

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА “ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА  
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ”

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

КОШЛА ОКСАНА ТАРАСІВНА

УДК 579.25; 577.21

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ТРАНСЛЯЦІЙНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ**  
**ГЕНІВ У *Streptomyces albus* SAM2**

03.00.22 – молекулярна генетика

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

  
\_\_\_\_\_ О. Т. Кошла

Науковий керівник

Осташ Богдан Омелянович, д.б.н., проф.

**Львів–2019**

## АНОТАЦІЯ

*Кошля О. Т.* Вивчення механізмів трансляційної регуляції експресії генів у *Streptomyces albus* SAM2. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика (091 – Біологія). – Львівський національний університет імені Івана Франка, МОН України, Львів. – ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України”, Київ, 2019.

Трансляція – життєво важливим етап експресії генів. Процес біосинтезу білків, його ефективність та вибірковість, можуть модифікуватись через зміни структури і складу основних учасників трансляції. Механізми, що задіяні в регуляції білкового синтезу, залежно від потреб клітини, потребують подальшого ґрунтовного вивчення. Це завдання є актуальним для промислових продуцентів антибіотиків – бактерій роду *Streptomyces*.

У цій роботі ми пропонуємо нову експериментальну модель для вивчення процесів та механізмів, що змінюють експресію певних груп генів через зміни в будові деяких компонентів трансляційного процесу. Як модельний організм дослідження обрано *Streptomyces albus* SAM2 через його суттєві переваги. Зокрема, штам проходить всі етапи морфологічного розвитку, характерні для стрептоміцетів, і характеризується швидким ростом (і дисперсним – в рідкій культурі), його геном є відносно невеликим, він використовується як штам-господар для гетерологічної експресії кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів актиноміцетів і є простим для геномної інженерії.

Використовуючи SAM2, ми дослідили вплив меродиплоїдного стану гена *rpsL* (кодує рибосомний білок S12) на метаболізм стрептоміцетів.

Зокрема, наявність двох алелей *rpsL* в одному геномі дає штамам здатність до утворення гетерогенної популяції рибосом, частина з яких міститиме білок S12 дикого типу, а інша – мутантний білок S12\*. Наразі потенційні можливості такої популяції рибосом, як і детальні молекулярні механізми її впливу на експресію геному – невідомі. Втім, меродиплоїди виявляли змінений фенотип, що залежав від того, які саме амінокислотні заміни в структурі S12 кодували мутантні алелі *rpsL*. Зокрема, штам GI92\_ex характеризувався порушеною морфологією міцелію, K88E\_ex – зміненою стійкістю до стрептоміцину, а низка інших меродиплоїдів виявляла змінений вторинний метаболізм.

Зважаючи на активізацію вторинного метаболізму (як власного, так і гетерологічного) при додатковому внесенні алеля *rpsL*<sup>L90K</sup>, меродиплоїдні штамми становлять практичний інтерес, адже можуть слугувати основою для подальшого конструювання штамів-надпродуцентів антибіотиків.

Іншим аспектом цієї роботи стало дослідження ролі генів, що контролюють посттранскрипційні модифікації (ПТМ) нуклеозидних залишків тРНК стрептоміцетів. До цієї роботи ПТМ тРНК у цих організмів не досліджували. Ефективність тРНК при розкодовуванні кодонів значним чином залежить від наявності всіх необхідних модифікацій. У першу чергу, нас цікавило те, які саме модифікації визначають нормальне функціонування тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, єдиної що здатна декодувати найрідкісніший кодон UUA у стрептоміцетів. Відомо, що ця тРНК виступає своєрідним “перемикачем”, що ініціює морфогенез і синтез вторинних метаболітів. Адже без її присутності не транлюються UUA-вмісні мРНК, багато з яких задіяні у вищеописаних процесах. Однак невідомо, які саме механізми регулюють появу зрілої функціональної тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, здатної ефективно виконувати свою функцію.

Ми нокаутували ген *bldA* у штамі SAM2. Отриманий делеційний штам  $\Delta bldA$  не виявляв “класичного” Bld<sup>-</sup>фенотипу і на більшості твердих середовищ формувал і повітряний міцелій, і спори. Втім, штам не продукував

антибіотики, кластери генів біосинтезу яких містили ТТА-вмісні гени та не експресував ТТА<sup>+</sup> версію репортерного гена *sco3479* (*lacZ*). Однак, ми виявили незначну експресію репортерного злиття *adpA-gusA* в штамі  $\Delta bldA$ , що може свідчити про містрансляцію кодону UUA в складі *adpA*-мРНК за відсутності тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>. Швидше всього, експресія гена *adpA* в *S. albus* не знаходиться під суворим контролем тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>, а незначна кількість утвореного AdpA в  $\Delta bldA$  є достатньою умовою щоб уникнути блокування морфогенезу на рівні субстратного міцелію.

Нокаут гена *bldA* привів також до надпродукції кандицидинів, що загалом є цікавою стратегією для надекспресії антибіотиків, кластери генів біосинтезу яких не містять ТТА-кодони. Механізми такої активізації вторинного метаболізму потребують додаткових досліджень.

Для штаму *S. albus* J1074 біоінформатично ідентифіковано низку генів, продукти яких можуть бути задіяні в різноманітних процесах посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК. Вирішено глибше зосередитись на ролі двох ідентифікованих генів, *XNR\_1074* та *XNR\_1078*, що кодують ортологів MiaA та MiaB, відповідно. Відомо, що Mia-білки контролюють утворення модифікації ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37 більшості тРНК<sub>XXA</sub>, серед яких, швидше всього, і тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>.

Для з'ясування ролі генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* в каталізі модифікацій позиції A37 тРНК, згенеровано нокаутні штами SAM2 за цими генами. Шляхом аналізу гідролізатів тРНК нокаутних штамів та SAM2 виявили, що кінцевим варіантом Mia-залежної модифікації дикого типу *S. albus* є похідне ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A37, в утворенні якого послідовно беруть участь білки MiaA (*XNR\_1074*), MiaB (*XNR\_1078*) та MiaE. Гомолога останнього в геномі SAM2 виявити не вдалось.

Досліджено властивості нокаутних штамів  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$ . Виявили, що нокаут гена *miaB* практично не впливає на морфологічний розвиток чи продукцію власних вторинних метаболітів, однак знижує накопичення

гетерологічних *bldA*-залежних антибіотиків аранціаміцину та моеноміцину. Тоді як нокаут гена *miaA* приводив до суттєвої затримки морфологічного розвитку, росту, практичної відсутності синтезу ТТА-залежних антибіотиків. Штам  $\Delta miaA$  надпродукував різні форми антибіотиків антиміцинів і механізми, що лежать в основі такої надпродукції, становлять інтерес для подальшого вивчення.

Фенотип штаму  $\Delta miaA$  частково нагадував фенотип  $\Delta bldA$ . Окрім цього, за результатами експресії ТТА-вмісних репортерів, виявили пригнічення експресії гена *adrA* та затримку початку експресії ТТА<sup>+</sup>-версії гена *gusA* в штамі  $\Delta miaA$ . Враховуючи неповну комплементацию морфологічного фенотипу  $\Delta miaA$  геном *adrA*, в якому кодон ТТА заміщено на СТС, ми припускаємо, що часова затримка та пригнічення експресії ТТА-вмісних генів є частковою причиною виникнення дефектного фенотипу  $\Delta miaA$ . Однією із причин цього, можливо, є неефективна трансляція UUA кодонів тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, що не містить модифікації ms<sup>2</sup>iо<sup>6</sup>A37. Відомо, що Mia-білки модифікують низку тРНК та вносять свій вклад в нормальне функціонування клітини не лише через тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. Підтвердженням цього є фенотип подвійного мутанта *S. albus*  $\Delta mia/bldA::aac(3)IV-oriT$ , що є ще більш дефектним, ніж одиничних мутантів  $\Delta miaA$  та  $\Delta bldA$ .

Отже, посттранскрипційні модифікації тРНК вносять свій важливий вклад в перебіг нормального метаболізму стрептоміцетів, а їхня відсутність приводить до виникнення специфічних фенотипів. Механізми виникнення таких фенотипів, як і вклад тієї чи іншої модифікації тРНК при експресії тих чи інших груп генів, становлять значний інтерес для дослідження, і з фундаментальної, і з практичної точок зору.

Регуляція трансляційних процесів експресії генів стрептоміцетів заслуговує глибшого вивчення, оскільки, змінюючи властивості, якісний чи кількісний склад рибосом та тРНК, можна суттєво впливати на фенотип, а в майбутньому – і генерувати штами з необхідними властивостями.

**Ключові слова:** *S. albus* SAM2, трансляція, меродиплоїд, тРНК, посттранскрипційні модифікації тРНК.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ

### Наукові статті

1. Rokytskyu, I., **O. Koshla**, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2016. “Decoding Options and Accuracy of Translation of Developmentally Regulated UUA Codon in *Streptomyces*: Bioinformatic Analysis.” *SpringerPlus* 5(1):982. doi:10.1186/s40064-016-2683-6. eCollection 2016. *Внесок здобувача – пошук генів, що кодують тРНК, та можливих білків-ортологів, що контролюють посттранскрипційні модифікації нуклеозидів тРНК, для геномів стрептоміцетів, опис результатів та їх обговорення.*
2. **Koshla, O.**, M. Lopatniuk, I. Rokytskyu, O. Yushchuk, Y. Dacyuk, V. Fedorenko, A. Luzhetskyu, and B. Ostash. 2017. “Properties of *Streptomyces albus* J1074 Mutant Deficient in tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> Gene *bldA*.” *Arch. Microbiol.* 199(8):1175-1183. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7. *Внесок здобувача – конструювання штамів *S. albus*, характеристика, аналіз та опис властивостей цих штамів, опис методології, результатів та їх обговорення, участь у написанні статті.*
3. **Koshla, O.**, and B. Ostash. 2018. “A Genetic Assay System to Study Mistranslation of Leucyl Codon UUA in *Streptomyces*.” *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 77:70–75. doi:10.30970/vlubs.2018.77.08. *Внесок здобувача – конструювання використаних штамів *S. albus*, аналіз експресії репортерного злиття *adrA-gusA*, аналіз результатів та їх обговорення, опис методології, участь у написанні статті.*
4. Ostash, B., O. Yushchuk, **O. Koshla**, Y. Rebets, I. Ostash, Y. Sehin, T. Busche, J. Kalinowski, G. Muth, and V. Fedorenko. 2018. “Elucidation of the Genetic Mechanisms Contributing to Moenomycin Resistance in *Actinobacteria*.” *Фактори експериментальної еволюції організмів* 22:203–209. *Внесок здобувача*

– аналіз експресії генів, що ведуть до виникнення стійкості до моеноміцину, для штаму *S. albus* J1074.

5. Sehin, Y., **O. Koshla**, Y. Dacyuk, R. Zhao, R. Ross, M. Myronovskyi, P. Limbach, A. Luzhetskyu, S. Walker, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Gene *ssfg\_01967* (*miaB*) for tRNA Modification Influences Morphogenesis and Moenomycin Biosynthesis in *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672.” *Microbiology* 165(2):233–245. doi:10.1099/mic.0.000747. Внесок здобувача – виділення загальної фракції тРНК зі штамів *S. ghanaensis*, аналіз посттранскрипційних модифікацій тРНК та обговорення результатів.

6. **Koshla, O.**, I. Rokytskyu, I. Ostash, T. Busche, J. Kalinowski, E. Mösker, R. Süßmuth, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Secondary Metabolome and Transcriptome of *Streptomyces albus* J1074 in Liquid Medium SG2.” *Cytology and Genetics* 53(1):1–7. Внесок здобувача – аналіз даних метаболомного та транскриптомного дослідження штаму *S. albus* J1074, опис та обговорення результатів.

7. **Koshla, O.**, O. Yushchuk, I. Ostash, Y. Dacyuk, M. Myronovskyi, G. Jäger, R. Süßmuth, A. Luzhetskyu, A. Byström, L. Kirsebom, and B. Ostash. 2019. “Gene *miaA* for Post-transcriptional Modification of tRNA<sub>XXXA</sub> is Important for Morphological and Metabolic Differentiation in *Streptomyces*.” *Mol. Microbiol.* 112(1):249-265. doi:10.1111/mmi.14266. Внесок здобувача – конструювання штамів *ΔmiaA* та *ΔmiaB*, характеристика та опис властивостей мутантів, опис методології, опис та аналіз результатів, участь у написанні статті.

### Патент України на корисну модель

**Кошла, О.**, та Б. Осташ. 2017. Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074. Патент України на корисну модель № 120622, подано Травень 29, 2017 та опубліковано Листопад 10, 2017.

### Тези конференцій

1. Рокицький, І., та **О. Кошла**. 2016. “Декодування та точність трансляції лейцинового кодону ТТА у стрептоміцетів: аналіз *in silico*.” Збірник тез

доповідей XII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 19–21.

2. Kharaton, Y., **O. Koshla**, M. Lopatniuk, Y. Sehin, O. Kuzemko, Kh. Yuskiv, I. Ostash, A. Luzhetskyy, K. Ochi, and B. Ostash. 2016. “Generation and Study of *Streptomyces albus* J1074 and *S. cyanogenus* S136 *rpsL* Merodiploid Strains.” Abstracts of XII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 19–21.

3. Рокицький, І., та **О. Кошла**. 2017. “Методи дослідження вживання кодонів в геномах *Streptomyces*.” Збірник тез доповідей XIII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 25–27.

4. **Koshla, O.**, O.Borys, and B. Ostash. 2017. “Heterologous Aranciamycin Production by *rpsL* Merodiploids of *Streptomyces albus* J1074.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.

5. **Koshla, O.**, V. Kravets, Kh. Yuskiv, and B. Ostash. 2017. “Some Properties of *Streptomyces albus* J1074 Strains Carrying *rpsL* Missense Mutation K88E.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.

6. **Koshla, O.**, I. Rokytsky, J. Sehin, L. Kirsebom, A. Luzhetskyy, and B. Ostash. 2017. “Switch of the Switch? Posttranscriptional tRNA Modifications as Regulators in *Streptomyces* Biology.” Abstracts of EMBO conference Bacterial networks (BacNet17), Sant Feliu de Guixols, Spain, September 9-14.

7. Борис, О., та **О. Кошла**. 2017. “Антибіотична активність штамів *Streptomyces albus* SAM2, меродиплоїдних за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.

8. Кравець, В., та О. Кошла. 2017. “Деякі властивості мутантних штамів *Streptomyces albus* SAM2 за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної



конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.

9. **Koshla, O.**, Y. Sehin, and B. Ostash. 2018. “The Role of *miaA* and *miaB* Genes in *Streptomyces albus* SAM2 Metabolism.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.

10. Sehin, Y., **O. Koshla**, and B. Ostash. 2018. “Streptomycete Genes Controlling Post-transcriptional Modification of tRNA with XAA Anticodons.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.

11. Борис, О., **О. Кошла**, та Б. Остащ. 2018. “Синтез антибіотиків штамми *Streptomyces albus*, що містять *rpsL* мутації отримані за допомогою спонтанного мутагенезу та генетичної інженерії.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.

12. Кравець, В., **О. Кошла**, та Б. Остащ. 2018. “Деякі властивості *miaA*- та *miaB*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.

13. **Koshla, O.**, O. Yushchuk, I. Ostash, V. Kravets, R. Suessmuth, G. Jäger, A. Bystrom, B. Ostash, and V. Fedorenko. 2018. “Post-transcriptional Modifications of tRNA Modulate Secondary Metabolism of *Streptomyces*.” Program and Abstracts Book for International conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”, Lviv, October 29–31.

14. Кравець, В., Б. Остащ, та **О. Кошла**. 2019. “Властивості *mia*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2”. Збірник тез доповідей XV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 9–11.

