *lanG*), у *S. cyanogenus* S136 і *S. cyanogenus* pGM4181⁺

(рекомбінантний штам із надекспресією гена *adpA* з *S. albus* J1074) вирощених у середовищах TSB та SG протягом 45 год за допомогою ЗТ-ПЛР. Виявлено, що у випадку SG, *lanI* експресувався сильніше в *S. cyanogenus* pGM4181⁺; відповідно, експресія структурних генів *lan* була помітно вищою. За умов культивування в середовищі TSB, не виявлено експресії генів *lanI*, *lanA*, *lanJ*, *lanG* у *S. cyanogenus* S136, тоді як ці гени активно експресувалися в *S. cyanogenus* pGM4181⁺ за тих же умов культивування (Рис. 9в).

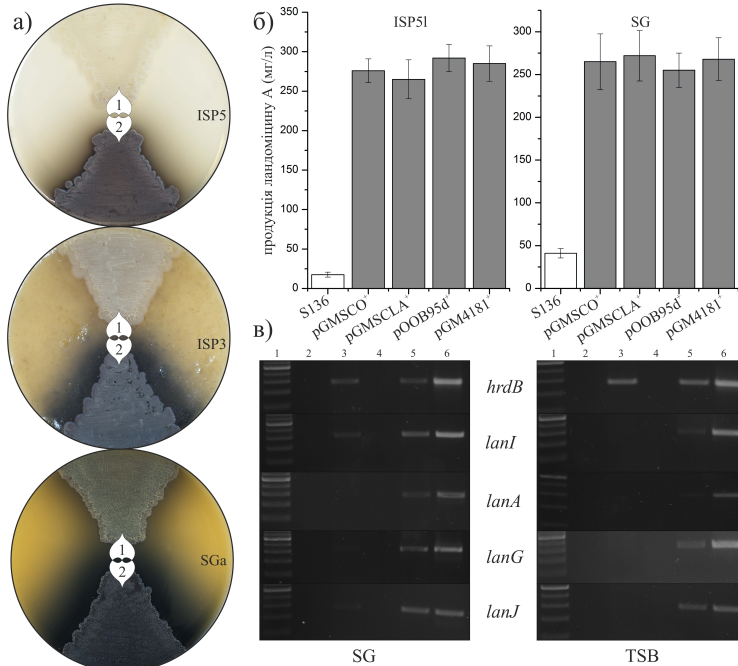


Рис. 9. Експресія гетерологічних алелів *adpA* веде до надпродукції ландоміцину А в *S. cyanogenus* за умов вирощування на агаризованих (**а**, 1 – S136, 2 – S136 pGM4181⁺) і в рідких середовищах (**б**), а також до активації експресії *lan* генів (і продукції ландоміцину А) в рідкому середовищі TSB (**в**, 1 – GeneRuler DNA Ladder Mix; 2 – сумарна (с) РНК S136; 3 – комплементарна (к) ДНК з сРНК S136, 4 – сРНК S136 pGM4181⁺, 5 – кДНК з сРНК S136 pGM4181⁺, 6 – хромосомна ДНК S136).

Отримані результати демонструють, що функціональні алелі *adpA*, які походять з гетерологічних господарів, є цінними знаряддями для

підвищення рівнів продукції ландоміцину А в *S. cyanogenus*. Що більш важливо, відбувається AdpA-опосередкована активація продукції антибіотика за умов, в яких дикий тип до продукції не здатний. Це говорить на користь використання поточного підходу для активації мовчазних КБГ.

Далі вивчали вплив надекспресії алелів *adpA* на інші компоненти вторинного метаболізму *S. cyanogenus*. Для цього гетерологічний алель *adpA* з *S. albus* (= *albido flavus*) J1074 надекспресували в *S. cyanogenus* Δ lanI7 (штам не здатний до продукції ландоміцину внаслідок нокауту гена шлях-специфічного регулятора LanI), отримавши рекомбінантні штами *S. cyanogenus* Δ lanI7 pGM4181d⁺ (надекспресує ділянку *adpA* *S. albus*, що кодує ДНК-зв'язувальний домен) і Δ lanI7 pGM4181⁺. Виявилося, що *S. cyanogenus* Δ lanI7 pGM4181⁺, але не pGM4181d⁺, накопичує меланоїдні пігменти при вирощуванні на середовищі TSA або в середовищі TSB (Рис. 10а). Додатково, помітна активність проти Грам-позитивних бактерій з'являлася у *S. cyanogenus* Δ lanI7 pGM4181⁺ і pGM4181d⁺ (Рис. 10б), а в Δ lanI7 pGM4181⁺ – активація протигрибкової активності (Рис. 10в).

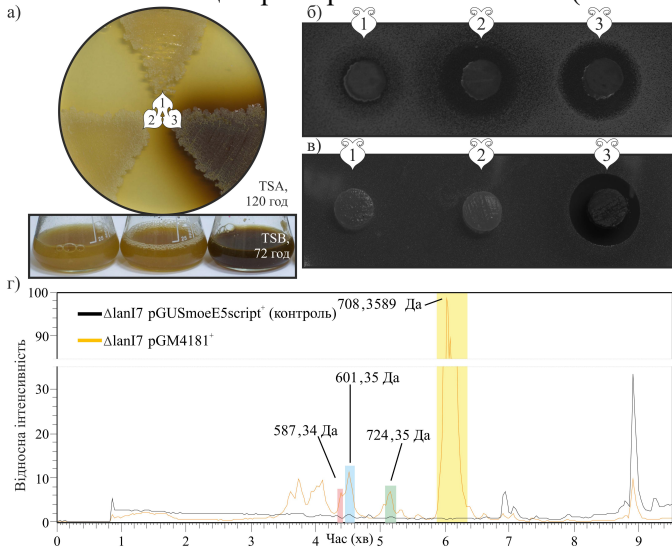


Рис. 10. Експресія гетерологічного алелю *adpA* активує вторинний метаболізм *S. cyanogenus* Δ lanI7 (1) ведучи до продукції меланоїдних пігментів (а), появи нових антибіотичних властивостей проти *B. subtilis* (б) і *D. hansenii* (в), а також до появи нових мас-пиків на ВЕРХ-МС хроматограмах екстрактів продукційних культур *S. cyanogenus* Δ lanI7 pGM4181⁺ (г) (1 – Δ lanI7; 2 – Δ lanI7 pGM4181d⁺; 3 – Δ lanI7 pGM4181⁺).

Далі вирощували $\Delta lanI7$ та його похідне $pGM4181^+$ у рідкому середовищі YMPG і аналізували метанольні екстракти з біомаси та супернатанту за допомогою ВЕРХ-МС; те саме було зроблено для дикого типу (S136) та його похідного, що несе $pGM4181$. Піки ландоміцину А та його попередників домінували на хроматограмах екстрактів S136 і $S136 pGM4181^+$; не було виявлено якісних відмінностей між хроматограмами ВЕРХ цих штамів. Натомість, принаймні чотири нові мас-піки з'явилися на хроматограмах екстрактів $\Delta lanI7 pGM4181^+$ (Рис. 10г). Значення m/z , що відповідають менш інтенсивним мас-пікам, не мали збігів у базах даних природних сполук. Однак, молекулярна маса найбільш помітного «активованого» іонного піку ($[M+H]^+=708,35$ Да) збігалася з молекулярною масою протигрибкового полієну люцензоміцину. Подальший аналіз за допомогою МС/МС виявив фрагментаційний спектр, що повністю співпадає зі структурою люцензоміцину.