## ANNOTATION

*Koshla O.* Studying the mechanisms for translational level of gene expression regulation in *Streptomyces albus* SAM2. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences in speciality 03.00.22 – Molecular genetics (091 – Biology). – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Translation is the essential part of gene expression. The process of protein synthesis, its rate, accuracy and selectivity could be altered and modified by affecting certain elements of translation. Regulatory mechanisms of translational level of gene expression require further study, in particular, for important industrial antibiotic producers, such as streptomycetes.

In this work we have put forward the new experimental model for studying the mechanisms and processes which change expression of certain gene groups via manipulations of translational machinery components. *Streptomyces albus* SAM2 was chosen as a model organism for this study due to its significant advantages. The strain undergoes all stages of morphological differentiation, typical for *Streptomyces*, in the same time grows rapidly (and in disperse way in liquid media), has naturally minimized genome; is used as a host strain for heterologous expression of secondary metabolites biosynthesis gene clusters and is amenable for genomic engineering.

Using SAM2, we studied influence of merodiploid state of *rpsL* gene (encodes S12 ribosomal protein) on *Streptomyces* metabolism. In particular, presence of two different alleles of *rpsL* in one genome gives the strains ability to produce heterogeneous population of ribosomes carrying either wild type or mutated S12 proteins. The impact of such mixed ribosomal population on

antibiotic production is unclear, as well as molecular mechanisms linking the former to a variety of phenotypes. Merodiploids showed altered phenotypes depending on the type of S12 aminoacid substitution encoded by additional *rpsL* alleles. For example, strain GI92\_ex was characterized by impaired morphology, strain K88E\_ex – possessed altered streptomycin resistance and some other strains revealed altered production of secondary metabolites. With regard to the latter, strain L90K\_ex showed the highest increases in antibiotic titers. Therefore, merodiploids are of practical interest as a platform for strain improvement.

The other important contribution of this work is studying the role of posttranscriptional tRNA modifications (PTTM) in *Streptomyces*. PTTM genes were not described for this group of microorganisms prior to this work. PTTMs play important role during translation, and some of them determine its accuracy. First of all, we were interested in PTTMs that contribute to proper function of tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, the only one for translation of the rarest *Streptomyces* codon UUA. This tRNA is a “switch” to trigger morphogenesis and secondary metabolism. Without it, translation of UUA-containing mRNAs would be abortive. Many UUA-transcripts are important for morphological differentiation and secondary metabolism. Our working hypothesis was that PTTMs may determine the occurrence of mature (translationally competent) tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>.

The generation of *bldA* gene knock-out was necessary part of this work, since the properties of *bldA* mutant for *S. albus* were not described. The  $\Delta bldA$  strain did not reveal classic “Bald colony” phenotype and was able to form aerial mycelium and spores on most solid mediums. However, strain did not produce metabolites directed by gene clusters with TTA codons. The  $\Delta bldA$  did not express TTA<sup>+</sup> reporter gene *sco3479* (*lacZ*). Yet, we were able to detect low level of *adpA-gusA* reporter fusion expression. This could be the evidence for UUA mistranslation in *adpA*-mRNA in the absence of tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. It is possible that *adpA* expression in *S. albus* is not under strict translational control of tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> and low amount of AdpA in  $\Delta bldA$  is enough to escape morphological arrest.

*bldA* knock-out resulted in candicidines overproduction. Hence, depletion of  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{UAA}}$  could be an interesting strategy for overexpression of TTA-independent antibiotics. The detailed mechanisms of such activation of secondary metabolism require future studies.

For *S. albus* J1074 strain some genes were bioinformatically identified that possibly control formation of different tRNA modifications. It was decided to study two of those genes, *XNR\_1074* and *XNR\_1078*, encoding possible MiaA and MiaB orthologues, respectively. It is known that Mia-proteins take part in  $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}37$  formation for most  $\text{tRNA}_{\text{XXA}}$ .  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{UAA}}$  could be one of those.

We generated *XNR\_1074* and *XNR\_1078* knockouts for deeper study of mentioned genes role in SAM2. The final product of Mia-dependent modifications in wild type is  $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}37$  derivative. Sequential action of proteins MiaA (*XNR\_1074*), MiaB (*XNR\_1078*) and MiaE forms this compound. We were not able to identify MiaE homolog in SAM2.

We studied the properties of  $\Delta\text{miaA}$  and  $\Delta\text{miaB}$  strains. Knock-out of *miaB* practically does not affect morphology of native secondary metabolites production, but reduces the accumulation of *bldA*-dependent aranciamycin and moenomycin. At the same time, the *miaA* knock-out leads to considerable delay in morphological differentiation (as compared to SAM2), and practically abolished production of TTA-containing antibiotics. Interestingly,  $\Delta\text{miaA}$  overproduced different forms of antimycins.

Strains  $\Delta\text{miaA}$  and  $\Delta\text{bldA}$  exhibited similar phenotypes. Besides, expression of TTA-containing reporter genes was affected in  $\Delta\text{miaA}$ . Lower level of *adpA* expression and delay of TTA<sup>+</sup>-*gusA* expression was detected for  $\Delta\text{miaA}$ . Considering partial complementation of  $\Delta\text{miaA}$  phenotype with TTA-free *adpA*, we assume that delayed and complicated expression of TTA-containing genes could be the component of defective  $\Delta\text{miaA}$  phenotype. It is possible that the absence of  $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}37$  in  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{UAA}}$  partially results in impaired decoding of UUA.

Of course Mia-proteins modify not only tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> but a wider set of other tRNA<sub>XXA</sub>, which also contribute to normal metabolism of SAM2. The double mutant *S. albus*  $\Delta mia/bldA::aac(3)IV-oriT$  phenotype support such a conjecture, since it exhibited morphogenetic defects more severe than that of single mutants  $\Delta miaA$  or  $\Delta bldA$ .

In summary, tRNA modifications are important for *Streptomyces* metabolism and their absence results in specific phenotypes. The mechanisms of such phenotypes formation and role of tRNA modifications in expression of particular gene groups deserve further studies for fundamental and practical reasons.

**Keywords:** *S. albus* SAM2, translation, merodiploids, tRNA, post-transcriptional tRNA modifications.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. РЕГУЛЯЦІЙНІ ШЛЯХИ ЕСПРЕСІЇ ГЕНІВ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ТА ДЕЯКІ МЕХАНІЗМИ, ЩО МОЖУТЬ НА НИХ ВПЛИВАТИ	22
1.1. Регуляція метаболізму стрептоміцетів	23
1.1.1. Регуляція морфогенезу	24
1.1.2. Регуляція синтезу вторинних метаболітів	28
1.2. Мутації гена <i>rpsL</i> та їхній фенотиповий прояв	32
1.3. Регуляторна роль тРНК <sup>Лей</sup> <sub>UAA</sub> та кодону ТТА у стрептоміцетів	39
1.4. Посттранскрипційні модифікації нуклеозидів тРНК	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
2.1. Матеріали досліджень	47
2.2. Методи досліджень	48
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	57
3.1. Меродиплоїди <i>S. albus</i> за геном <i>rpsL</i> та їхні властивості	57
3.2. Конструювання та дослідження мутанта <i>S. albus</i> за геном <i>bldA</i> , що кодує лейцинову тРНК <sup>Лей</sup> <sub>UAA</sub>	67
3.3. Мутанти <i>S. albus</i> за генами, що кодують білки посттранскрипційних модифікацій тРНК	80
3.3.1. Біоінформатичний пошук генів, що кодують білки- модифікатори тРНК у стрептоміцетів	80
3.3.2. Нокаут генів <i>XNR_1074</i> та <i>XNR_1078</i> і комплементация мутантних фенотипів	85
3.3.3. Аналіз модифікацій тРНК штамів SAM2, $\Delta miaA$ , $\Delta miaB$	90
3.3.4. Пошук можливого ортолога MiaE для SAM2	91

3.3.5. Морфологічний фенотип мутантів $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$	94
3.3.6. Вплив стресових умов на фенотип штамів $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$	96
3.3.7. Вторинний метаболізм штамів $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$	100
3.3.8. Експресія ТГА-вмісних репортерних генів штамми $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$	104
3.3.9. Роль кодону ТГА та тРНК <sup>Leu</sup> <sub>UAA</sub> у виявленні морфотипу мутанта $\Delta miaA$	108
3.3.10. Внесення додаткової копії генів $miaA$ і $miaB$ у штам SAM2	112
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	114
ВИСНОВКИ	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128
ДОДАТКИ	152

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- а/к – амінокислота
- п.н. – пари нуклеотидів
- т.п.н. – тисячі пар нуклеотидів
- млн.п.н. – мільйони пар нуклеотидів
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота
- тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> – лейцинова тРНК, що розкодує кодон UUA
- ВМ – вторинні метаболіти
- КГБ – кластер генів біосинтезу
- КУО – колонієутворююча одиниця
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- BLAST (basic local alignment sequence tool) – онлайн-метод локального порівняння послідовностей
- ORF (open reading frame) – відкрита рамка зчитування
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
- ВЕРХ-МС – високоефективна рідинна хроматографія, спряжена з мас-спектрометрією



## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Стрептоміцети, що належать до класу *Actinobacteria* (актинобактерії), становлять значний інтерес для вивчення у першу чергу через їхню здатність до синтезу низки вторинних метаболітів (ВМ). Ці сполуки мають важливе промислове значення, зокрема як протибактерійні (стрептоміцин), протигрибкові (ністатин), протигельмінтні (авермектин) та протипухлинні (доксорубіцин) антибіотики. Як промислових продуцентів стрептоміцетів використовують достатньо давно, вони продукують близько половини антибіотиків мікробного походження (Kieser et al. 2000; Bérdu 2012). Однак, проблемою є набуття множинної стійкості патогенними мікроорганізмами до вже наявних антибіотиків та той факт, що за останні 30 років жодного принципово нового класу антибіотиків не було розроблено.

Втім, потенціал стрептоміцетів до синтезу нових сполук ще не вичерпано. Секвенування та аналіз геномів виявили значну кількість кластерів генів ВМ (близько 20-45 кластерів на геном), що за лабораторних умов є криптичними, тобто не експресуються, або експресуються на дуже низькому рівні (Liu et al. 2013; Senges et al. 2018). Механізми, що лежать в основі контролю експресії цих генних кластерів, становлять неабиякий практичний інтерес, оскільки можуть привести, наприклад, до відкриття нових антибіотиків, в яких наразі постала вкрай гостра потреба.

Регуляція метаболізму стрептоміцетів містить ієрархічно підпорядковані каскади, є надзвичайно складною, тісно скоординованою в часі та з умовами середовища (McCormick and Flårdh 2012). Значний та виправданий інтерес дослідників довгий час був спрямований на регуляцію вторинного метаболізму мережею транскрипційних факторів (den Hengst et al. 2010; Liu et al. 2013). Накопичення нових даних транскриптоміки, протеоміки та метаболоміки дає змогу виявити нові, не менш важливі рівні

регуляції експресії генів. Одним із таких рівнів є трансляційна регуляція, яка впливає на метаболізм через зміни точності, ефективності та вибіркості трансляції мРНК (Day and Tuite 1998; Novoa and Ribas de Pouplana 2012; Csárdi et al. 2015; Guo 2018). Вивчення механізмів, що впливають на трансляційну регуляцію експресії генів стрептоміцетів дасть змогу глибше зрозуміти ті фундаментальні процеси, що лежать в основі білкового синтезу певних груп мРНК (в тому числі і мРНК, необхідних для синтезу різних класів ВМ) та використати ці дані для раціонального конструювання штамів із необхідними властивостями. Отже, робота має важливе теоретичне й практичне значення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертацію виконано у науково-дослідній лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів антибіотиків (НДЛ-42) при кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Роботу виконано у межах бюджетних тем БГ-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами.” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.) і Ф80/2-2018 “Посттранскрипційні модифікації тРНК як регулятори первинного й вторинного метаболізму в актинобактерій” (№ державної реєстрації 0118U000406, 2018 р.).

**Мета та завдання дослідження.** Мета дисертаційної роботи – розробити експериментальну модель для дослідження трансляційного рівня регуляції експресії генів у стрептоміцетів на основі штаму *Streptomyces albus* SAM2; вивчити, з використанням цієї моделі, механізми прояву та роль мутацій за генами рибосомного білка S12 і посттранскрипційної модифікації тРНК у морфогенезі та продукції антибіотиків.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- 1) Сконструювати та дослідити властивості низки штамів *Streptomyces albus* SAM2 меродиплоїдних за геном рибосомного білка S12 *rpsL*;

- 2) Сконструювати безмаркерного делеційного мутанта *S. albus* за геном лейцил-тРНК (UUA) *bldA* та дослідити його властивості, зокрема морфологічний цикл на агаризованих середовищах, синтез вторинних метаболітів та експресію в мутанті репортерних генів;
- 3) Сформувавши вибірку генів стрептоміцетів, білкові продукти яких, імовірно, модифікують тРНК;
- 4) Сконструювати штами *S. albus* з делеціями вибраних генів модифікацій тРНК, дослідити властивості отриманих штамів;
- 5) Описати загальну схему функціонування і регуляції вторинного метаболізму стрептоміцетів за участі досліджених генів модифікації тРНК.

Об'єктом дослідження є генетичні механізми, що задіяні в контролюванні точності, вибіркової та ефективності експресії генів (чи груп генів) на рівні трансляції у *Streptomyces albus* SAM2.

Предмет дослідження – гени рибосомного білка S12, тРНК, білків модифікації тРНК та мутації в цих генах, які впливають на експресію геному *Streptomyces albus* SAM2, зокрема на шляхи вторинного метаболізму, морфогенезу та репортерні гени.

Методи дослідження – біоінформатичні: аналіз послідовностей нуклеотидів та білків, баз даних; генно-інженерні: виділення і аналіз ДНК (сумарної та плазмідної) та РНК, гель-електрофорез НК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, ПЛР; біохімічні: аналіз гідролізатів тРНК, екстракція і аналіз вторинних метаболітів стрептоміцетів (ВЕРХ-МС, хроматографія); генетичні: генерація та опис мутацій, трансформація клітин *Escherichia coli* плазмідними та лінійними молекулами ДНК, кон'югаційні міжродові схрещування *E. coli* – *Streptomyces*; мікробіологічні: культивування штамів бактерій за різних умов, аналіз їхніх фенотипів, мікроскопія.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Створено делеційного мутанта *S. albus* за геном *bldA* та доведено, що штам нездатний експресувати ТТА-вмісні гени. Вперше класифіковано гени білків, що задіяні в посттранскрипційних модифікаціях тРНК стрептоміцетів. Вперше отримано делеційних мутантів стрептоміцетів за цими генами та доведено їх функцію шляхом хімічного аналізу модифікацій нуклеозидів тРНК; описано властивості мутантних штамів, зокрема їхній морфотип, здатність синтезувати вторинні метаболіти та вплив відсутності модифікацій на експресію репортерних білків. Отримано низку меродиплоїдних штамів *S. albus* за геном рибосомного білка S12 – *rpsL* – та описано вплив такого стану гена на вторинний метаболізм і загальні процеси росту та стійкості до антибіотиків. Отримано нові дані про регуляторні процеси на трансляційному рівні контролю експресії генів та їхнє місце в уже описаних регуляторних каскадах.

**Практичне значення отриманих результатів.** Практичне значення полягає у можливості використання отриманих даних для підвищення продукції відомих та активації біосинтезу нових біологічно активних речовин. Отримані в ході роботи дані, плазміди, штами *E. coli* і стрептоміцетів використовують у навчальному процесі на кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Частина результатів цієї роботи увійшла до патенту України на корисну модель №120622 “Спосіб підвищення синтезу полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074”.