Здійснений у цьому розділі аналіз генома *S. cyanogenus* продемонстрував, що один з потенційних КБГ має значну подібність до КБГ полікетиду І-го типу пімарицину (також відомого як натаміцин) (*pim*). Оскільки люцензоміцин і пімарицин є структурними гомологами, висунуто припущення, що активація цього конкретного КБГ веде до накопичення люцензоміцину в *S. cyanogenus* $\Delta lanI7 pGM4181^+$ і $pGM4181d^+$. Цей КБГ отримав назву *lcm*, а переанотована вручну послідовність цього КБГ була задепонована в GenBank під номером MW175861 (Рис. 11а). Всього, в межах *lcm* анотовано 19 ORF, серед яких 18 виявили схожість з генами, знайденими в інших КБГ полієнових антибіотиків. Користуючись наявними відомостями про біосинтез пімарицину та структурною подібністю між ним і люцензоміцином, реконструювали біосинтетичний каскад люцензоміцину (Рис. 11б і в).

Для кращого розуміння механізму $\Delta prfA$ -опосередкованої активації біосинтезу люцензоміцину, проаналізували транскрипцію вибраних *lcm* генів у штамх *S. cyanogenus* S136, $S136 pGM4181^+$, $\Delta lanI7$ і $\Delta lanI7 pGM4181^+$ за допомогою ЗТ-ПЛР. Вибрані гени кодуєть ГТФ-D-манозо 4,6-дегідратазу (*lcm2*), монооксигеназу (*lcm6*), АВС-транспортер (*lcm8*), холестерол оксидаза (*lcm11*), ключовий шлях-специфічний регулятор (*lcmRIII*) і ПКС (*lcmC*). Спочатку перевірили експресію обраних *lcm* генів в культурах *S. cyanogenus* $\Delta lanI7$ і *S. cyanogenus* $\Delta lanI7 pGM4181^+$, вирощених у середовищі YMPG протягом 72 год. *lcm* транскрипти були відсутніми в *S. cyanogenus* $\Delta lanI7$, але присутніми в штамі $\Delta lanI7 pGM4181^+$ (Рис. 12).

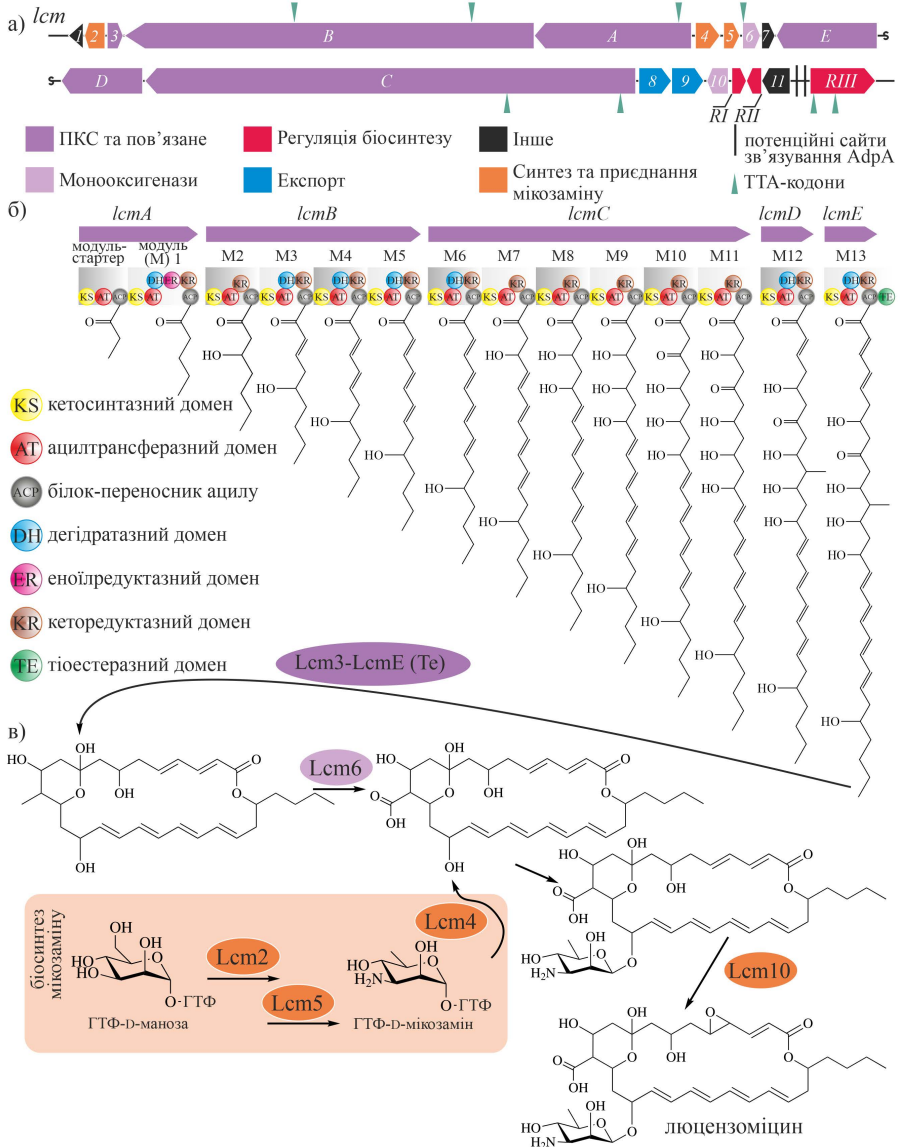


Рис. 11. Генетична організація кластера генів біосинтезу люцензоміцину (а) і реконструкція біосинтетичного шляху люцензоміцину: (б) – збирання аглікону та (в) – завершальні модифікації.

Далі проаналізували біосинтез люцензоміцину та експресію *lcm* генів у штамів-продуцентів ландоміцину *A. S. cyanogenus* S136 та S136 pGM4181⁺, культивованих протягом 72 год у середовищі SG (оптимальному для продукції ландоміцину А) і YMPG (оптимальному для продукції люцензоміцину). Не виявлено ознак накопичення люцензоміцину в S136 при культивуванні на агаризованих середовищах SG і YMPG, але слабка протигрибкова активність виявлена у випадку S136 pGM4181⁺, вирощеного на YMPG. Хоча й продукцію люцензоміцину в культурах S136 pGM4181⁺ у SG неможливо виявити за допомогою тестів пригнічення росту *D. hansenii*, *lcm* гени за цих умов експресувалися (Рис. 12).

Отже, у дикому типі (S136) AdpA посилює експресію генів як люцензоміцину, так і ландоміцину А, хоча і продукція люцензоміцину спостерігається лише в кількостях достатніх для детекції методом ВЕРХ-МС, але не методом пригнічення росту *D. hansenii*. Якщо інактивувати шлях біосинтезу ландоміцину А (штам Δ lanI7), надекспресія *adpA* веде до інтенсивної продукції люцензоміцину.

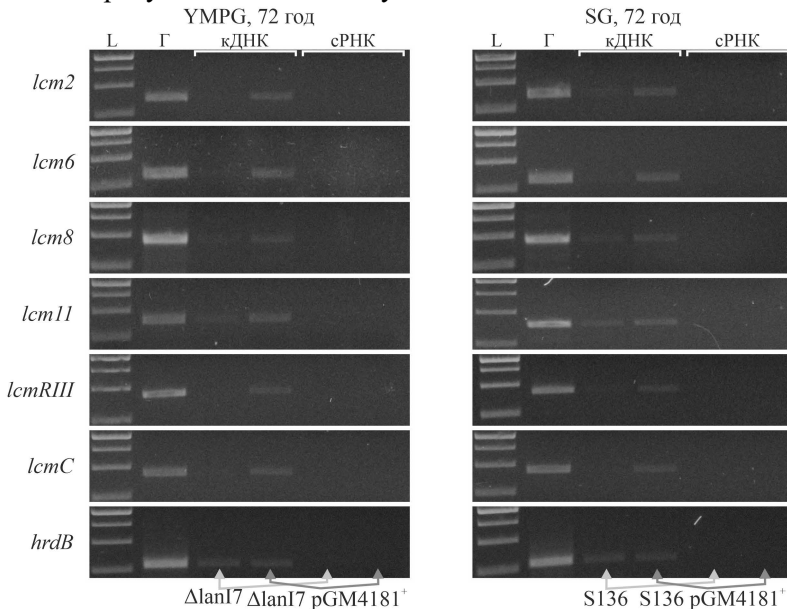


Рис. 12. 3Т-ПЛР аналіз транскрипції вибраних *lcm* генів і *hrdB*, в штамх *S. cyanogenus* Δ lanI7, Δ lanI7 pGM4181⁺, S136, S136 pGM4181⁺ вирощених в середовищах YMPG і SG протягом 72 год (L – 1 kb DNA Ladder; Г – хромосомна ДНК).

Наведені вище результати демонструють, що *AdpA* необхідний для експресії генів *lcm* і продукції люцензоміцину в *S. cyanogenus*. Цікаво було встановити генетичні фактори, які опосередковують такий регуляторний вплив. Кластер *lcm* містить три гени для шлях-специфічних транскрипційних регуляторів: *lcmRI*, *lcmRII* і *lcmRIII*. *LcmRI*. Два суміжних сайти зв'язування *AdpA* (TGGCGGAAAC, TGGCCGATAG; $p < 10^{-4}$) знайдено в ділянці промотора гена *lcmRIII*. Це, разом з даними про транскрипційну активність генів *lcm* (див. вище), свідчить про *AdpA*-опосередковану активацію експресії *lcmRIII*, що веде до активації *lcm* генів.

Для уточнення ролі шлях-специфічних регуляторних генів з *lcm* КБГ, кожен із них індивідуально надекспресували під контролем *ermEp* у *S. cyanogenus* Δ lanI7 і визначили рівні продукції люцензоміцину в рекомбінантних штаммах. Активація продукції люцензоміцину спостерігалася в рекомбінантних *S. cyanogenus* Δ lanI7 *lcmRIII*⁺ та *lcmRII*⁺, але не в *S. cyanogenus* Δ lanI7 *lcmRI*⁺. Це дало змогу припустити, що *AdpA* не має мішеней у КБГ *lcm*, окрім *lcmRII* і *lcmRIII*. Ген *lcmRI*, ймовірно, кодує нефункціональний паралог *lcmRII*.

У підсумку, отримані у цьому розділі результати, показують, що різні алелі гена *adpA* є ефективним знаряддям для активації мовчазних КБГ антибіотиків у *S. cyanogenus* S136, а, ймовірно, і в інших стрептоміцетів. Зокрема, вдалося активувати мовчазний КБГ полікетидного антибіотика люцензоміцину. Хоча сам антибіотик є відомим, нами вперше ідентифіковано відповідний КБГ та повністю охарактеризовано шлях біосинтезу люцензоміцину.

У восьмому розділі роботи дається характеристика генам стійкості до глікопептидних антибіотиків в бактерій. Згідно із даними літератури, гени стійкості до ГПА у актиноміцетів-продуцентів, ймовірно, є джерелом генів стійкості у патогенів. Тому, важливо вивчати особливості функціонування генів стійкості до ГПА у модельних продуцентів ГПА, для того щоб мати змогу робити прогнози про механізми стійкості до ГПА у патогенних бактерій. Нажаль, прикладів повного вивчення регуляторних механізмів експресії генів стійкості до ГПА недостатньо.

Відповідно, нас зацікавило створення детальної моделі функціонування генів стійкості до ГПА (або *van* генів) у модельного продуцента клінічно-важливого ГПА тейкопланіну – *A. teichomyceticus* ATCC 31121. Відомо, що *A. teichomyceticus* ATCC 31121 містить гени *vanHAX* (*tei7-6-5*) та *vanRS* (*tei2-3*) колокалізовані та розташовані в КБГ. На даний момент, функції цих генів вивчені недостатньо: існують дані, що

принаймні *tei7-6-5* формують один оперон, а стосовно сенсорної гістидинової кінази *Tei3* припускається, що вона може функціонувати конститутивно і не потребувати ліганда для активації *vanHAX*. Тому, в цьому розділі роботи, спочатку перевірили транскрипційну організацію *van* генів в *A. teichomyceticus*, та виявили, що *tei2-3* (ортологи *vanRS*) транскрибуються спільно з *tei4*, який кодує потенційну дигідрофолатредуктазу (що, скоріше за все, не впливає на стійкість до ГПА). Також, підтверджено, що гени *tei7-6-5* (ортологи *vanHAX*) котранскрибуються, але *tei8* (кодує потенційний MurF-подібний білок) становить окрему транскрипційну одиницю. Подібно до *Am. balhimycina*, експресія генів *tei2-3* і *tei7-6-5* виявилася конститутивною і не залежала від фази росту чи середовища культивування. Важливо, що експресія *van* генів виявилася незалежною і від шлях-специфічного регулятора біосинтезу тейкопланіну *Tei15**. Реконструкція регуляторної ланки *Tei15* → tei2-3* у *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 продемонструвала, що промотор *tei2*, найімовірніше, не залежить від регуляторного впливу *Tei15**. Також, промотори генів *tei2-3-4* і *tei7-6-5* виявилися дуже активними в клітинах *A. teichomyceticus* ATCC 31121, а для *Tei2 in vivo* показано зв'язування з *tei7p*.