**Особистий внесок здобувача.** Результати, викладені у дисертації, автор отримав особисто або за непосредньої участі у виконанні експериментів. Планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів виконано спільно з науковим керівником, д.б.н. Б. О. Осташем (ЛНУ ім. І. Франка). Вибрані питання роботи проаналізовано та обговорено зі співробітниками кафедри генетики та біотехнології ЛНУ ім. І. Франка, проф.

В. О. Федоренком, к.б.н. І. С. Осташ, к.б.н. О. С. Ющуком, асп. І. В. Рокицьким, з якими автор має спільні публікації. Електронну мікроскопію штамів *S. albus* виконано спільно з к.ф.-м.н. Ю. Р. Дацюком (ЛНУ ім. І. Франка). Частина роботи виконувалась в Університеті Уппсали (Швеція), у групі проф. Л. А. Кірсебома, за підтримки здобувача стипендією Visby від Swedish Institute (SI). Аналіз гідролізатів тРНК проводили у співпраці із групою проф. А. Бістрома із Університету Умеа (Швеція). ВЕРХ-МС аналіз екстрактів, отриманих зі штаму  $\Delta bldA$ , проводили спільно з асп. М. Лопатнюк (група проф. А. Лужецького, Саарландський університет, Німеччина).

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень репрезентовані на XII-XV Міжнародних конференціях “Молодь і поступ в біології” (Львів, Україна, 2016-2019 рр.); XII Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, Україна, 29 листопада – 1 грудня 2017 р.); звітних наукових конференціях Львівського національного університету імені І. Франка (Львів, Україна, 2015, 2017-2019 рр.); міжнародній конференції “Bacterial Networks” (Сан-Феліу-де-Гішульс, Іспанія, 9-14 вересня 2017 р.); міжнародній конференції “Актуальні проблеми мікробіології та біотехнології” (Львів, Україна, 29-31 жовтня 2018).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 22 наукові роботи, з яких 7 статей у фахових виданнях, один патент України на корисну модель та 14 тез доповідей на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (186 найменувань) та додатків. Роботу викладено на 167 сторінках машинописного тексту (114 сторінок основного тексту) і проілюстровано 44-ма рисунками та 8-ма таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### РЕГУЛЯЦІЙНІ ШЛЯХИ ЕСПРЕСІЇ ГЕНІВ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ТА ДЕЯКІ МЕХАНІЗМИ, ЩО МОЖУТЬ НА НИХ ВПЛИВАТИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

У 1943 році Ваксман та Генрічі, досліджуючи проблеми номенклатури та систематики актинобактерій, запропонували виділити новий рід, *Streptomyces*, що став типовим і для новоствореної родини *Streptomycetaceae*. Вчинили так через необхідність відділити аеробних сапрофітних актиноміцетів, що формували слабо- чи нефрагментований міцелій та ланцюжки спор, від патогенних мікроаерофільних організмів, що разом відносили до *Actinomyces*. Типовим представником роду *Streptomyces* було обрано вид *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend Krainsky), раніше відомий як *Actinomyces albus* Krainsky та вперше описаний як *Streptothrix alba* Rossi-Doria (Waksman and Henrici 1943).

Зараз до роду *Streptomyces* належить близько 550 валідно описаних представників. Рід займає наступне положення серед бактерій:

Домен *Bacteria* – Філум *Actinobacteria* – Клас *Actinobacteria* – Порядок *Streptomycetales* – Родина *Streptomycetaceae* – Рід *Streptomyces* (Whitman et al. 2012).

Стрептоміцети – Грам-позитивні вільноживучі сапрофітні мікроорганізми, деструктори рослинних та тваринних решток, продуценти значної кількості вторинних метаболітів, що широко використовує людина. Основне середовище існування – ґрунт.

Життєвий цикл стрептоміцетів є одним із найскладніших серед бактерій, включає морфологічну диференціацію клітин та спороутворення. Завдяки розвинутому вторинному метаболізму (ВМ) стрептоміцети є важливими індустріальними продуцентами різноманітних біоактивних

речовин з антибактерійними, антипаразитичними, протигрибковими чи протипухлинними властивостями (Kieser et al. 2000; Barka et al. 2016). Із початком активного дослідження актинобактерій, у 1940-1970-их роках, частка продукованих ними біологічно активних сполук (серед усіх сполук мікробного походження) становила близько 62%. Протягом 2001-2010 років ця частка знизилась до 28,5% (Bérdy 2012). Втім, значний потенціал актиноміцетів, як продуцентів вторинних метаболітів, ще раз підтверджено за допомогою аналізу секвенованих геномів. Останні в стрептоміцетів мають лінійну конформацію та є одними із найбільших серед бактерій (від 6,8 до 12 млн п. н.). В одному геномі може міститись до 128 кластерів для генів біосинтезу ВМ (Senges et al. 2018), більшість з яких експресуються вкрай слабо; ці генні кластери отримали назву криптичних, або мовчазних, оскільки хімічна природа кодованих ними сполук залишається невідомою.

Одним із основних завдань вивчення стрептоміцетів є отримання нових та збагачення вже існуючих знань про регуляцію метаболічних шляхів цих бактерій, задіяних в біосинтезі ВМ. Оперуючи ними, можна отримати штами із бажаними властивостями, як-от з активованою експресією криптичних кластерів генів, чи підвищеною продукцією цінних антибіотиків.

### **1.1. Регуляція метаболізму стрептоміцетів**

Типовий цикл розвитку стрептоміцетів розпочинається із проростання спори у ростову трубку, що згодом розгалужується і формує субстратний міцелій. Міцелій має вигляд слабофрагментованих мультинуклеоїдних гіфів і продовжує ріст за наявності поживних речовин. При виснаженні джерел живлення розпочинається розвиток повітряного міцелію, гіфи якого, завдяки гідрофобним властивостям, піднімаються над субстратом. При цьому частина субстратного міцелію лізується і отримані ресурси спрямовуються на побудову повітряних гіфів. Початок морфогенезу колонії свідчить про перехід до стаціонарної фази росту. Саме тоді і розпочинається синтез

більшості вторинних метаболітів. Далі на повітряному міцелії формуються септи, що ведуть до утворення ланцюжків однонуклеоїдних спор. Дозрілі спори є сплячою формою, що здатна переживати коливання температур, дефіцит вологи та інші несприятливі умови (Bibb 1996; Kieser et al. 2000; Федоренко та ін. 2007).

Запуск морфогенетичної програми стрептоміцетів супроводжується значною перебудовою основних метаболічних шляхів. Одним із виявів цієї перебудови є і ВМ. Процеси морфологічної та метаболічної диференціації скоординовано в часі і з умовами зовнішнього середовища, є складними і багатоетапними, та контролюються широкою мережею регуляторів (McCormick and Flärdh 2012). Ці мережі формують ієрархічно-підпорядковані каскади, як описано докладніше нижче.

**1.1.1. Регуляція морфогенезу.** Регулятори, що впливають на морфогенез стрептоміцетів, можна розділити на два основні класи. Перший – це *bld*-клас (від “bald”, голомозий) – регулятори, що задіяні в процесах розвитку повітряних гіфів. Мутанти за генами цих регуляторів формують так звані “лисї” колонії, оскільки повітряного міцелію і спор вони не утворюють (Merrick 1976; Kelemen and Buttner 1998; Hackl and Bechthold 2015). Другий – це *whi*-клас (від “white”, білий) – контролюють спороутворення та дозрівання спор. У *whi*-мутантів порушено перетворення повітряних гіфів у спори на різних етапах: часто спори взагалі не утворюються, або їхня морфологія порушена, як і синтез спорових пігментів. Через заблокований на етапі білих повітряних гіфів морфогенез, перші *whi*-мутанти *S. coelicolor* і отримали свою назву (Chater 1972, 2001; Willemse, Mommaas, and van Wezel 2012).

Важливо, щоб гени, задіяні в морфогенезі, були неактивними протягом вегетативного росту, оскільки їхня рання активація веде до передчасного розвитку. Глобальним негативним транскрипційним фактором в цьому випадку виступає білок BldD. Відомо, що білок репресує близько 170 генів,



здіяяних у розвитку повітряного міцелію та спорулюванні, протягом вегетативного росту (den Hengst et al. 2010; Elliot et al. 2001). Зокрема, мішенями репресії BldD є гени сигма факторів  $\sigma^N$  (*bldN*) та  $\sigma^{WhiG}$  (кодується геном *whiG*) (Chater 2001), ген *adpA*. Для коректного зв'язування регуляторних послідовностей генів-мішеней BldD повинен димеризуватися за умови приєднанням циклічного ди-гуанозинмонофосфату, c-di-GMP (Bush et al. 2015; Schumacher et al. 2017). Коли джерела живлення вичерпуються, а пул c-di-GMP виснажується, димер BldD розпадається і дисоціює від ДНК; так скасовується репресія *bld*- та *whi*-генів. Це відбувається на початку стаціонарної фази росту.

Після скасування репресії BldD, розпочинається експресія гена *bldN*, що кодує екстра цитоплазматичний сигма фактор РНК-полімерази ( $\sigma^N$ ) (Bibb, Molle, and Buttner 2000).  $\sigma^N$ , в свою чергу, запускає транскрипцію гена-регулятора відповіді *bldM*, а також генів аліфатичних білків чаплінів (chaplins, *coelicolor* hydrophobic aerial proteins) і родлінів, що входять до складу оболонки повітряних гіфів та надають гідрофобних властивостей їхній поверхні. Відомо, що активність  $\sigma^N$  може регулюватись на посттрансляційному рівні зв'язуючись з трансмембранним анти-сигма фактором RsbN. Останній інактивується зовнішнім сигналом невідомої природи (Bibb et al. 2012).

При досягненні стаціонарної фази росту, з-під репресії BldD вивільняється і ген транскрипційного фактора родини AraC/XylS, *adpA*. Спектр дії AdpA надзвичайно широкий, білок є позитивним регулятором як морфогенів, так і генів, задіяних в синтезі ВМ (Wolański et al. 2011; Wolanski, Jakimowicz, and Zakrzewska-Czerwinska 2012). Цікаво, що у деяких стрептоміцетів експресія *adpA* є залежна від певних речовин-автоіндукторів  $\gamma$ -бутиролактонової природи, як це докладно описано для *S. griseus*. Виділення речовин-автоіндукторів відбувається після досягнення колонією певної щільності (відчуття кворуму) та виснаження джерел живлення (Takano

2006; Horinouchi and Verru 2007). Одним із найвідоміших автоіндукторів є А-фактор, що його продукує *S. griseus*. Білком біосинтезу А-фактора є AfsA, рецептором його у клітині – білок AgrA, що за відсутності А-фактора зв'язує регуляторну ділянку гена *adpA* і репресує його. Після приєднання А-фактора, AgrA змінює конформацію, дисоціює від ДНК, і репресія *adpA* скасовується (Horinouchi and Verru 2007). Описана AgrA-залежна репресія не характерна для *bldH* (кодує ортолога AdpA) у *S. coelicolor*.

Експресія *adpA* контролюється на багатьох рівнях. Зокрема, мРНК *adpA* є субстратом для РНази III (білок AbsB); таким чином, за рахунок деградації мРНК *adpA*, запобігається надлишкова активність AdpA (Xu et al. 2010). Успішна експресія *adpA* залежить і від наявності продукту іншого *bld*-гена, а саме *bldA*, що кодує єдину тРНК, здатну декодувати найрідкісніший у стрептоміцетів лейциновий кодон UUA (Hackl and Bechthold 2015). Про ген *bldA* та його продукт докладніше мова йтиме згодом. ТТА-кодон міститься в кодувальній послідовності *adpA*, і трансляція його транскрипту неможлива за відсутності функціональної тРНК<sub>UAA</sub><sup>Лей</sup>. Таким чином відбувається трансляційна регуляція експресії *adpA* (Takano et al. 2003). Транскрипція *bldA*, в свою чергу, активується AdpA, створюється позитивна регуляторна петля (McCormick and Flärdh 2012).

AdpA активує експресію морфогенів, таких як *ramR* (теж ТТА-вмісний ген) у *S. coelicolor*. Показано, що RamR через активацію *ramCSAB*-оперону (Chater and Chandra 2006) веде до продукції гідрофобіну SapB – компоненту клітинної стінки повітряних гіфів, завдяки якому міцелій піднімається над поверхнею субстрату (McCormick and Flärdh 2012).

Шляхом зв'язування 5'-регіону *oriC*, AdpA перешкоджає приєднанню ініціаторного білка початку реплікації, DnaA, так пригнічуючи реплікацію ДНК (Wolanski, Jakimowicz, and Zakrzewska-Czerwinska 2012).

На багатих поживних середовищах і SapB, і чапліни продукуються *bld*-залежно, а за умов росту на мінімальному середовищі SapB не синтезується,

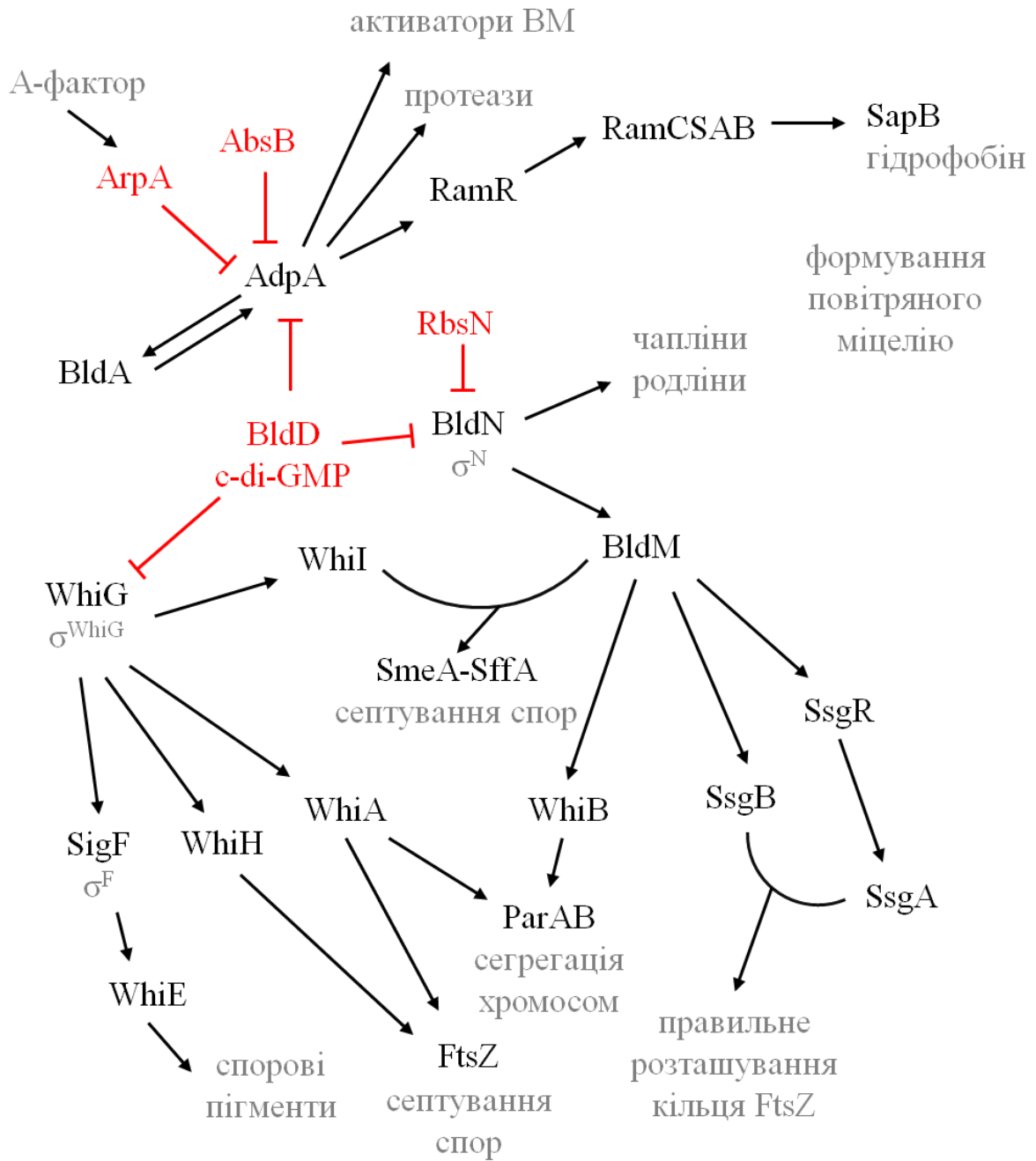
а продукція чаплінів є *bld*-незалежною. Тобто, існує як мінімум два регуляторні шляхи розвитку повітряних гіфів, реалізація яких залежить від умов середовища (Capstick et al. 2007).