Із літератури відомо, що в *S. coelicolor* A3(2) певні мутації в АТФазному домені *VanS_{sc}* ведуть до конститутивної кіназної активності. Порівнявши послідовностей *Tei3* і *VanS_{sc}* виявлено, що аналогічні точкові мутації також присутні в АТФ-азному домені *Tei3*. Тому, нами було прийнято рішення здійснити експериментальну перевірку припущення, що *Tei3* функціонує конститутивно. Для цього реконструювали *Tei3*-опосередкований шлях стійкості до ГПА в гетерологічній системі *S. coelicolor* M512 і отримали *in vivo* докази того, що *Tei3* функціонує як конститутивна сенсорна кіназа. Примітно, що *Tei3* зміг активувати резистентність до тейкопланіну та A40926 у *S. coelicolor*, ймовірно, шляхом фосфорилування неспорідненого регулятора відповіді – *VanR_{sc}*. Враховуючи те, що АТФ-азні домени *Tei3* і *VanS_{sc}* значно відрізняються й окрім згаданих вище замін, припускаємо, що конститутивна кіназна активність, скоріше, є наслідком значної еволюційної дивергенції цих білків, а не лише декількох замін. Експресія вкорочених варіантів *tei3* та *vanS_{sc}*, у яких відсутні сенсорні домени, продемонструвала, що окремих АТФазних доменів недостатньо для надання стійкості до ГПА.

Найбільш важливим отриманим результатом роботи було те, що сенсорний домен *Tei3* не реагував на тейкопланін, але розпізнавав A40926:

експресія гібридної сенсорної кінази, що несе сенсорний домен Tei3, злитий з АТФазним доменом VanS_{Sc}, змінила конститутивний фенотип резистентності до ГПА в *S. coelicolor* J3200, зробивши штам чутливим до тейкопланіну та ванкоміцину, але стійким до A40926. Реконструкція філогенії глікозилтрансфераз, закодованих у відомих КБГ ГПА, дала змогу зробити припущення, що б пояснювало отримані результати. Зокрема виявилось, що предковий КБГ до *tei*, найімовірніше, кодував біосинтез дез-GlcNAc-тейкопланіну, який структурно нагадує A40926 (що виявився субстратом сенсорного домена Tei3). Скоріше за все, що Tei3 у продуценті дез-GlcNAc-тейкопланіну стала неіндуцибельною внаслідок випадкової мутації, відповідно давши КБГ простір для подальшої еволюції та структурних змін продукованого ГПА. Відповідно, мутації, що ведуть до неіндуцибельності Tei3, стали преадаптацією, яка дала змогу тейкопланіну з'явитися в його нинішній формі.

Отримані результати дають змогу створити модель функціонування генів стійкості до ГПА в *A. teichomyceticus* (Рис. 12). Ці гени згруповані у два оперони: *tei2-3-4* (ортологи *vanRS* + ген дигідрофолат редуктази) і *tei7-6-5* (ортологи *vanHAX*). Експресія обох оперонів протягом всього життєвого циклу рівномірно забезпечена сильними і конститутивними промоторами, незалежними від шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну, а Tei2 розпізнає промотор *tei7p*. Сенсорна гістидинова кіназа Tei3 володіє конститутивною фосфорилазною активністю, а її сенсорний домен розпізнає не тейкопланін, а споріднений ГПА A40926.

Важливо відмітити і декілька практично-цінних результатів, отриманих у цьому розділі. Зокрема, охарактеризовано промотори *tei2p* і *tei7p* як потенційні інструменти для надекспресії генів в *A. teichomyceticus*. Іншим важливим результатом стало створення тест-системи на основі *S. coelicolor*, здатної до виявлення ванкоміцину в нг-діапазоні.

Гени стійкості до ГПА зустрічаються не тільки в продуцентів ГПА, а й в актиноміцетів, не здатних до продукції ГПА. Останній випадок (наприклад *S. coelicolor*) розглядався як виняток, і було незрозумілим, для чого цьому організму необхідні гени стійкості до ГПА. Тому, досліджено розповсюдження і еволюція генів стійкості до ГПА серед всіх актинобактерій. Проаналізовано 7108 геномів актинобактерій, де виявлено, що *van* гени зустрічаються з частотою приблизно 13% – знайдені принаймні в 900 геномах *Actinobacteria*; при цьому, КБГ ГПА типів I-IV – стійкість до яких забезпечують *van* гени – знайдено лише в 39 геномах. Подальший скринінг вже геномів всіх бактерій, доступних в базі даних GenBank на 2022

рік, виявив, що гени стійкості до ГПА поширилися з актинобактерій до представників класів Грам-позитивних бактерій *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia* і *Ktedonobacteria*, а також до представників Грам-негативних бактерій – класу *Anaerolineae*. Аналізуючи філогенію цих генів, описано ряд ймовірних подій горизонтального генного переносу, а також побудовано картину потенційних шляхів розповсюдження генів стійкості до ГПА серед бактерій.

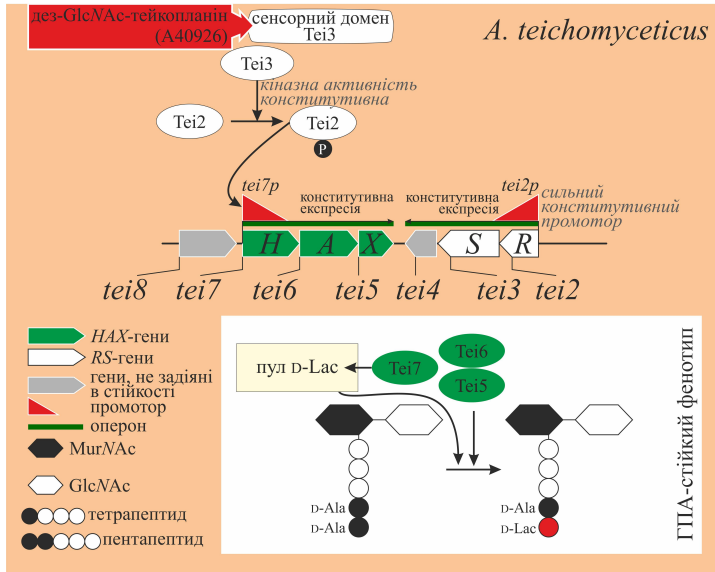


Рис. 12. Модель функціонування генів стійкості до ГПА в *A. teichomyceticus*

Отримані в цьому розділі результати демонструють, що *van* гени з бактерій типу *Actinobacteria* є цікавою та розповсюдженою частиною мобілому *Terrabacteria*. Перенесення *van* генів є активним процесом, який іде в реальному часі. Прикладом цього є результати проведеного філогенетичного аналізу стосовно ктедонобактерій. *Van* гени переносяться різними носіями з одного таксону бактерій до іншого, і назад, створюючи складну мережу послідовних подій ГТТ. Бактерії з класів *Bacilli* і *Clostridia*, схоже, служать джерелом *van* генів для представників класів *Anaerolineae* і *Erysipelotrichia*. В підсумку, наші результати створюють загальну картину розповсюдження *van* генів, намічають шляхи до подальшого експериментального вивчення цієї проблеми і полегшують нагляд за розповсюдженням генів стійкості до глікопептидів.