Регулятори, що кодуються *whi*-генами, необхідні для нормального розвитку спор із повітряного міцелію. Вони поділяються на ранні гени (продукти задіяні в процесах росту та септування повітряних гіфів) та пізні гени (задіяні в дозріванні та набутті нормальної форми спор, синтезі спорових пігментів). Відповідно, морфологічний фенотип *whi*-мутантів може значно різнитися, залежно від того, на якому етапі зупинилося формування спор.

До ранніх генів споруляції відносять *whiG*, *whiA*, *whiB*, *whiI* гени. Для початку диференціації спор необхідно, щоб повітряний міцелій припинив ріст. У цьому процесі важливу роль відіграє ген *whiG*, що кодує сигма фактор, необхідний для перепрограмування метаболізму повітряних гіфів до споруляції, і що теж репресується білком BldD протягом вегетативного росту.  $\sigma^{\text{WhiG}}$  потрібний для експресії *whiH*, *whiI* та *whiA* (Kaiser and Stoddard 2011). WhiH є регулятором родини GntR і може відповідати на зміну концентрацій певних метаболітів. Показано, що WhiH індукує специфічний промотор споруляції *ftsZp2*, а FtsZ необхідний для септування спор (Flårdh et al. 2000). Ген *whiI* кодує орфанний регулятор відповіді, що в геномі знаходиться без гена власної кінази. Цікаво, для геномів стрептоміцетів характерний ще один схожий регулятор відповіді, кодований геном *bldM* (Bush et al. 2015). Відомо, що BldM може контролювати експресію двох груп генів, залежно від стану димеризації. Як гомодимер, BldM активує транскрипцію ранніх генів, необхідних для спорулювання, як-от *whiB*, *ssgB*, *ssgR*. SsgR далі активує експресію *ssgA*, а SsgA та SsgB, які разом необхідні для правильного розташування кільця FtsZ при септуванні спор. Як гетеродимер, BldM-WhiI активує експресію пізніх генів спорулювання, до яких входять оперон *smeA-sffA* (продукти беруть участь в септуванні спор) та

локус *whiE* (контролює біосинтез сірого полікетидного спорового пігменту) (Al-Bassam et al. 2014; Bush et al. 2015). Продукти генів *whiA* та *whiB* необхідні для початку транскрипції з промотора *parABp2*, асоційованого зі спорулюванням, що веде до утворення комплексу ParAB, необхідного для сегрегації хромосом (Jakimowicz et al. 2006). WhiA необхідний і для синтезу FtsZ (Flärdh et al. 2000). Можливо, WhiA здатний інгібувати  $\sigma^{\text{WhiG}}$ , як анти-сигма фактор (Kaiser and Stoddard 2011). Серед пізніх генів спорулювання є *sigF*, що кодує сигма фактор  $\sigma^{\text{F}}$ , є залежним від *whiG* і регулює експресію локусу *whiE*. Загальна схема регуляції морфогенезу стрептоміцетів подана на рис. 1.1.

**1.1.2. Регуляція синтезу вторинних метаболітів.** Стрептоміцети продукують надзвичайно різноманітні за хімічною природою антибіотики, як-от глікопептидні (блеоміцин, флеоміцин), аміноглікозидні (канаміцин, стрептоміцин, неоміцин), полікетидні (авермектин, кандидин, даунорубіцин, ністатин), тіопептидні (носигептид, тіострептон) та багато інших (Kieser et al. 2000). В першу чергу, хімічну будову ВМ визначають гени біосинтетичного кластеру, що кодують ферменти біосинтезу. Ці гени – структурні. Окрім них, в кластерах генів біосинтезу (КГБ) часто знаходяться і гени кластер-розташованих регуляторів (cluster-situated regulators, CSRs), найбільш специфічних та найнижчих в ієрархії регуляції біосинтезу ВМ. Ці регулятори виступають тією спільною ланкою між первинним та вторинним метаболізмом стрептоміцетів, яка сприймає сигнали загального фізіологічного стану клітини та, відповідно до них, визначає початок та рівень продукції того чи іншого ВМ (Liu et al. 2013). Та варто зазначити, що кластер-розташовані регулятори властиві не для всіх КГБ ВМ. Наприклад, таких не описано для КГБ моеноміцину в *S. ghanaensis* (Ostash, Saghatelian, and Walker 2007).



**Рис.1.1.** Загальна схема регуляції морфогенезу стрептоміцетів. Пояснення в тексті вище.

Для одного із найкраще вивчених стрептоміцетів, *S. coelicolor*, показаний синтез кількох ВМ за лабораторних умов: блакитно забарвленого актинородину (Act) та червоного ундецилпродигіозину (Red), кальцій-

залежного антибіотику, циклопентанового антибіотику метиленоміцину та неповністю охарактеризованого “криптичного полікетиду”. І це – із 29 КГБ ВМ, виявлених в результаті аналізу геному (Liu et al. 2013). Тобто, більшість із КГБ є криптичними. Далі докладніше розглянемо регуляцію біосинтезу Act.

Експресія КГБ Act повністю залежить від наявності білка ActII-ORF4, ген якого знаходить в межах кластеру *act*. Білок належить до родини стрептоміцетних регуляторів біосинтезу антибіотиків (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins, SARPs) (Wietzorrek and Bibb 1997). Експресія гена *actII-ORF4* контролюється регуляторами, глобальними та плейотропними, що сприймають сигнали первинного метаболізму. Наприклад, промоторна ділянка гена *actII-ORF4* є безпосередньою мішенню зв’язування, як мінімум, наступних регуляторних білків:

- AdpA, глобальний активатор початку морфогенезу та синтезу ВМ (den Hengst et al. 2010; Wolanski, Jakimowicz, and Zakrzewska-Czerwinska 2012; Makitrynskyu et al. 2013);
- LexA, глобальний регулятор відповіді на пошкодження ДНК (Iqbal et al. 2012);
- AbsA2, глобальний репресор синтезу ВМ. Регулятор відповіді AbsA2, разом із мембрано-локалізованою сенсорною гістидин кіназою AbsA1, є частиною двокомпонентної регуляторної системи (Anderson, Brian, and Champness 2001; Sheeler, MacMillan, and Nodwell 2005);
- DasR, репресор GntR-родини, відіграє плейотропну роль у регуляції первинного метаболізму, розвитку та синтезі ВМ. Аlostеричними ефекторами DasR є метаболіти N-ацетилглюкозаміну, а його активність і відповідь на наявність ефектора залежить від зовнішніх умов. Репресія кластер-розташованих регуляторів припиняється при виснаженні джерел живлення (Urem et al. 2016);

- AtrA, регулятор родини TetR, активатор транскрипції *actII-ORF4*; також регулює і білки, асоційовані з метаболізмом ацетил-КоА, попередника актинородину (Uguru et al. 2005; Liu et al. 2013);
- DraR і AfsQ1, регулятори відповіді щодо надлишку нітрогену. Обидва білки є частиною двокомпонентних регуляторних систем DraRK (Yu et al. 2012) та AfsQ1Q2 (Wang et al. 2013);
- ROK7B7, репресор ксилозного оперону (Neo et al. 2008).

Не лише перераховані регулятори контролюють продукцію ВМ. Наприклад, присутність TTA-кодону в гені *actII-ORF4* робить його експресію трансляційно-залежною від присутності тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> (Fernández-Moreno et al. 1991; Gramajo, Takano, and Bibb 1993). Синтез ВМ підлягає контролю і з боку системи виникнення суворості відповіді. За умов дефіциту амінокислот, бактерії продукують сигнальні гуанозин тетрафосфати (ppGpp) та пентафосфати (pppGpp), що, шляхом зміни вибіркості кору РНК-полімерази зв'язування сигма-факторів, інгібують експресію рРНК та тРНК і активують інші гени, задіяні у виникненні суворості відповіді. Білок синтезу (p)ppGpp RelA активується, коли через недостатність амінокислот до А-сайту рибосом приєднуються неаміноацильовані тРНК. У *S. coelicolor* наднормове накопичення (p)ppGpp веде до надсинтезу Act і Red, можливо, через підвищення афінності РНК-полімерази до сигма-факторів, асоційованих із синтезом антибіотиків (Hesketh, Sun, and Bibb 2001; Sun, Hesketh, and Bibb 2001; Andrew Hesketh et al. 2007).

Як бачимо, процеси, що ведуть до зміни метаболізму стрептоміцетів, від вегетативного росту до морфологічної диференціації та синтезу ВМ, є надзвичайно складними. Багато ланок регуляторів, як-от деякі складові *bld*-каскаду, є спільними для обох процесів. Також, метаболізм стаціонарної фази росту контролюється і низкою білків, що визначають забезпечення клітини джерелами живлення. В основному, більшість описаних регуляторів

здійснюють свій контроль на рівні транскрипції. Однак, транскрипція – лише один із етапів реалізації генетичного матеріалу. Разом з тим, не варто виключати посттранскрипційні, трансляційні та посттрансляційні регуляції експресії генів, що, хоч і є менш вивченими, однак відіграють не менш важливу роль у контролі метаболізму.

Кілька добре вивчених прикладів впливу на трансляційний рівень реалізації генетичного матеріалу через зміни структури рибосом (мутації білка S12) чи тРНК (посттранскрипційні модифікації основ тРНК та вже згаданий приклад *bldA*-регуляції) докладніше наведено далі.

## 1.2. Мутації гена *rpsL* та їхній фенотиповий прояв

Бактерійна рибосома (70S) є рибонуклеопротеїном, має молекулярну масу 2,5 МДа і діаметр 200-250 Å, складається із двох асиметричних 50S і 30S субодиниць. У *E. coli* до складу малої 30S субодиниці входять 16S рРНК (1542 нуклеотиди) і 21 рибосомний білок. 30S субодиниця відповідає за ініціацію трансляції та містить сайти зв'язування трьох факторів ініціації, а також центр декодування мРНК. Велика 50S субодиниця містить 23S рРНК (2904 нуклеотиди), 5S рРНК (120 нуклеотидів) та 34 білки. Субодиниця каталізує формування поліпептидів, містить сайти зв'язування факторів елонгації трансляції і формує тунель виходу новоствореного пептиду (Poehlsaard and Douthwaite 2005; Byrgazov, Vesper, and Moll 2013).

У моніторингу правильності підібраних пар кодон-антикодон при трансляції вирішальну роль відіграє їх взаємодія із консервативними залишками 16S рРНК – A1492 та A1493, особливо для перших двох пар. Якщо тРНК коректно розшифровує кодон мРНК, рибозо-фосфатні кістяки нуклеїнових кислот набувають правильної геометрії для утворення водневих зв'язків із залишками A1492 та A1493. Залишки переміщуються, що запускає глобальні перебудови 30S (транзицію до закритого стану), а потім і 50S субодиниць, необхідні для переміщення зарядженої тРНК до пептидил-



трансферазного сайту рибосоми з подальшим формуванням пептидного зв'язку. Якщо ж спаровування між кодоном мРНК та антикодоном тРНК неправильне, просторова геометрія такого комплексу унеможливилює утворення зв'язків із A1492 та A1493. Необхідні для включення тРНК перебудови рибосоми в такому разі не відбуваються (Poehlsgaard and Douthwaite 2005).

Одним із життєво важливих компонентів 30S субодиниці є білок S12, продукт гена *rpsL* (Post and Nomura 1980; Kimura and Kimura 1987). Білок бере участь у згаданих процесах перебудови рибосоми і частково в процесі селекції тРНК при розпізнаванні кодонів мРНК, оскільки є частиною декодувального центру рибосоми (Demirci et al. 2013). Перші мутанти *E. coli* за геном *rpsL*, які вдалось виділити майже 70 років тому, були відібрані серед клонів спонтанно стійких до стрептоміцину. Мутанти несли, головню, точкові мутації *rpsL*, що вели до амінокислотних заміщень в білку S12. Значні порушення структури цього білка були летальними.

Залежно від виду заміщення, основні біологічні ефекти мутацій *rpsL*, що часто є плейотропними і пов'язаними, можна поділити на кілька груп:

**1) Зміна точності трансляції.** Зазвичай, частота помилкового включення амінокислот для бактерійних рибосом знаходиться в межах  $10^{-4}$ - $10^{-3}$ . Однак, вносячи зміни в структуру рРНК чи рибосомних білків, таку частоту можна суттєво змінити. Наприклад, для мутантних штамів *E. coli* за геном *rpsL* із заміщеннями T2K (тут і далі мутації позначаються за амінокислотним кодом, відповідно до того, які заміщення в первинній структурі білка S12 *E. coli* вони спричинюють), K42T, R53S, R85H характерний фенотип обмеження помилок включення (рибосоми стають точніші). Водночас, рибосоми із заміщеннями P21R, K43I, V62L, T57S в S12 є більш схильні до містрансляції (т.зв. *ribosome ambiguity* або *ram*-фенотип) (Agarwal, Gregory, and O'Connor 2011). Для рибосом *S. coelicolor* з мутаціями

K43N, K88E, P91S описана нижча частота містрансляції (Okamoto-Nosoya, Nosaka, and Ochi 2003).

За точність трансляції значним чином відповідає декодувальний центр, адже саме його локальні структурні перебудови під час вибору тРНК запускають глобальний перехід рибосоми до закритої конформації, необхідної для включення та переміщення аміноацил-тРНК. S12 є частиною декодувального центру, і перебудови структури цього білка потенційно впливають на процес прочитання кодонів, бо змінюють геометрію взаємодії компонентів 30S субодиниці, динаміку її переходу від відкритого стану до закритого, а також взаємодію рибосоми з третинним комплексом аміноацил-тРНК – EF-Tu – ГТФ (Agarwal, Gregory, and O'Connor 2011).

**2) Зміна стійкості до деяких аміноглікозидних антибіотиків, мішенню яких є 30S субодиниця і, зокрема, білок S12.** Одним із таких антибіотиків є стрептоміцин, що зв'язується з центром декодування рибосоми, а саме з 16S рРНК та залишком K45 білка S12, та спричинює вибір рибосоною неправильної аміноацил-тРНК, тобто містрансляцію. Відбувається це тому що стрептоміцин стабілізує *ram*-стан А-сайту рибосоми та підвищує його афінність до тРНК, стимулюючи ініціацію приєднання неспоріднених тРНК та ускладнюючи перевірку правильності кодон-антикодонової пари (Carter et al. 2000; Tenson and Mankin 2006). Значна частина отриманих мутантів *E. coli* зі зміненою стійкістю до стрептоміцину містила *rpsL* мутації. Серед таких мутантів виявили не лише стрептоміцин стійкі ( $Sm^R$ ), але і залежні ( $Sm^D$ ) чи псевдозалежні ( $Sm^P$ ) від стрептоміцину.  $Sm^D$  штами для росту потребують стрептоміцину, а  $Sm^P$ , хоч не є залежними, однак ростуть значно повільніше без антибіотика (Ruusala et al. 1984).  $Sm^D$  мутації спричинюються заміщеннями P90R та P90L у *E. coli* (Holberger and Hayes 2009), *Salmonella typhimurium* (Björkman et al. 1999) і *Thermus thermophilus* (Carr, Gregory, and Dahlberg 2005), а  $Sm^P$  – заміщеннями R85C та R85H у *T. thermophilus* (Gregory, Cate, and Dahlberg 2001). У фітопатогена

*Erwinia carotovora* заміщення K43T, K43N, K43R в білку S12 вели до виникнення стійкості до стрептоміцину (Barnard et al. 2010). Ідентичні ефекти викликають, наприклад, заміщення K88E у *S. coelicolor*, *S. lividans* (Shima et al. 1996), K43N і K88M у *S. avermitilis*, K43M і R86C у *Saccharopolyspora erythraea* (Tanaka et al. 2009) та K43R і K88R у промислового штаму *S. albus* SAM-X (Tamehiro et al. 2003) і ін.. Мутанти *S. coelicolor*, стійкі до іншого аміноглікозиду, паромоміцину (приєднується до h44 спіралі 16S рРНК, спричинює перелокалізацію A1492 і A1493, і, як наслідок, знижує енергію для їх переміщення при виборі тРНК, що полегшує включення неспоріднених тРНК (Carter et al. 2000)), містили заміну P91S чи вставку G192 (залишок гліцину в 92-ій позиції білка S12) (Wang et al. 2009). Також виявлено, що *in vitro* рибосоми *E. coli* із заміщеннями K42A та R53A є стійкими до містрансляційного впливу паромоміцину (Sharma et al. 2007).

Механізми виникнення зміненої стійкості до стрептоміцину через мутації гена *rpsL* пояснюють змінами динаміки та акуратності мутантних рибосом. Мутації, що підвищують акуратність рибосом, нівелюють *ram*-стан, спричинений стрептоміцином. При цьому, якщо ефект мутації проявляється слабо – виникає ефективна гіперакуратність рибосом і, як наслідок, стійкість до містрансляційної дії антибіотика. Якщо ж акуратність виявляється сильно – процес декодування настільки дестабілізується, що виникає необхідність в наявності стрептоміцину, оскільки без його *ram*-впливу трансляція є практично неможливою. Тоді виникає залежність від стрептоміцину (Carter et al. 2000). Так, Sm<sup>D</sup> мутація S12 знижує афінність спорідненого третинного комплексу до рибосоми, перешкоджає вибору тРНК через дестабілізацію будови декодувального центру та порушує ГТФазну активацію EF-Tu. Стрептоміцин нівелює ці ефекти (Demirci et al. 2013).

**3) Зміна темпів росту та синтезу білка.** Часто, штами з фенотипом обмеження помилок характеризуються зниженими темпами росту та синтезу білка, оскільки гіперакуратні рибосоми, як правило, повільніші

(Agarwal, Gregory, and O'Connor 2011). Цікавим прикладом є темп елонгації рибосом  $Sm^P$  штаму. За відсутності стрептоміцину рибосоми характеризувались гіперакуратністю, що сповільнює швидкість синтезу білків. Присутність стрептоміцину спричинює підвищення рівня містрансляції цих рибосом, що частково відновлювало і темп елонгації синтезу білків, і швидкість росту мутанта (Ruusala et al. 1984).

Було показано, що рибосоми *S. coelicolor* з мутаціями K88E та P91S активніше синтезують білок, особливо на пізніх стадіях клітинного циклу (як-от на пізній стаціонарній фазі росту) в той час як синтез білка рибосомами дикого типу різко падає (Nosaka, Xu, and Ochi 2006; Okamoto-Nosoya, Nosaka, and Ochi 2003). При цьому, таке активування білкового синтезу було яскраво вираженим і під час голодування за амінокислотами, та не залежало від здатності мутантів накопичувати ppGpp (Okamoto-Nosoya, Nosaka, and Ochi 2003). Механізми активації білкового синтезу на пізніх стадіях росту пояснюють кількома властивостями K88E-рибосом. По перше, 70S-комплекс таких рибосом стабільніший ніж у дикого типу, навіть за умов нестачі амінокислот, що дає змогу активніше синтезувати білок (Okamoto-Nosoya, Nosaka, and Ochi 2003). По-друге, виявлено збагачення фракції деяких факторів трансляції у клітинах мутантного K88E штаму. Зокрема, виявлено вищий рівень фактору рециклінгу рибосом (ribosome recycling factor, RRF) у фракції S-150, отриманій з мутантних клітин після стаціонарної фази росту. RRF стимулює білковий синтез та продукцію вторинних метаболітів у *S. coelicolor* (Nosaka, Xu, and Ochi 2006).

Деякі із *rpsL* мутацій асоційовані і зі зміненим фітнес-коштом (fitness cost, здатність виживати та розмножуватись за певних умов). Зокрема, стрептоміцин-стійкі штами *S. typhimurium* із заміщеннями K42N і P90S на багатих середовищах ростуть повільніше, ніж дикий тип, однак характеризуються добрим ростом на бідніших джерелах карбону (Paulander, Maisnier-Patin, and Andersson 2009).

4) **Зміна якісного чи кількісного пулу новосинтезованих білків, що приводить до перебудов метаболізму.** Зокрема, це стосується активації чи пригнічення експресії певних білків або груп білків, що впливають на зміну первинного чи вторинного метаболізму. Наприклад, вже згаданий мутант *S. typhimurium* із заміщенням K42N нездатний індукувати експресію сигма фактора RpoS ( $\sigma^S$ ), що необхідний для експресії генів стаціонарної фази росту та відповіді на стрес. Відсутність індукування  $\sigma^S$  у відповідь на бідні джерела карбону і дозволяла мутанту уникнути затримки росту (Paulander, Maisnier-Patin, and Andersson 2009).

Мутанти *E. carotovora* із заміщеннями K43 продукували менше  $\beta$ -лактамного вторинного метаболіту через знижену транскрипцію кворум-сенсинг-залежних генів біосинтезу. При цьому, заміщення K43N, K43T приводили і до зниження продукції екзоензимів (як наслідок – зниження вірулентності), а протеомний аналіз мутанта K43T виявив зміни в рівнях експресії груп певних внутрішньоклітинних білків (Barnard et al. 2010).

Деякі мутації за геном *rpsL* стрептоміцетів впливали і на вторинний метаболізм. Наприклад, стрептоміцин стійкий мутант *S. lividans* ТК-24 (*str-6*) (Norwood et al. 1985) здатний синтезувати актинородин за умов, коли батьківський штам ТК-21 його не синтезує. Як пізніше виявилось, стійкість ТК-24 до стрептоміцину була результатом мутації A262→G гена *rpsL*, що спричинила заміну K88E в структурі білка S12 (Shima et al. 1996). Що цікаво, заміна в цьому ж положенні, але на іншу амінокислоту, K88R, описана для іншого мутанта *S. lividans* КО-487, до активації продукції актинородину не приводила (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003). Мутанти *S. coelicolor* K88E, K88EGI92 (поєднання двох мутацій) і K88E+P91S, окрім вищезгаданих стійкостей до стрептоміцину і паромоміцину, ще й надсинтезували актинородин (Wang et al. 2009), а похідний промислового штаму *S. albus* із заміщенням K88R надсинтезував саліноміцин (Tamehiro et al. 2003). Деякі заміщення позицій S12 K43 і K88 у *S. avermitilis* приводили до підвищення

синтезу олігоміцину, однак пригнічували синтез авермектину, а *S. erythraea* із заміщенням K43N виявив підвищений рівень транскрипції гена ключового регулятора *bldD* на пізніх стадіях росту, чим і можна пояснити надпродукцію еритроміцину цим штамом (Tanaka et al. 2009).

Варто зазначити, що детальні механізми, що ведуть від мутацій гена *rpsL* до змін вторинного метаболізму стрептоміцетів, не є описаними, оскільки включають значну кількість ланок та можуть змінювати експресію багатьох генів на різних рівнях. Тим не менше, для штаму *S. coelicolor* K88E надсинтез актинородину пояснюють вищою стабільністю рибосом та їх здатністю до активного синтезу білків на пізніх етапах росту культури, коли активно експресуються структурні та регуляторні гени синтезу вторинних метаболітів (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003; Hosaka, Xu, and Ochi 2006). Також вплив на продукцію вторинних метаболітів визначається і характером амінокислотних замінів білка S12, оскільки не всі точкові мутації, і навіть не всі заміни однієї і тієї ж позиції, проявляються однаково (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003). Очевидно, навіть найменші зміни структури декодувального центру рибосоми впливають на експресію значних груп генів.

Амінокислотні заміни у білку S12 описані для низки організмів. При цьому, вияв однієї і тієї ж мутації може бути узагальненим для багатьох бактерій (як-от стійкість до антибіотиків), а може і відрізнитись, якщо до уваги брати відмінності метаболізму (наприклад, синтез вторинних метаболітів стрептоміцетів). Так чи інакше, вияв мутацій в першу чергу залежить від того, як вони порушують структуру декодувального центру рибосоми, тобто від амінокислотних замінів в білку S12. Адже мутантні рибосоми беруть участь у синтезі всіх білків клітини, в тому числі і регуляторних факторів, зміни експресії яких, в свою чергу, міняють експресію низки генів-мішеней. Комплекс таких змін зумовлює фенотипи, спричинені *rpsL*-мутаціями.

### 1.3. Регуляторна роль тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> та кодону ТТА у стрептоміцетів

Одним із добре вивчених прикладів трансляційної регуляції є вже згадана *bldA*-регуляція експресії генів, описана для стрептоміцетів.

Мутація за геном *bldA* картована Хопвудом ще у 1967 році як *s48* (*bldA1*) (Norwood 1967). Детальніші дослідження показали, що мутантний штам *S. coelicolor* формувал гладкі колонії (без утворення повітряного міцелію чи спор) при рості на одних джерелах карбону (глюкоза, манноза, та целобіоза), але морфологічно не відрізнявся від дикого типу на інших (арабіноза, галактоза, мальтоза, гліцерол та манітол). Однак, незалежно від середовища, мутант не продукував пігментів, характерних для дикого типу (Merrick 1976; Leskiw et al. 1993). Аналізуючи мутацію *bldA*, виявили, що ген, в якому вона картувалась, кодує лейцинову тРНК для кодону UUA (Lawlor, Baylis, and Chater 1987). Згідно з правилами розшифрування кодонів (Crick 1966), жодна інша тРНК стрептоміцетів не повинна розкодовувати UUA кодон, що було підтверджено результатами секвенування геномів (Bentley et al. 2002). Тому припустили, що наявність тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> відіграє важливу роль для розвитку стрептоміцетів, можливо, через вплив на трансляцію шляхом зміни кількості чи ступеня модифікованості наявної тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>. Остання важлива для експресії генів, необхідних для нормального розвитку *S. coelicolor*, що містять ТТА кодони (Lawlor, Baylis, and Chater 1987). Пізніше експериментально доведено, що експресія ТТА-вмісних генів є залежною від функціонування *bldA* (Leskiw et al. 1991).

Для GC-багатих геномів стрептоміцетів (71-75% (Ventura et al. 2007; Barka et al. 2016)) лейциновий кодон ТТА найрідкісніший. Зокрема, в геномі *S. coelicolor* частота вживання цього кодону становить 0,006%, що є лише 6% від розрахованої теоретично (0,095%). Із 7825 хромосомних генів *S. coelicolor* ТТА-кодони властиві для 145 (Li et al. 2007). Внутрішньогенно, ТТА кодони зазвичай розміщені ближче до старт-кодонів, ніж до стоп-кодонів, що має

сенс для ефективного переривання трансляції при недостатності тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> (Chater and Chandra 2008).

Мутанти стрептоміцетів за геном *bldA* є цілком життєздатними і не відрізняються за параметрами вегетативного росту від штамів дикого типу. Тобто, функціональна тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> не є життєво необхідною, а ТТА-вмісні гени не життєво важливі. Очевидний фенотип таких мутантів – кондиційна відсутність повітряного міцелію та спор, нездатність синтезувати деякі антибіотики – пояснюється наявністю ТТА кодонів у генах, продукти яких необхідні для нормального морфологічного розвитку та вторинного метаболізму. Зокрема, у *S. coelicolor* ТТА-вмісними та *bldA*-залежними є гени регуляторів *adpA* та *anfR*, необхідні для розвитку повітряного міцелію, а також *actII-ORF4*, позитивного регулятора кластеру біосинтезу Act (Fernández-Moreno et al. 1991), та *redZ*, позитивного регулятора біосинтезу Red (White and Bibb 1997; Guthrie et al. 1998). Загалом, синтез багатьох вторинних метаболітів стрептоміцетів є *bldA*-залежним (Chandra and Chater 2008). Однак функції низки інших ТТА-вмісних генів є невідомі. Наприклад, нокаут 21 ТТА-вмісного гена *S. coelicolor* не привів до виявлення видимих фенотипів за досліджуваних умов (Li et al. 2007). При умові надекспресії гена *bldA* у різних штамх слабоспорулюючих стрептоміцетів не виявили значного ефекту на морфологію, однак у деяких спостерігали активацію експресії криптичних сполук та надекспресію тих метаболітів, що вже продукувались. Такі ефекти пояснюють значно ефективнішою трансляцією UUA-кодонів за умови вищої внутрішньоклітинної концентрації тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> (Gessner et al. 2015).