ВИСНОВКИ

Отримані в роботі результати дозволяють вирішувати нагальні проблеми пошуку і створення антибіотиків нового покоління та нових механізмів генетичної детермінації синтезу антибіотиків. У результаті проведеної роботи за допомогою методів молекулярної генетики, геноміки і біоінформатики встановлено взаємозв'язки між організацією і експресією структурних генів, генів плейотропних і шлях-специфічних регуляторів, та біосинтезом антибіотиків. На підставі глобального філогеномного аналізу геномів бактерій, доступних в базі даних GenBank, встановлено закономірності поширення і еволюції генів стійкості до глікопептидних антибіотиків. Розроблено підходи до активації мовчазного вторинного метаболізму актиноміцетів із використанням генів плейотропних регуляторів. Оптимізовано методи перенесення плазмідної ДНК і надекспресії генів у актиноміцетів-продуцентів пептидних і полікетидних антибіотиків. В ході роботи отримано надпродуцентів клінічно-важливого антибіотика A40926, перспективного протиракового антибіотика ландоміцину А, а також відкрито новий глікопептидний антибіотик.

1. Представників ортологічної групи AdpA-регуляторів знайдено в 91 геномі стрептоміцетів, вказуючи на важливість відповідних генів для біології цих бактерій. Двох-доменна архітектура AdpA, ймовірно, постала внаслідок злиття двох окремих генів, кожен із яких кодував білок із функціями окремих доменів: GATase-1-подібного N-термінального і ДНК-зв'язувального доменів. Експресія окремого ДНК-зв'язувального домена AdpA здатна компенсувати відсутність повного білка.

2. У *S. albus* (= *albidoflavus*) J1074 відсутність гена *bldA* (і як наслідок правильної експресії *adpA*) сповільнює морфологічну диференціацію і призводить до зменшення продукції вторинних метаболітів. тРНК^{ЛЕЙ}_{UAA} (кодована *bldA*) в процесі дозрівання модифікується ферментами MiaA і MiaB, гени яких є описаними вперше компонентами *adpA*-опосередкованого регуляторного каскаду.

3. Плазмідні на основі систем інтеграції фагів ϕ C31, ϕ BT1, VWB1, і pSG5-реплікона можна із високою частотою переносити в клітини *A. rectilineatus* NRRL B-16090, *S. roseochromogenes* NRRL 3504, *N. coxensis* DSM 45129, за допомогою кон'югації з *E. coli*, використовуючи спори цих штамів актиноміцетів як реципієнти. Гетерологічні промотори *aac(3)IVp*, *moeE5p* і *tei2p* є ефективними

знаряддями для надекспресії генів в NRRL B-16090. Вектор pGCymRP21 є ефективною платформою для експресії генів в NRRL 3504: надекспресія генів шлях-специфічних регуляторів хлоробіоцину і новобіоцину із використанням pGCymRP21 привела до збільшення рівня продукції хлоробіоцину.

4. У продуцента глікопептидного антибіотика A40926 *N. gerenzanensis* ATCC 39727 найактивнішим конститутивним промотором є *aac(3)IVp*. Надекспресія генів шлях-специфічних регуляторів біосинтезу A40926 *dbv3* і *dbv4* за допомогою *aac(3)IVp* веде до зростання продукції A40926 рекомбінантними штамми.

5. Секвеновано геном *N. coxensis* DSM 45129. Цей штам здатний до продукції досі не описаного глікопептидного антибіотика, названого A50926; відповідний кластер генів біосинтезу – названий *nos* – анотовано і охарактеризовано. A50926 подібний за структурою до A40926, однак містить некарбоксильований GlcN-ацильний залишок, приєднаний до 4 амінокислоти аглікона. Гетерологічні регулятори *dbv3* і *dbv4* збільшують рівень продукції A50926, а експресія гена гексозооксидази *dbv29* веде до продукції A40926 в DSM 45129.

6. Кластери біосинтетичних генів, подібні до кластера генів біосинтезу глікопептидного антибіотика типу V комплестатину поширені в стрептоміцетів і можуть кодувати біосинтез норкомплестатину, *N*-малоніл-норкомплестатину і *N*-ацетил-норкомплестатину.

7. Секвеновано геном продуцента ландоміцину A *S. cyanogenus* S136. *adpA* алель S136 нефункціональний, тоді як експресія гетерологічних алелів *adpA* веде до багатократного зростання продукції ландоміцину A в S136. Експресія гетерологічних алелів *adpA* веде до активації біосинтезу полієнового полікетиду люцензоміцину, а його КБГ – названий *lcm* – описано і охарактеризовано. Активация *lcm* опосередкована активністю генів шлях-специфічних регуляторів *lcmRII* і *lcmRIII*.

8. Вивчено механізми стійкості до тейкопланіну в продуцента *A. teichomyceticus* ATCC 31121. Висока стійкість ATCC 31121 до власного продукту забезпечена комбінацією факторів: конститутивною експресією оперонів стійкості *tei7-6-5* і *tei2-3*, незалежною від шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну; високою активністю промоторів *tei2p* і *tei7p*; конститутивною фосфорилазною активністю

Tei3. Сенсорний домен Tei3 не здатний розпізнавати тейкопланін, але реагує на споріднений ГПА A40926.

9. Гени стійкості до ГПА – *van*-гени – поширені в актинобактерій, які є їх природним резервуаром. Аналіз філогенії і розповсюдження *van*-генів актинобактерій демонструє, що присутність цих генів не корелює з присутністю КБГ ГПА, а самі ці гени є преадаптацією для отримання КБГ шляхом горизонтального генного переносу. За межами актинобактерій *van* гени поширилися до класів Грам-позитивних бактерій *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia* і *Ktedonobacteria*, а також до Грам-негативних бактерій – класу *Anaerolineae*.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, що розкривають основні наукові результати дисертації:

1. **Yushchuk O.** Zhukrovska K, Ostash B, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Heterologous expression reveals ancient properties of Tei3 – a VanS ortholog from the teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. International journal of molecular sciences 23(24):15713. <https://doi.org/10.3390/ijms232415713> [IF 6,208; SCOPUS, WoS; SCImago Q2 – 2022 Molecular biology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
2. **Yushchuk O.** Ostash B (2022) Glycopeptide antibiotics: genetics, chemistry, and new screening approaches. In: Rai, R.V., Bai, J.A. (eds.) Natural products from Actinomycetes. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_16 [розділ монографії] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, написання розділу, створення ілюстрацій, підготовка розділу до друку*).
3. **Ющук О.** Жукровська К, Федоренко В (2022) Філогенія білків-експортерів глікопептидних і деяких споріднених антибіотиків. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 86:33-46. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2022.86.03> [фахове видання України] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
4. **Yushchuk O.** Zhukrovska K, Berini F, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Genetics behind the glycosylation patterns in the biosynthesis of dalbaheptides. Frontiers in chemistry 10:858708. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.858708> [IF 5,545; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2022 Chemistry] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання огляду, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).
5. **Ющук О.** Жукровська К, Федоренко В (2022) Поширення кластерів генів біосинтезу комлестатину та подібних сполук у представників роду *Streptomyces*. Фактори експериментальної еволюції організмів 30:133-140. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1474> [фахове видання України] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг*

геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

6. **Yushchuk O**, Binda E, Fedorenko V, Marinelli F (2022) Occurrence of *vanHAX* and related genes beyond the *Actinobacteria* phylum. *Genes* 13(11):1960. <https://doi.org/10.3390/genes13111960> [IF 4,141; SCOPUS, WoS; SCImago **Q2** – 2022 Genetics] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).
7. Melnyk S, Stepanyshyn A, **Yushchuk O**, Mandler M, Ostash I, Koshla O, Fedorenko V, Kahne D, Ostash B (2022) Genetic approaches to improve clorobiocin production in *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. *Applied microbiology and biotechnology* 106(4):1543–1556. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11814-4> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2022 Applied Microbiology and Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: участь в концептуалізації, розробка методики перенесення плазмід в NRRL 3504, аналіз продукції хлоробіоцину в рекомбінантних штамі, аналіз результатів ВЕРХ, написання рукопису та підготовка статті до друку).
8. Andreo-Vidal A, Binda E, Fedorenko V, Marinelli F, **Yushchuk O** (2021) Genomic insights into the distribution and phylogeny of glycopeptide resistance determinants within the *Actinobacteria* phylum. *Antibiotics* (Basel, Switzerland) 10(12):1533. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121533> [IF 5,222; SCOPUS, WoS; SCImago **Q2** – 2021 Infectious Diseases] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, скринінг геномів і біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).
9. Hrab P, Rückert C, Busche T, Ostash I, Kalinowski J, Fedorenko V, **Yushchuk O**, Ostash B (2021) Complete genome sequence of *Streptomyces cyanogenus* S136, producer of anticancer angucycline landomycin A. *3 Biotech* 11(6):282. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02834-4> [IF 2,893; SCOPUS, WoS; SCImago **Q2** – 2021 Biotechnology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація і планування дослідження, верифікація результатів аналізу *in silico*, участь в підготовці рукопису до друку).
10. **Yushchuk O**, Vior NM, Andreo-Vidal A, Berini F, Rückert C, Busche T, Binda E, Kalinowski J, Truman AW, Marinelli F (2021) Genomic-led discovery of a novel glycopeptide antibiotic by *Nonomuraea coxensis* DSM 45129. *ACS Chemical Biology* 16(5):915–928.

- <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00170> [IF 4,634; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2021 Biochemistry] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз in silico, характеристика кластера, виконання всіх генно-інженерних робіт, пошук оптимальних умов культивування DSM 45129 для продукції антибіотика, ферментація DSM 45129 і похідних, аналіз і інтерпретація даних ВЕРХ, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
11. **Yushchuk O**, Ostash I, Mösker E, Vlasiuk I, Deneka M, Rückert C, Busche T, Fedorenko V, Kalinowski J, Süssmuth RD, Ostash B (2021) Eliciting the silent lucensomycin biosynthetic pathway in *Streptomyces cyanogenus* S136 via manipulation of the global regulatory gene *adpA*. Scientific reports 11(1):3507. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82934-6> [IF 4,996; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2021 Multidisciplinary] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз in silico, характеристика кластера, виконання всіх генно-інженерних робіт і аналізу отриманих рекомбінантів, пошук оптимальних умов культивування для продукції люцензоміцину, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
 12. **Yushchuk O**, Homoniuk V, Datsiuk Y, Ostash B, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Development of a gene expression system for the uncommon actinomycete *Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090. Journal of applied genetics 61(1):141–149. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00534-7> [IF 2,653; SCOPUS, WoS; SCImago **Q2** – 2020 Genetics] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
 13. **Yushchuk O**, Homoniuk V, Ostash B, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Genetic insights into the mechanism of teicoplanin self-resistance in *Actinoplanes teichomyceticus*. The Journal of antibiotics 73(4):255–259. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0274-9> [IF 3,424; SCOPUS, WoS; SCImago **Q3** – 2020 Pharmacology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
 14. **Yushchuk O**, Andreo-Vidal A, Marcone GL, Bibb M, Marinelli F, Binda E (2020) New molecular tools for regulation and improvement of A40926 glycopeptide antibiotic production in *Nonomuraea gerenzanensis* ATCC 39727. Frontiers in microbiology 11:8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00008> [IF 6,064; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2020 Microbiology] (*Особистий внесок здобувача:*

концептуалізація, виконання досліджень, написання рукопису та підготовка статті до друку).

15. **Yushchuk O**, Binda E, Marinelli F (2020) Glycopeptide antibiotic resistance genes: distribution and function in the producer actinomycetes. *Frontiers in microbiology* 11:1173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01173> [IF 6,064; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2020 Microbiology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання розділів присвячених продуцентам глікопептидів, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).
16. **Yushchuk O**, Ostash B, Truman AW, Marinelli F, Fedorenko V (2020) Teicoplanin biosynthesis: unraveling the interplay of structural, regulatory, and resistance genes. *Applied microbiology and biotechnology* 104(8):3279–3291. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10436-y> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2020 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і написання огляду, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).
17. Koshla O, **Yushchuk O**, Ostash I, Dacyuk Y, Myronovskyi M, Jäger G, Süßmuth RD, Luzhetskyy A, Byström A, Kirsebom LA, Ostash B (2019) Gene *miaA* for post-transcriptional modification of tRNA_{XXA} is important for morphological and metabolic differentiation in *Streptomyces*. *Molecular microbiology* 112(1):249–265. <https://doi.org/10.1111/mmi.14266> [IF 3,979; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2019 Molecular biology] (*Особистий внесок здобувача: створення репортерної системи на основі плазмиди pSAGA, створення подвійного мутанта $\Delta miaA \Delta bldA$, створення плазмід із різними алелями гена *adrA*, комплементация мутантів $\Delta miaA$ і $\Delta miaA \Delta bldA$ різними алелями *adrA*, аналіз властивостей мутантів і рекомбінантів, участь в написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
18. **Yushchuk O**, Kharel M, Ostash I, Ostash B (2019) Landomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces*. *Applied microbiology and biotechnology* 103(4):1659–1665. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09601-1> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2019 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: аналіз літератури і розділів огляду, присвячених організації кластерів генів біосинтезу і регуляції продукції ландоміцинів, створення ілюстрацій, підготовка статті до друку*).

19. **Yushchuk O.** Horbal L, Ostash B, Marinelli F, Wohlleben W, Stegmann E, Fedorenko V (2019) Regulation of teicoplanin biosynthesis: refining the roles of *tei* cluster-situated regulatory genes. Applied microbiology and biotechnology 103(10):4089–4102. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09789-w> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2019 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
20. **Yushchuk O.** Ostash I, Vlasiuk I, Gren T, Luzhetskyy A, Kalinowski J, Fedorenko V, Ostash B (2018) Heterologous AdpA transcription factors enhance landomycin production in *Streptomyces cyanogenus* S136 under a broad range of growth conditions. Applied microbiology and biotechnology 102(19):8419–8428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9249-1> [IF 5,560; SCOPUS, WoS; SCImago **Q1** – 2018 Applied Microbiology and Biotechnology] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
21. Rabyk M, **Yushchuk O.** Rokytskyy I, Anisimova M, Ostash B (2018) Genomic insights into evolution of adpa family master regulators of morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces*. Journal of molecular evolution 86(3-4):204–215. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9834-z> [IF 3,973; SCOPUS, WoS; SCImago **Q2** – 2018 Genetics] (*Особистий внесок здобувача: участь в аналізі даних, виконання експериментальної частини, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку*).
22. Koshla O, Lopatniuk M, Rokytskyy I, **Yushchuk O.** Dacyuk Y, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Ostash B (2017) Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA^{Leu}_{UAA} gene *bldA*. Archives of microbiology 199(8):1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1389-7> [IF 2,667; SCOPUS, WoS; SCImago **Q3** – 2017 Genetics] (*Особистий внесок здобувача: вивчення особливостей морфології і продукції антибіотиків в $\Delta bldA$ мутанта, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку*).
23. **Ющук ОС.** Осташ БО, Горбаль ЛО, Федоренко ВО (2017). Реконструкція філогенії кластерів генів біосинтезу глікопептидів. Фактори експериментальної еволюції організмів 20:109-115. [фахове видання України] (*Особистий внесок здобувача:*

концептуалізація, біоінформатичний аналіз, написання рукопису та підготовка статті до друку).