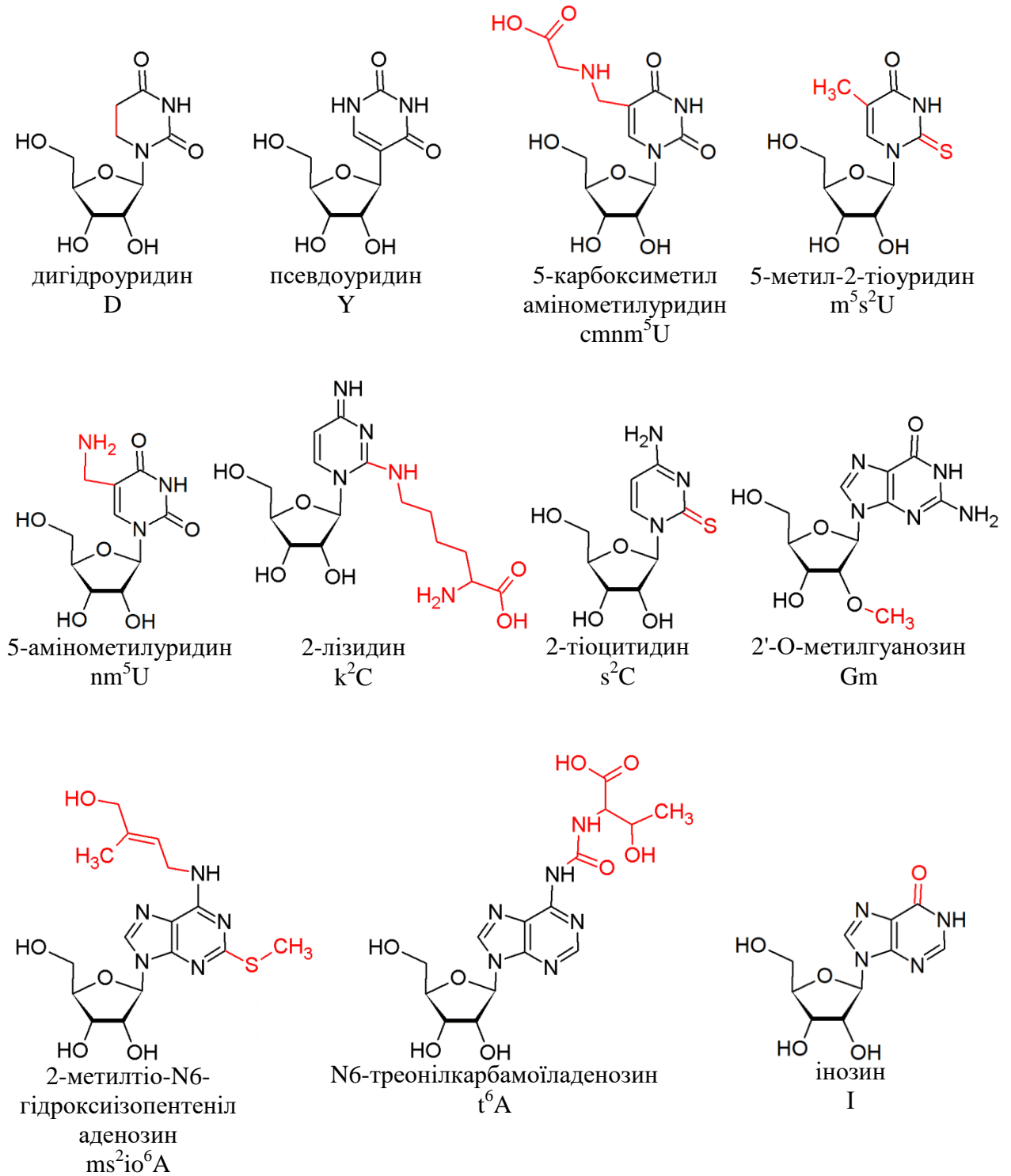
Раніше показано, що рівень накопичення тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> зростає перед переходом культури до стадії формування повітряного міцелію (Lawlor, Baylis, and Chater 1987; Leskiw et al. 1993). Тим не менше, транскрипти гена *bldA* виявлено на ранніх стадіях росту *S. coelicolor*, тобто часової затримки в транскрипції гена немає (Pettersson and Kirsebom 2011). Але, згідно інших



досліджень, трансляція транскриптів, що містять UUA-кодон, є неефективною на ранніх стадіях росту, однак зростає з підвищенням експресії *bldA* (Leskiw et al. 1993; Kataoka, Kosono, and Tsujimoto 1999; Rebets et al. 2006). Причини такої запізнілої трансляції UUA-вмісних мРНК можуть бути у пізньому дозріванні тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. Наприклад, через інгібування за допомогою антисенс РНК на ранніх стадіях росту (Leskiw et al. 1993). Звісно, не варто виключати і те, що тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> може запізнити піддаватись аміноацилюванню, або ж необхідні для її нормального функціонування посттранскрипційні модифікації нуклеозидів синтезуються із затримкою.

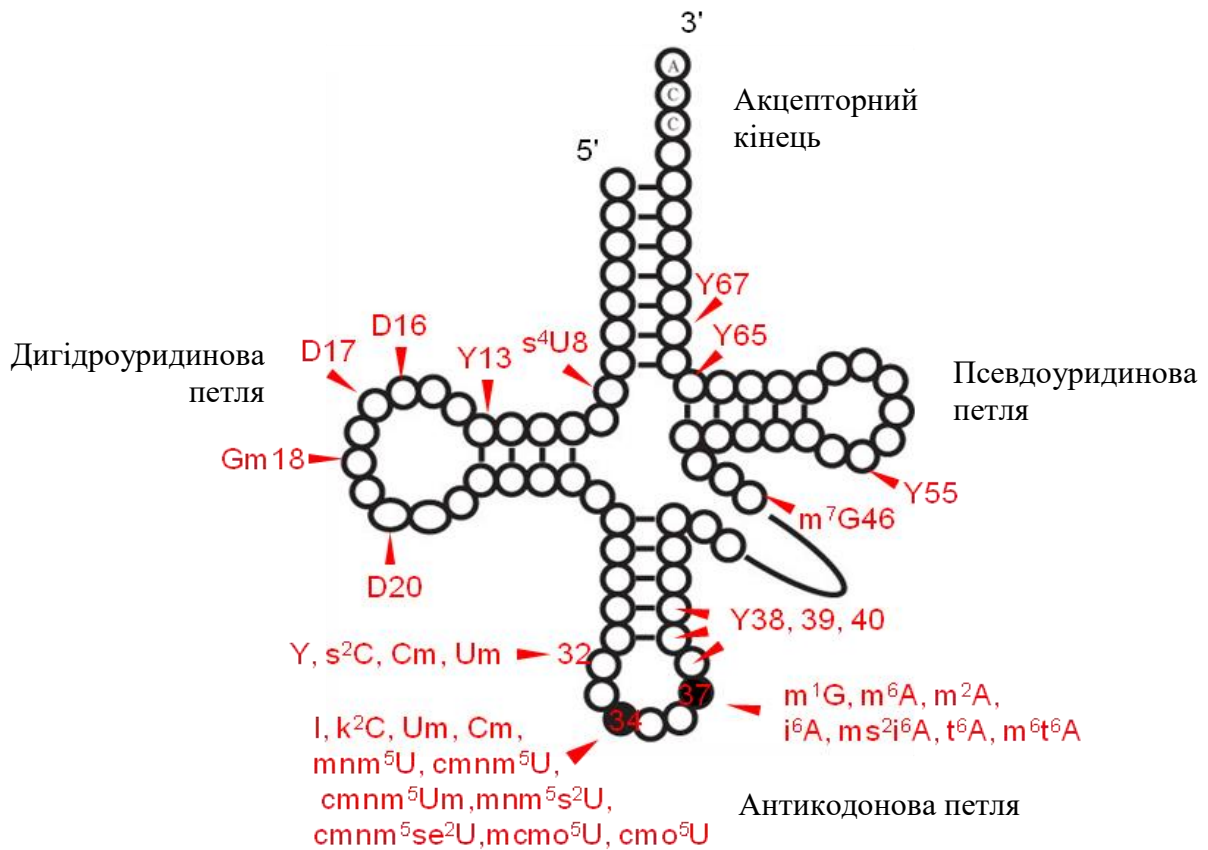
#### 1.4. Посттранскрипційні модифікації нуклеозидів тРНК

Трансферні РНК наявні в усіх живих організмів і є адапторними молекулами між кодонами мРНК і амінокислотами (Banerjee et al. 2010; Shepherd and Ibba 2015). Однією із важливих умов нормального дозрівання і функціонування молекул тРНК є посттранскрипційні модифікації їхніх нуклеозидів. Відомо понад 150 різноманітних хімічних модифікацій, характерних для основ тРНК, усі з яких є похідними аденозину, гуанозину, цитидину та уридину. До основних типів модифікацій можна віднести метилювання різноманітних позицій нуклеозидів, утворення тіо-похідних, гідроксилування, приєднання треонілкарбамоїлових, ізопентинілових, чи лізидинових залишків, синтез інозину, псевдоуридину, дигідроуридину, а також інші різноманітні поєднання (рис.1.2) (Voccaletto et al. 2018). Ці модифікації потребують значної кількості ферментів для утворення. Залежно від геному, від 1 до 10% генів, що кодують білки, задіяні в біосинтетичних шляхах модифікації тРНК (Basma El Yacoubi, Bailly, and de Crécy-Lagard 2012; Shepherd and Ibba 2015). При цьому, модифікуються різні позиції молекули тРНК, а площа поверхні молекули, завдяки модифікаціям, може збільшуватись до 20% (Vjörk et al. 1987).



**Рис.1.2.** Хімічна структура деяких модифікованих нуклеозидів тРНК.

На рис. 1.3. наведені деякі відомі модифікації та їх позиції для тРНК *E. coli* (адаптовано з (Shepherd and Ibba 2015)). Залежно від позиції та типу хімічної модифікації нуклеозидів, їхня роль для молекули тРНК може бути



**Рис. 1.3.** Позиції деяких відомих модифікацій тРНК *E. coli*. Аббревіатури специфічних груп: m, c, n, o, t, i, k, s для метил-, карбон-, аміно-, окси-, треонін-, ізопентеніл-, лізин- та тіо-груп, відповідно. Також: D – дигідроуридин, I – інозин, Y – псевдоуридин. Розміщення позицій подано схематично. Антикодон включає позиції 34, 35, 36. Адаптовано з (Shepherd and Ibba 2015).

різна. Їх можна розділити на наступні групи за значенням:

1) **Стабілізація динаміки трансляції та ефективне розкодування кодонів.** Це, переважно, модифікації, що знаходяться в антикодоновій петлі тРНК та впливають на процеси трансляції і росту. Так, штами дріжджів, що не формують модифікації I34 (інозин в 34-ій позиції тРНК, важливий для спаровування з третьою позицією кодонів) нежиттєздатні (Gerber and Keller 1999); ті, що не утворюють  $m^1G37$  і  $t^6A$  – проявляють погану життєздатність, а для *E. coli* модифікація  $t^6A37$ ,

характерна для тРНК, що розкодовують ANN-кодони, є життєво необхідною (Bjork et al. 2001; El Yacoubi et al. 2009; Zhang et al. 2015); при відсутності модифікації і<sup>6</sup>A37 – трансляція є частково дефектною для дріжджів (Laten, Gorman, and Bock 1978; Dihanich et al. 1987), а мутанти *E. coli*, що не формують модифікації ms<sup>2</sup>і<sup>6</sup>A, погано експресують гени, багаті на лейцинові UUX кодони (Aubee, Olu, and Thompson 2016, 2017).

2) **Підтримання стабільності молекул тРНК за різних умов, зокрема, за підвищення температур.** Більшість модифікацій структури тРНК (поза антикодоною петлею) необхідні для підтримання нормального фолдингу і стабільності молекул. Наприклад, для дріжджів це модифікація T54, відсутність якої знижує температуру плавлення молекули тРНК<sup>Фен</sup> та тРНК<sup>Мет</sup> на 2-6°C (Davanloo et al. 1979; Sengupta et al. 2000). Загалом, модифікації m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (s<sup>2</sup>T) в позиції 54 Т-петлі відіграють важливу роль при підтриманні синтезу білків за умов високих температур. У термофілів *Thermus thermophilus* і *Pyrococcus furiosus* майже всі тРНК містять m<sup>5</sup>U54 чи m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U54, а делеційний мутант *T. thermophilus*, що не утворює 2-тіогрупи проявляє температурно-чутливий фенотип (Shigi 2014). Відсутність m<sup>1</sup>A9 в тРНК<sup>Ліз</sup> людини веде до формування її альтернативної структури (Helm et al. 1999).

3) **Розпізнавання молекул тРНК аміноацил-тРНК-синтазами.** Деякі модифікації різних позицій слугують своєрідними “ідентифікаторами” тРНК при приєднанні до них відповідних амінокислот аміноацил-тРНК-синтазами. Наприклад, m<sup>1</sup>G<sub>37</sub> в тРНК<sup>Асн</sup> запобігає її зв’язуванню з аргініном (Pütz et al. 1994). Приєднання залишку лізидину до позиції 34 тРНК<sup>Мет</sup> визначає приєднання до неї ізолейцину, а не метіоніну; така тРНК декодує ізолейциновий кодон AUA (Muramatsu et al. 1988; Suzuki and Miyauchi 2010; Numata 2015).

Незважаючи на те, що значна частина модифікацій тРНК виявлена ще в 1970-х роках (Chang, Roth, and Ames 1971; Bruni et al. 1977; Vold, Lazar, and

Gray 1979), лише відносно недавно, завдяки вдосконаленню технік мас-спектрометрії та глибинного секвенування, почали досліджувати важливу роль модифікацій тРНК для метаболізму клітини.

Однією із перших описаних посттранскрипційних модифікацій тРНК була  $ms^2i^6$  модифікація аденозину, що знаходиться в позиції 37 більшості тРНК (з 3'-кінця антикодону), які розкодовують ті кодони, що починаються з U (Schweizer, Bohleber, and Fradejas-Villar 2017). Для *E. coli* згадана модифікація утворюється в два етапи. Перший крок контролює фермент MiaA (тРНК (аденозин (37)-N6)-диметилалілтрансфераза), полягає в утворенні N6-ізопентеніладенозину ( $i^6A$ ). Наступний фермент MiaB (тРНК (N6-ізопентеніл аденозин (37)-C2)-метилтіотрансфераза) використовує продукт каталізу MiaA як субстрат та тіометилує позицію 37 з утворенням 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенозину ( $ms^2i^6A$ ). Якщо в *E. coli* цей етап є кінцевим, то для *Salmonella typhimurium* описана ще одна реакція – гідроксилювання ізопентинілового залишку – що каталізує MiaE (2-метилтіо-N6-ізопентиніладенозин (37) гідроксилаза). При цьому, MiaE розпізнає як субстрат  $i^6A$  та  $ms^2i^6A$  у складі тРНК. Кінцевими продуктами Mia-контрольованої модифікації A37 є N6-(*цис*-гідроксиізопентеніл) аденозин ( $io^6A$ ) і 2-метилтіо-N6-(*цис*-гідроксиізопентеніл) аденозин ( $ms^2io^6A$ ), залежно від умов росту (Persson and Björk 1993).

Бактерії, дефектні за *mia*-генами, життєздатні, але проявляють специфічні фенотипи. Наприклад, для *miaA*-мутанта *S. typhimurium*, що взагалі не формує модифікацій A37, характерні знижені темпи росту та елонгації трансляції (Ericson and Björk 1986). Мутант за геном *miaE*, що не здатний каталізувати гідроксилювання  $ms^2i^6A$ , не росте на інтермедіатах циклу трикарбонних кислот, а саме на сукцинаті, фумараті чи малаті, як на джерелах карбону (Persson et al. 1998). У мутантів *E. coli* за геном *miaA* порушена трансляція кількох UUX-багатих генів, при цьому, відсутність MiaA-контрольованої модифікації або безпосередньо впливає на

розкодовування UUX-кодонів, або блокує синтез інших посттранскрипційних модифікацій, необхідних для трансляції UUX-кодонів тРНК (Aubee, Olu, and Thompson 2016, 2017).

Отже, посттранскрипційні модифікації тРНК є невід'ємною складовою дозрівання молекул тРНК, підтримання їх просторової структури, стабільності, нормалізації процесів впізнавання і зчитування кодонів, а також ідентифікації молекул тРНК аміноацил-тРНК-синтазами. Роль цих модифікацій відносно добре вивчено на модельних об'єктах, як-от дріжджі чи кишкова паличка, але практично нічого невідомо про присутність та фізіологічну роль таких модифікацій у тРНК актинобактерій, зокрема і для стрептоміцетів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали досліджень

**2.1.1. Штами бактерій та конструкти ДНК.** Усі штами бактерій, використані в цій роботі, перераховані в Додатку Б. Використані конструкти ДНК (вектори, плазміди, косміди, VACs) перераховані в Додатку В. Праймери перераховані в Додатку Г.

**2.1.2. Середовища, реактиви та ферменти.** Склад середовищ, що використовували для культивування мікроорганізмів, подано в Додатку Д.

За потреби, для селекції мікроорганізмів до середовища додавали наступні антибіотики: канаміцину сульфат, спектиномицину гідрохлорид (виробництва корпорації “Артеріум”), гігроміцин В (Roth), натрієва сіль ампіциліну, апраміцину сульфат, налідиксова кислота, натрієва сіль фосфоміцину, тіострептон, стрептоміцину сульфат (все перелічене – від Sigma-Aldrich). Антибіотики розчиняли в дистильованій воді. Для виявлення  $\beta$ -галактозидазної активності використовували X-Gal, а для виявлення  $\beta$ -глюкуронідазної активності – X-Gluc (усе – від Thermofisher Scientific). Для індукції арабінозного промотора використовували арабінозу (Promega).