24. Tsypik O, **Yushchuk O.**, Zaburanyi N, Flårdh K, Walker S, Fedorenko V, Ostash B (2016) Transcriptional regulators of GntR family in *Streptomyces coelicolor* A3(2): analysis *in silico* and *in vivo* of YtrA subfamily. *Folia microbiologica* 61(3):209–220. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0426-7> [IF 2,629; SCOPUS, WoS; SCImago **Q3** – 2016 Microbiology] (*Особистий внесок здобувача: вивчення розповсюдження генів YtrA-регуляторів серед актинобактерій, аналіз властивостей генів SCO0823 і SCO3812, участь в написанні рукопису та підготовці статті до друку*).

Патенти:

1. Патент України на винахід №119472 Україна, МПК (2006.01)C12P 1/06 C12P 19/64 C12N 15/80 C12R 1/465 Спосіб активування продукції сполук з антибіотичною та протигрибною властивостями у *Streptomyces cyanogenus* S136 / **Ющук О.**, Осташ Б.; заявник і власник Львівський національний ун-т ім. І. Франка. – № а201702642, заявл. 21 березня 2017 р., опубл. 25.06.2019, Бюл. № 12. [патент України на винахід] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту*).

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Stepanyshyn A., **Yushchuk O.**, Marinelli F., Kalinowski J., Fedorenko V. Expression of pathway-specific regulators from dalbaheptide biosynthetic gene clusters induces antimicrobial properties of *Amycolatopsis bartoniae* DSM 45807. XVIII international scientific conference for students and PhD students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 6–7 September 2022. Львів: Сполом, 2022. Р. 72-73.
2. Duban R., Stepanyshyn A., Melnyk S., Fedorenko V., Ostash B., **Yushchuk O.** Approaching the activation of salinamide-like biosynthetic gene cluster in clorobiocin producer *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504. IV International Scientific Conference: «Microbiology and Immunology – the Development»: book of abstracts, Kyiv, 22-23

- September 2022. Kyiv: Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2022. P. 65.
3. Stepanyshyn A., Melnyk S., **Yushchuk O.**, Ostash I., Koshla O., Fedorenko V., Ostash B. Developing genetic instruments for manipulating *Streptomyces roseochromogenes* NRRL 3504 genome for increasing clorobiocin production. IV International Scientific Conference: «Microbiology and Immunology – the Development»: book of abstracts, Kyiv, 22-23 September 2022. Kyiv: Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2022. P. 81.
 4. Andreo-Vidal A., **Yushchuk O.**, Berini F., Binda E., Marinelli F. Novel glycopeptide antibiotic by *Nonomuraea coxensis* DSM 45129. Online congress ExpoBAC Zaragoza 2020: abstracts, Zaragoza, 8-9 July 2021. Zaragoza: Spain, 2021.
 5. Andreo-Vidal A., Binda E., Marinelli F., **Yushchuk O.** Comparative genomics of *van*-genes in glycopeptide producing *Actinobacteria* and beyond. VAAM Workshop 2021: Abstract book, Tübingen, 22-23 September 2021. Tübingen: Germany, 2021. P. 49.
 6. Степанишин А., Мельник С., Осташ Б., **Ющук О.** Аналіз мовчазного кластера генів біосинтезу криптичного салінамід-подібного антибіотика у продуцента хлоробіоцину *S. roseochromogenes*. XVII Міжнародна конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»: тези доповідей, Львів, 27–29 квітня 2021 р. Львів, 2021. С. 114-115.
 7. **Yushchuk O.**, Ostash I., Melnyk S., Kalinowski J., Süssmuth R., Ostash B. Revealing cryptic secondary metabolome of *Streptomyces* via manipulation of global regulatory gene *adpA*. 3rd International conference on natural products discovery and development in the genomic era: abstracts, San Diego, 13 January 2020. <https://sim.confex.com/sim/np2020/meetingapp.cgi/Paper/40268>.
 8. **Ющук О.**, Жукровська К.-О., Федоренко В. Сенсорний домен гістидинової кінази Теі3 не здатний реагувати на глікопептидні антибіотики. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса: тези доповідей, Львів, 9-11 квітня 2019 р. Львів, 2019. С. 37.
 9. **Ющук О.**, Власюк І., Осташ І., Федоренко В., Осташ Б. Властивості базальних представників ортологічної групи AdpA-регуляторів. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та

- поступ біології», присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса: тези доповідей, Львів, 9-11 квітня 2019 р. Львів, 2019. С. 36.
10. Homoniuk V., **Yushchuk O.**, Ostash B., Fedorenko V. Pathway-specific regulator of teicoplanin biosynthesis *tei15** does not interact with *tei2* promotor in heterologous system. XIV International scientific conference of students and PhD students «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 10-12 April 2018. Lviv, 2018. P. 128-129.
 11. Vlasjuk I., **Yushchuk O.**, Ostash B., Fedorenko B. Landomycin A production of AdpA-overexpressing *S. cyanogenus* S136 strains in extremely depleted media. XIV International scientific conference of students and PhD students «Youth and progress of biology»: abstracts, Lviv, 10-12 April 2018. Lviv, 2018. P. 132.
 12. Vlasjuk I., Ostash B., **Yushchuk O.**, Ostash I., Kuzhyk Y., Melnyk S., Hrab P., Suessmuth R., Fedorenko V. Pleiotropic transcriptional factor AdpA as a tool to upregulate antibiotic production by *Streptomyces*. International Conference «Advances in microbiology and biotechnology»: abstract book, Lviv, 29-31 October 2018. Lviv, 2018. P. 44.
 13. Vlasjuk I., **Yushchuk O.** Heterologous AdpA activate cryptic lucensomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces cyanogenus* S136. XIII international scientific conference of young scientists «Biology: from molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 28-30 November 2018. Kharkiv, 2018. P. 82-83.
 14. Жукровська К.-О., **Ющук О.**, Федоренко В. Дослідження індукцibility сенсорної гістидинової кінази *tei3* з *Actinoplanes teichomyceticus*. XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології», присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського: тези доповідей, Львів, 10-12 квітня 2018. Львів, 2018. С. 133.
 15. Koshla O., **Yushchuk O.**, Ostash I., Kravets K., Suessmuth R., Jäger G., Bystrom A., Ostash B., Fedorenko V. Post-transcriptional modifications of tRNA modulate secondary metabolism of *Streptomyces*. International Conference «Advances in microbiology and biotechnology»: abstract book, Lviv, 29-31 October 2018. Lviv, 2018. P. 75.
 16. Vlasjuk I., **Yushchuk O.** Expression of different *adpA* genes increases landomycin A production in *Streptomyces cyanogenus* S136 // XII international scientific conference of young scientists «Biology: from

molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 29 November – 1 December 2017. Kharkiv, 2017. P. 68.

17. Гомонюк В.В., **Ющук О.С.**, Горбаль Л.О. Експресія генів стійкості до глікопептидів у продуцента тейкопланіну *Actinoplanes teichomyceticus*. XII Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»: тези доповідей, Харків, 29 листопада – 1 грудня 2017 р. Харків, 2017. С. 64.
18. Zhukrovska K.-O., **Yushchuk O.** Expression of *tei3* gene encoding VanS-like sensor histidine kinase from teicoplanin biosynthesis gene cluster leads to teicoplanin resistance in *S. coelicolor* M512. XII international scientific conference of young scientists «Biology: from molecule to biosphere»: abstracts, Kharkiv, 29 November – 1 December 2017. Kharkiv, 2017. P. 69.
19. **Yushchuk O.** Evolution of glycopeptide and moenomycin antibiotic biosynthesis pathways in bacteria. International conference «Integrative Biology & Medicine»: abstracts, Kyiv, 2-7 October, 2017. Kyiv, 2017. P. 75.

АНОТАЦІЯ

Ющук О.С. Генетичні механізми регуляції біосинтезу пептидних та полікетидних антибіотиків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2023.

Робота присвячена вивченню генетичних регуляторних механізмів, що контролюють біосинтез полікетидних і пептидних антибіотиків актинобактерій, а також стійкості до глікопептидних антибіотиків (ГПА). Досліджено *adpA*-опосередкований каскад регуляції продукції антибіотиків у *S. albus*. Розроблено знаряддя для генно-інженерних маніпуляцій з актинобактеріями продуцентами пептидних антибіотиків: *A. rectilineatus*, *S. roseochromogenes*, *N. gerenzanensis* і *N. coxensis*. За допомогою розробленої системи експресії і шлях-специфічних регуляторних генів створено надпродуцентів клінічно-важливого ГПА A40926 в *N. gerenzanensis*. Секвеновано геном *N. coxensis*, де виявлено новий кластер біосинтетичних генів (КБГ) ГПА. Виходячи із даних порівняльної геноміки і аналітичної хімії, ідентифіковано цей ГПА як новий аналог A40926, який названо A50926. Останній відрізняється від A40926 відсутністю карбоксильної групи на залишку GlcNAc. Секвеновано геном *S. cyanogenus*, і встановлено роль *adpA* в активації вторинного метаболізму цього штаму, виявивши новий КБГ для полікетиду люцензоміцину. Вивчено особливості функціонування генів стійкості до ГПА в продуценті тейкопланіну *A. teichomyceticus*. Виявлено нові гени стійкості до ГПА в бактерій, вивчено їх еволюцію та шляхи розповсюдження.

Ключові слова: актиноміцети, глікопептидні антибіотики, полікетидні антибіотики, регуляторні гени, гени стійкості до антибіотиків, тейкопланін, A40926, ландоміцин, люцензоміцин.

ABSTRACT

Yushchuk O. Genetic mechanisms regulating the biosynthesis of peptide and polyketide antibiotics. – Qualifying scientific work in the form of a scientific report based on research articles.

Thesis for the scientific degree of the Doctor of Sciences in Biology, the speciality 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

The thesis investigates genetic regulatory mechanisms orchestrating the biosynthesis of polyketide and peptide antibiotics in actinomycetes and genes controlling glycopeptide antibiotic (GPA) resistance mechanisms in bacteria. In this work we characterized novel genes, either functional or regulatory, involved in the biosynthesis of polyketide or GPA antibiotics, and in resistance thereof.

First, we studied the *adpA*-mediated regulatory cascade in *S. albus*, unraveling some new players. Comparative genomics analysis allowed us to trace the evolutionary history of AdpA-like regulators in *Streptomyces* spp. and beyond, providing novel insights into the molecular properties of AdpA.

Next, we designed a set of knowledge-guided molecular tools to manipulate putative and known actinomycetes-producers of peptide antibiotics: *A. rectilineatus*, *S. roseochromogenes*, *N. gerenzanensis*, and *N. coxensis*. Here, efficient ways for plasmid transfer were described and novel gene-expression platforms were designed.

Utilizing these tools, we were able to create overproducers of valuable GPA A40926 in *N. gerenzanensis*. Obtained strains had high A40926 production levels when cultivated in Erlenmeyer flasks or 3-L bioreactor.

The bioinformatics analysis allowed the identification of a novel GPA biosynthetic gene cluster (BGC) in the *de novo* sequenced genome of *N. coxensis*. The further experimental analysis allowed us to describe cultivation conditions under which *N. coxensis* produced GPA. The latter appeared to be a novel A40926 analog lacking the carboxyl group on the *N*-acylglucosamine moiety. Notably, we were able to reconstruct A40926 production in *N. coxensis* by expressing a heterologous gene from *N. gerenzanensis*.

Accessing new ways to activate silent secondary metabolome in actinomycetes, we demonstrated that heterologous AdpA transcription

factors enhance landomycin A production in *S. cyanogenus* S136 under a broad range of growth conditions. The more detailed investigation also demonstrated the role of heterologous *adpA* alleles in further activating *S. cyanogenus* secondary metabolome. In particular, we elicited the silent lucensomycin biosynthetic pathway.

Another part of the work investigated GPA-resistance mechanisms in teicoplanin-producing *A. teichomyceticus*, demonstrating a multilayered strategy ensuring high GPA resistance in this strain. Coupling experimental results with a further *in silico* analysis, we proposed a novel scenario on GPA-resistance and biosynthetic genes co-evolution in *A. teichomyceticus*.

Finally, we performed a comprehensive bioinformatics study on the distribution and phylogeny of GPA resistance genes within the *Actinobacteria* phylum. *van* genes were found distributed in different arrangements not only among GPA-producing actinobacteria but also in the non-producers. Going broader, we also mapped the occurrence of *van* genes beyond the *Actinobacteria*. We showed that two additional classes of Gram-positive bacteria, *Erysipelotrichia* and *Ktedonobacteria*, as well as one class of Gram-negative bacteria, *Anaerolineae*, carry *van* genes. These results allowed us to propose a phylogeny-based scenario for the spread of *van* genes, unraveling a network of consequential horizontal gene transfer events linking the phylum *Actinobacteria* with the five other bacterial classes carrying *van* genes.

Overall, the results presented in this thesis pave new venues for the discovery of new antibiotics by means of comparative genomics, silent BGC activation, and combinatorial biosynthesis.

Key words: actinomycetes, glycopeptide antibiotics, polyketide antibiotics, regulatory genes, antibiotic resistance genes, teicoplanin, A40926, landomycin, lucensomycin.

Підписано до друку 31.07.23
Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Друк на різнографі. Зам. №31/07-1
Ум. друк. арк. 1,8
Наклад 100 прим.

Друк: ФОП Мацько Б.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924
Виписка з ЄДР №2010350000000170709 від 05.07.2022 р.