Для приготування різноманітних буферів та розчинів використовували: ДМСО, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, LiCl, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COOK, CH<sub>3</sub>COONa, NaOH, HCl, тріс (Promega), ЕДТА (Реахим), ДСН, дитіотреїтол, тритон X-100 (усе – від Sigma-Aldrich), р-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкуронід (Thermofisher Scientific). Для руйнування клітинної стінки стрептоміцетів використовували лізоцим (Sigma-Aldrich). Для виділення та аналізу нуклеїнових кислот використовували Aqua-фенол (Roth), етанол, ізопропанол, агарозу (Fisher Bioreagents), бромфеноловий синій, етидію

бромід. Для екстракції та аналізу вторинних метаболітів стрептоміцетів, використовували метанол, етил-ацетат, хлороформ, бутанол, силікагелеві пластинки.

Ферменти (Thermofisher Scientific, NEB) використовувались за вказаних виробниками умов (комерційні буфери).

## 2.2. Методи досліджень

**2.2.1. Культивування мікроорганізмів.** Штами мікроорганізмів культивували на твердих агаризованих та в рідких середовищах SFM, MM (з манітолом – MMM, з глюкозою – MMG), SMMS, R5 (Kieser et al. 2000); SG1, SG2, ISP3, GYM (Koshla et al. 2017), TSB (та агаризоване TSA), LB (та агаризоване LA). Штами *S. albus* культивували при 30°C (а також деякі при 37°C та 42°C для індукування теплового шоку), штами *E. coli* при 37°C та 30°C, *B. cereus* та *Candida famata* – при 30°C.

За необхідності додавали антибіотики до кінцевої концентрації: канаміцин – 50 мкг/мл, апраміцин – 50 мкг/мл, гігроміцин – 100 мкг/мл, спектиноміцин – 100 мкг/мл, стрептоміцин – 100 мкг/мл, ампіцилін – 100 мкг/мл, тіострептон – 100 мкг/мл, фосфоміцин – 25 мкг/мл.

**2.2.2. Побудова кривих росту стрептоміцетів.** Будували за показником накопичення сухої біомаси. Для цього штами вирощували в рідкому середовищі TSB з використанням скляних кульок для гомогенізації культури. Засівали або з однакової кількості спор, або з прекультури (вказано в тексті) та через необхідні проміжки часу відбирали проби у попередньо зважені пробірки. Біомасу відділяли від супернатанту шляхом центрифугування, промивали дистильованою водою та висушували добу при 80°C. Знову зважували, вираховували масу сухої біомаси та перераховували на 1 мл культури.



**2.2.3. Приготування спорових культур стрептоміцетів.** Штами *S. albus* вирощували на SFM до повного спороутворення, готували суспензії спор в дистильованій стерильній воді та фільтрували їх через стерильні ватні фільтри, як описано в (Kieser et al. 2000). Опісля спори промивали водою, концентрували та титрували.

**2.2.4. Виявлення впливу стресових умов на фенотип штамів стрептоміцетів.** Для виявлення відповіді до теплового стресу, штами стрептоміцетів висівали на агаризовані середовища (приблизно  $10^5$  спор на газон), вирощували при  $30^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  та  $42^\circ\text{C}$  і моніторили протягом 6 діб. Для визначення стійкості до антибіотиків, спори стрептоміцетів сіяли на середовище ISP3, накладали паперові диски з відомою концентрацією антибіотиків та вирощували 48 год при  $30^\circ\text{C}$  перед вимірюванням діаметрів зон пригнічення росту (у мм). Для визначення стійкості до пероксиду водню, на паперові диски наносили по 10 і 20 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  та накладали на газони штамів стрептоміцетів. Дослід проводили на м'якому (1%) агаризованому GYM з інокульованими спорами стрептоміцетів (приблизно по  $10^6$  на чашку). Чашки інкубували 48 год при  $30^\circ\text{C}$  перед вимірюванням діаметрів зон пригнічення росту. Для визначення виживання стрептоміцетів на відомих концентраціях стрептоміцину, штами наносили на агаризовані чашки TSA з додаванням антибіотика, інкубували 2 доби при  $30^\circ\text{C}$  та оцінювали кількість стійких КУО. Наносили або розведення рідких культур, або спори (вказано в тексті).

**2.2.5. Трансформація клітин *E. coli*.** Трансформацію плазмідною ДНК проводили за стандартною “кальцієвою” методикою (Sambrook and Russell 2001; Федоренко та ін. 2007). При цьому клітини підросли до  $\text{OD}_{600}=0,5-0,6$  і промивали кілька разів розчином  $0,1 \text{ M CaCl}_2$ , витримуючи на льоді. Трансформацію проводили за допомогою теплового шоку, після чого клітини

підрошували 1-1,5 год без селекції, а потім висівали на середовище із потрібним антибіотиком. Електропорацію проводили при необхідності введення лінійних фрагментів ДНК. Електрокомпетентні клітини готували, промиваючи їх льодяною дистильованою водою. Параметри електропорації: 1800 В, 25 мкФ, 200 Ом, кювета на 1 мм, час імпульсу приблизно 4,5 мс.

**2.2.6. Міжродова кон'югація *E. coli* – *S. albus*.** Кон'югацію проводили стандартно (Kieser et al. 2000; Федоренко та ін. 2007). У ролі донора використовували штами WM6026, що несли потрібні для перенесення конструкти ДНК. Для отримання спор штами стрептоміцетів вирощували на середовищі SFM. Якщо проводили кон'югацію зі штамми, що погано спорують, пропускали етап теплового шоку. Кон'югаційні схрещування висівали на чашки з середовищами ISP3 чи SFM. Селекцію проводили через 6-18 год. Отриманих транскон'югантів пересівали на селективне середовище.

**2.2.7. Виділення ДНК.** Для виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli* використовували методику лужного лізису (Sambrook and Russell 2001). Клітини ресуспендували в 100 мкл I буферу (25 мМ тріс-НСІ, 10 мМ ЕДТА, РНаза А, рН 8,0), додавали 200 мкл II буферу (1% ДСН, 0,2 н NaOH) до повного лізування клітин та 150 мкл III буферу (3М СН<sub>3</sub>СООК) для нейтралізації та висолювання білків. Далі, шляхом центрифугування, відділяли супернатант з плазмідною ДНК від осаджених біополімерів і преципітували ДНК ізопропанолом, після чого промивали 70% етанолом, висушували та розчиняли у воді.

Для виділення сумарної ДНК із біомаси стрептоміцетів, останню ресуспендували в 450 мкл буферу (25мМ тріс-НСІ, 25 мМ ЕДТА, РНаза А, рН 8,0) із додаванням 4 мг/мл лізоциму та інкубували 30 хв при 37°C. Далі додавали 50 мкл 5 М NaCl, 120 мкл 10% ДСН і інкубували при 30 хв при 65°C. Білки висолювали, додавши 240 мкл 5 М СН<sub>3</sub>СООК, 20 хв при -20°C.

Далі відділяли супернатант та преципітували ДНК ізопропанолом, промивали 70% етанолом, висушували та розчиняли у воді (Федоренко та ін. 2007).

**2.2.8. Виділення загальної фракції тРНК.** Виконували за модифікованою методикою (Suyama et al. 2000). Біомасу стрептоміцетів двічі промивали в буфері А (50 мМ тріс-НСІ, 0,9% NaCl, рН 7,5), ресуспендовували в 1,5 V (від об'єму вологої біомаси) буферу Б (1 мМ тріс-НСІ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,3). Далі додавали 1,5 V насиченого буфером Б фенолу (рівні об'єми буферу Б та Aqua-фенолу перемішували, давали відстоятись до повного розділення шарів, відбирали водяний шар та повторювали ще раз). Суміш інкубували на льоді протягом 1 год. Фенол спричинює перфорацію клітин, при цьому, розмір пор достатній для виходу низькомолекулярних РНК (серед яких тРНК), а високомолекулярні рРНК та ДНК переважно залишаються всередині уламків клітин. Далі суміш центрифугували та обережно відбирали водяну фракцію з розчиненими в ній нуклеїновими кислотами і преципітували останні абсолютним етанолом. Для очищення тРНК від високомолекулярних НК, додавали LiCl до кінцевої концентрації 0,8 М, що сприяло осадженню високомолекулярних рРНК та ДНК. Далі фракцію малих РНК преципітували ізопропанолом, промивали 70% етанолом та висушували. За необхідності, процедуру очищення тРНК повторювали.

**2.2.9. Аналіз модифікацій тРНК.** Проводили шляхом ВЕРХ гідролізатів тРНК. Гідролізати отримували шляхом оброблення тотальної фракції тРНК до нуклеозидів за допомогою нуклеази Р1 та алкалін фосфатази. Отримані нуклеозиди розділяли на колонках Develosil C-30 з системою Waters Alliance HPLC, як описано у (Gehrke and Kuo 1989). Модифіковані нуклеозиди ідентифікували за порівнянням часу виходу та

УФ-спектру отриманих піків з такими, що вже описані для відомих модифікацій.

**2.2.10. Агарозний гель-електрофорез НК.** Використовували для аналізу якості та оцінки розміру ДНК. Проводили в однократному тріс-ацетатному буфері (ТАЕ: 40 мМ тріс-НСІ, 1 мМ Na<sub>2</sub>ЕДТА, 20 мМ CH<sub>3</sub>COONa, 25 мМ CH<sub>3</sub>COOH) при напрузі 100-120 В та з концентрацією агарози 0,7-1,5% (залежно від розміру досліджуваних фрагментів). Як маркер, використовували комерційно доступні суміші фрагментів ДНК відомого розміру, як-от GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, GeneRuler DNA Ladder Mix. Для візуалізації НК використовували етидію бромід. За потреби, необхідний фрагмент ДНК елюювали з гелю, використовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) згідно інструкції.

**2.2.11. Полімеразна ланцюгова реакція.** Ампліфікацію ДНК проводили з використанням ПЛР-машин від BioRad та Thermofisher Scientific. Використовували полімерази Phusion, Q5, Taq (Thermofisher Scientific, NEB). Склад суміші та умови ампліфікації підбирали відповідно до рекомендацій виробників та складу праймерів, за потреби оптимізуючи їх.

**2.2.12. Ферментативна обробка ДНК.** Обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції (Thermofisher Scientific, NEB) проводили за умов, рекомендованих виробником, використовуючи комерційно доступні буфери. Інкубували 1-3 год при 37°C. Для лігування фрагментів ДНК використовували ДНК лігазу фага T4 (Thermofisher Scientific). Реакцію проводили при кімнатній температурі (20°C) для фрагментів із липкими кінцями.

### 2.2.13. ПЛР-спрямоване заміщення фрагментів ДНК *Redirect*.

Використовували для конструювання нокаутних плазмід із заміщенням бажаних стрептоміцетних генів на касети стійкості до антибіотиків (наприклад, до гігроміцину (Myronovsky, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014)). Основане на гомологічній рекомбінації між короткими ділянками (розміром 39 п.н.) у клітинах *E. coli* з індукованими  $\alpha$ -RED генами (Gust, Kieser, and Chater 2002; Gust et al. 2003). Для цього у клітини BW25113 (pIJ790) переносили плазмиду (маркер – стійкість до апраміцину), що містила фрагмент геному *S. albus* з геном, що потрібно було замінити. За допомогою спеціально підібраних праймерів, 5'-кінці яких комплементарні до ділянки старт і стоп-кодонів ORF бажаних генів, а 3'-кінці містили гомологічні ділянки до гігроміцинової касети стійкості, ампліфікували останню. Далі отриманим ПЛР-фрагментом електропорували індуковані арабінозою клітини BW25113 (pIJ790). Між гомологічними ділянками лінійної касети та плазмиди відбувалась рекомбінація. Далі проводили селекцію нокаутних плазмід та переносили їх в клітини *S. albus* шляхом кон'югації. Відбирали колонії стрептоміцетів, в яких відбулося необхідне заміщення шляхом подвійного кросинговеру (стійкі до гігроміцину і чутливі до апраміцину). Перевіряли факт заміщення нокаутних штамів стрептоміцетів з використанням ПЛР і спеціальних праймерів.

Для отримання безмаркерних мутантів, касету стійкості видаляли з геному з використанням інтегрази фага PhiC31, яка впізнавала спеціальні сайти B-CC і P-GG, що оточували ген стійкості до гігроміцину (Myronovsky, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014).

### 2.2.14. Аналіз синтезу вторинних метаболітів штамами стрептоміцетів.

Продукцію гетерогенних для *S. albus* моеноміцинів вимірювали, як описано в (Makitrynskyu et al. 2010; Ostash et al. 2013). Штами, що несли космиду moeno38-6 (кінцевий продукт кластеру –

нозокоміцин A2), вирощували в середовищі SG1 при 30°C протягом 5 діб. Екстрагували метанолом з біомаси, екстракти висушували у вакуумному концентраторі, знову розчиняли та використовували для LC-MS, або наносили на паперові диски для біотестів.

Продукцію гетерогенного аранціаміцину (штами несли pOJ436ara) вимірювали, як описано в (Koshla et al. 2017). Штами вирощували 5 діб при 30°C в середовищі SG1. Аранціаміцин екстрагували етилацетатом з культуральної рідини чи сумішшю ДМСО:метанол 1:1 з біомаси. Для ТШХ (нерухома фаза – силікагелеві пластинки F60, Merck, рухома фаза – хлороформ:метанол 95:5) використовували лише екстракти з культуральної рідини. Для спектрофотометрії ( $\lambda=445$  нм) використовували екстракти загального аранціаміцину (висушували екстракти етилацетату та розчиняли залишок в екстрактах з біомаси). Результати нормалізували відносно маси сухої біомаси.

Для аналізу продукції власних вторинних метаболітів *S. albus*, штами вирощували 5 діб при 30°C в середовищі SG2, екстракцію проводили бутанолом (з культуральної рідини) чи етилацетатом (з біомаси). Екстракти аналізували з допомогою ВЕРХ-МС, речовини ідентифікували, порівнюючи їх  $m/z$  чи спектри УФ-поглинання з уже відомими.

Для ВЕРХ-МС аналізу етилацетатних екстрактів, отриманих з біомаси штамів SAM2 та *ΔbldA*, використовували Dionex Ultimate 3000 HPLC разом з мас-спектрометром Bruker AmaZon, колонки C18 (50 × 2.1мм) і лінійний 18 хв градієнт від 5% до 95% ацетонітрилу. Система розчинників: буфер А – 0,1% мурашиної кислоти у воді, буфер Б – 0,1% мурашиної кислоти в ацетонітрилі. Мас-спектри отримані в режимі негативної іонізації. Кандицидини детектували за часом виходу та спектром УФ-поглинання, пауломеноли – за  $m/z$  сполук.

Для ВЕРХ-МС аналізу бутанольних екстрактів, отриманих з культуральної рідини штамів SAM2, *ΔmiaA* та *ΔmiaB*, використовували мас-

спектрометр HiRes Extractive Orbitrap. Система розчинників: буфер А – 0,1% мурашиної кислоти у воді, буфер Б – 0,1% мурашиної кислоти в ацетонітрилі. Мас-спектри отримані в режимі позитивної іонізації. Дані аналізували за допомогою програми Xcalibur 5.1. Речовини ідентифікували за значеннями  $m/z$ . Виконували, як описано в (Koshla et al. 2019).

**2.2.15. Проведення біотестів для визначення антибіотичної активності штамів *S. albus*.** Як моеноміцин- та аранціаміцин-чутливу тест-культуру, використовували *Bacillus cereus* ATCC19637. Диски з екстрактами антибіотиків накладали на агар з інокульованими спорами *B. cereus* (приблизно  $10^7$  на чашку з модифікованим мінімальним середовищем (Anagnostopoulos and Spizizen 1961)) та інкубували при 30°C 24 год, опісля вимірювали діаметр зон пригнічення росту. Індекс продуктивності (ІП) обчислювали, як описано в (Koshla et al. 2017).

Продукцію власних антибіотичних метаболітів *S. albus* визначали і за методом дифузії з агарових блочків. Для цього штами стрептоміцетів вирощували на агаризованих середовищах 6 діб при 30°C, вирізали з газонів блочки діаметром 5 мм (за допомогою пустотілого циліндра) та накладали їх на чашки із тест-культурами. Як тест-культури, використовували *B. cereus* (так, як описано вище) та *Candida famata* (також відомий як *Debaryomyces hansenii*) VKM Y-9 (вирощували у м'якому 1% TSA).

**2.2.16. Визначення активності  $\beta$ -глюкуронідази в лізатах біомаси *S. albus*.** Проводили, як описано в (Myronovskyi et al. 2011). Культуру розпочинали зі спор (приблизно  $10^6$  спор на 30 мл середовища) та вирощували при 30°C. Для визначення активності  $\beta$ -глюкуронідази відбирали по 2 мл культури, відділяли біомасу та ресуспендували її у 2 мл буферу для лізису (50 мМ фосфатний буфер рН 7,0; 0,1% Тритон Х-100; 0,077% дитіотреїтол; лізоцим 4мг/мл) 30 хв при 37°C. Лізат центрифугували і

переносили по 0,5 мл у дві пробірки з 0,5 мл буферу (без лізоциму). До однієї додавали 10 мкл розчину *p*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкуроніду (0,063 г/мл ДМСО) для початку реакції, іншу використовували як контроль. Реакцію проводили при 37°C. Кількість утвореного продукту визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 415 нм. Активність  $\beta$ -глюкуронідази обраховували в U (юніти) на 1 г сухої біомаси культури.

**2.2.17. Електронна сканувальна мікроскопія.** Фрагменти газонів стрептоміцетів, вирощені за необхідних умов, вирізали із агаризованих середовищ, вакуумно висушували та безпосередньо аналізували на скануючому мікроскопі Jeol JSM-T220A.

**2.2.18. Біоінформатичний аналіз.** Для пошуку гомологічних послідовностей в базах даних NCBI використовували BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Базу даних MODOMICS використовували для аналізу білків, що модифікують тРНК (Voccaletto et al. 2018). tRNAscan-SE використовували для пошуку генів тРНК та ідентифікації типу їх антикодонів (Lowe and Eddy 1997; Lowe and Chan 2016).

Карти плазмід будували за допомогою програми SnapGene.



## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Меродиплоїди *S. albus* за геном *rpsL* та їхні властивості

Хоча точкові мутанти за геном *rpsL* достатньо добре і ґрунтовно описані для низки організмів (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003; Carr, Gregory, and Dahlberg 2005; Agarwal, Gregory, and O'Connor 2011), практично відсутня інформація про те, як впливає на фенотип наявність в одному геномі двох різних копій цього гена. Теоретично, за присутності кількох алелей *rpsL*, клітина здатна експресувати різні варіанти білка S12 та включати їх в рибосоми. Така гетерогенна популяція рибосом, можливо, здатна модифікувати вияв низки ознак. Наприклад, цікавими та потенційно важливими є дослідження впливу меродиплоїдного стану гена *rpsL* на вторинний метаболізм стрептоміцетів. Як об'єкт такого дослідження нами обрано штаму *S. albus* SAM2.

Геноми стрептоміцетів містять одну копію гена *rpsL*. Для штаму *S. albus* J1074, розмір ORF *rpsL* (ідентифікатори в базі GenBank *XNR\_RS18425*, *XNR\_3720*) становить 372 п.н., розмір кодованого білка S12 становить 123 а.к.з.

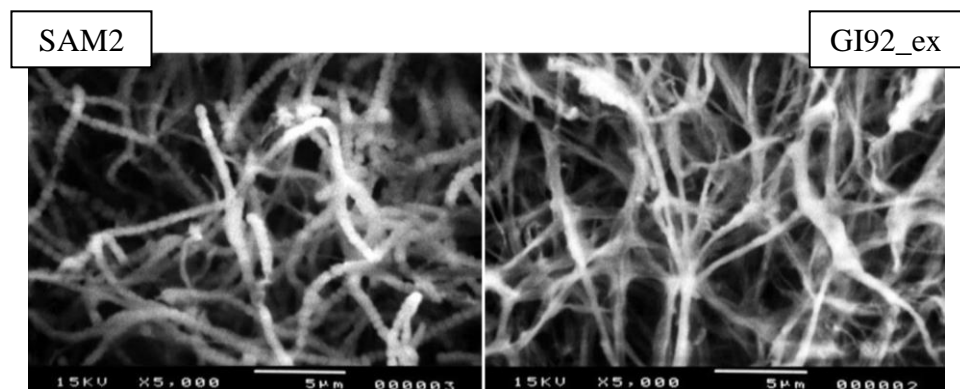
Сконструйовано меродиплоїдні штами *S. albus* SAM2, що містили крім гена *rpsL* дикого типу ще і його мутантний алель *rpsL\**. Штами отримано з використанням серії плазмід pTOS\_S12 на основі інтегративного вектора pTOS (Herrmann et al. 2012). У вектор по сайтах дії ендонуклеаз рестрикції XbaI і KpnI клоновано фрагмент розміром 948 п. н., що містив один із 9 варіантів точково мутованого алеля *rpsL* під контролем нативного промотора. Усі отримані плазмідні перевірено секвенуванням. Точкові мутації зумовлювали виникнення одного з перелічених нижче амінокислотних заміщень в структурі S12: R86P, K88E, K88R, L90K, P91S, R94G, K88E+P91S,

а також вставку гліцинового кодона GI92, або ж поєднання заміщення і вставки (K88E+GI92).

Плазміди перенесено у штам *S. albus* SAM2 за допомогою міжродової кон'югації *E. coli* – *Streptomyces*, а після успішної селекції рекомбінантних штамів (приклад назви – *S. albus* S12\_R86P), векторну послідовність видалено із геному стрептоміцетів за допомогою ендонуклеази Dre (експресія з вектора pUWLDRE (Herrmann et al. 2012)). Таким чином, сконструйовано 9 безмаркерних мутантів *S. albus*, у яких ген *rpsL* знаходився в меродиплоїдному стані (наприклад, *S. albus* R86P\_ex; одна природна копія *rpsL*, інша, *rpsL*<sup>R86P</sup>, в сайті інтеграції актинофага *attB*<sup>VWB</sup>), які далі використовували для дослідження.

Параметри, за якими характеризували штами меродиплоїдів: накопичення біомаси, морфологія колоній, здатність продукувати вторинні метаболіти, а також стійкість до антибіотиків – для меродиплоїда K88E\_ex.

Варто зазначити, що практично жоден із досліджуваних меродиплоїдів не відрізнявся за темпами розвитку чи росту на твердих (SFM, ISP3, GYM, TSA) чи рідких (TSB) середовищах від штаму дикого типу. Винятком став штам GI92\_ex, що при рості на твердому середовищі ISP3 на мікроскопічному рівні формував тонший міцелій та меншу кількість спор, ніж SAM2 (рис. 3.1).



**Рис.3.1.** Сканувальна електронна мікроскопія газонів штамів дикого типу *S. albus* SAM2 та меродиплоїда GI92\_ex (30°C, ISP3, 72 год).

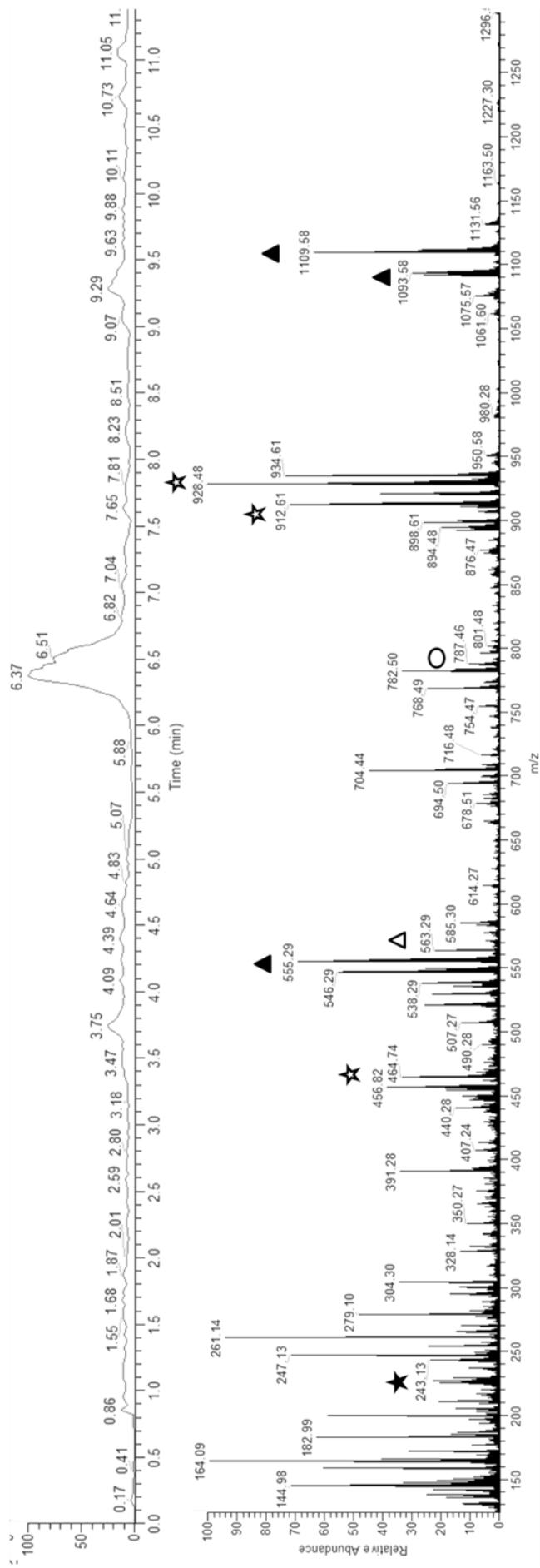
За лабораторних умов SAM2 здатний до продукції протигрибкових (кандицидини та антиміцини) і незначної кількості протибактерійних (пауломіцини та пауломеноли, що є продуктами одного КГБ) метаболітів (Olano et al. 2014; González et al. 2016; Koshla et al. 2019) (рис. 3.2). Для виявлення впливу меродиплоїдного стану різних алелів гена *rpsL* на власний вторинний метаболізм, визначали антибіотичну активність штамів стрептоміцетів методом біотестів проти тест-культур *C. famata* та *B. cereus* (як це описано вище). Результати узагальнені в табл. 3.1. Як видно, продукція антибіотичних метаболітів залежала від середовища, на якому вирощували стрептоміцетів (агаризоване SG2 чи R5), а також від того, який саме мутантний алель гена внесено додатково.

Таблиця 3.1.

**Власна антибіотична активність меродиплоїдних штамів**

Штами <i>S. albus</i>	Пригнічення росту тест-культур			
	<i>B. cereus</i>		<i>C. famata</i>	
	SG2	R5	SG2	R5
SAM2	++	++	+	++
R86P_ex	+	++	++	++
K88E_ex	--	+++	++	++
K88R_ex	--	--	++	++
L90K_ex	++	+++	++	++
P91S_ex	++	+++	++	+
GI92_ex	--	+++	++	++
R94G_ex	++	+++	++	++
K88E+P91S_ex	++	+++	++	++
K88E+GI92_ex	+	++	++	++

Примітка: -- зона пригнічення росту тест-культури відсутня; + зона пригнічення росту до Ø10 мм; ++ Ø11-20 мм; +++ Ø>20 мм.



**Клас сполук**    Бутеноліди    Антиміцини    Пауломіцини    Шуругаміди    Кандицидини

**Значення m/z**    225.15    563.29    787.46    912.61; 928.48; 1109.58; 1093.58;  
464.74 [2H<sup>+</sup>]    555.29 [2H<sup>+</sup>]

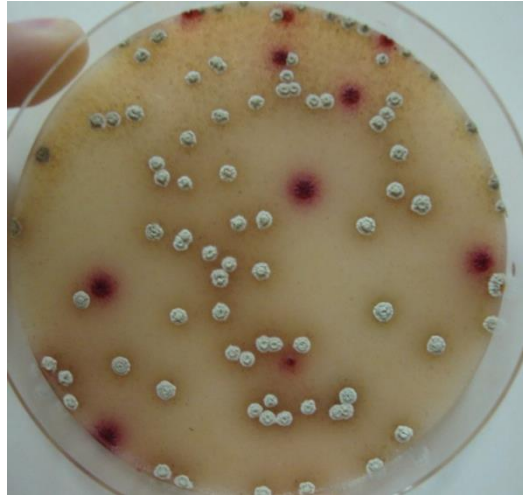
**Рис. 3.2.** Хроматограма ВЕРХ (вгорі) та мас-піки окремих іонів (внизу) екстрактів з біомаси *S. albus* SAM2, вирощеного в середовищі SG2. Ідентифіковано 5 класів сполук, значення m/z (та [2H<sup>+</sup>] для шуругамідів і кандицидинів) яких подано в таблиці. Вісь абсцис – час виходу сполук, хв, чи значення m/z; вісь ординат – відносна поширеність піка, % (100% відповідає абсолютному значенню абсорбції максимального піку серед представлених, в AU). Значення m/z подано в режимі позитивної іонізації. Якісний склад піку з максимумом виходу на 6.37 хв (вгорі), в основному, відповідає шуругамідам та кандицидинам.

Наприклад, внесення додаткових алелів K88E чи GI92 практично повністю пригнічувало синтез протимікробних метаболітів при рості стрептоміцетів на SG2, однак активізувало синтез останніх на R5. Втім, поєднання обох мутацій в одному додатковому алелі K88E+GI92 майже не позначалось на активності проти *B. cereus*. Додатковий алель K88R практично повністю пригнічував, а алелі L90K, P91S, R94G та K88E+P91S – активізували протибацилярну активність за досліджуваних умов. Кардинальних змін у синтезі протигрибкових метаболітів не спостерігалось.

Оскільки *S. albus* розглядається як перспективний штам для гетерологічного біосинтезу вторинних метаболітів (Wendt-Pienkowski et al. 2005; Gullón et al. 2006; Baltz 2010; Makitrynskyu et al. 2010), цікавим є вивчення впливу меродиплоїдного стану *rpsL* на продуктивність штучно внесених КГБ антибіотиків. Для глибшого вивчення було обрано і внесено у мутантні штами та SAM2 КГБ моеноміцинового антибіотика нозокоміцину А (в складі косміди moeno38-6) (Ostash, Saghatelian, and Walker 2007; Ostash et al. 2013) та забарвленого полікетидного антрациклінового антибіотика аранціаміцину, синтез якого контролюється космідою pOJ436ara (Luzhetskyu et al. 2007). Факт інтеграції космід доведено наявністю маркерної стійкості до відповідних антибіотиків, а у випадку з pOJ436ara – ще і червоно-помаранчевим забарвленням міцелію транскон'югантів, які продукують аранціаміцин.

Не виявили жодних змін в продукції нозокоміцину *moeno38-6*<sup>+</sup>-меродиплоїдними штамми. Однак, деякі із *ara*<sup>+</sup>-меродиплоїдів суттєво відрізнялись за рівнем продукції забарвлених метаболітів від дикого типу. Варто зазначити, що штам K88R\_ex *ara*<sup>+</sup> виявляв фенотипову нестабільність. Так, після селекції та кількох пересівів на середовищі з апраміцином, висіваючи розведення штаму K88R\_ex *ara*<sup>+</sup> на середовище ISP3 помітили утворення двох типів колоній: таких, що не спорували і надпродукували

аранціаміцин та споруючих, однак з накопиченням менших кількостей антибіотика (рис. 3.3).

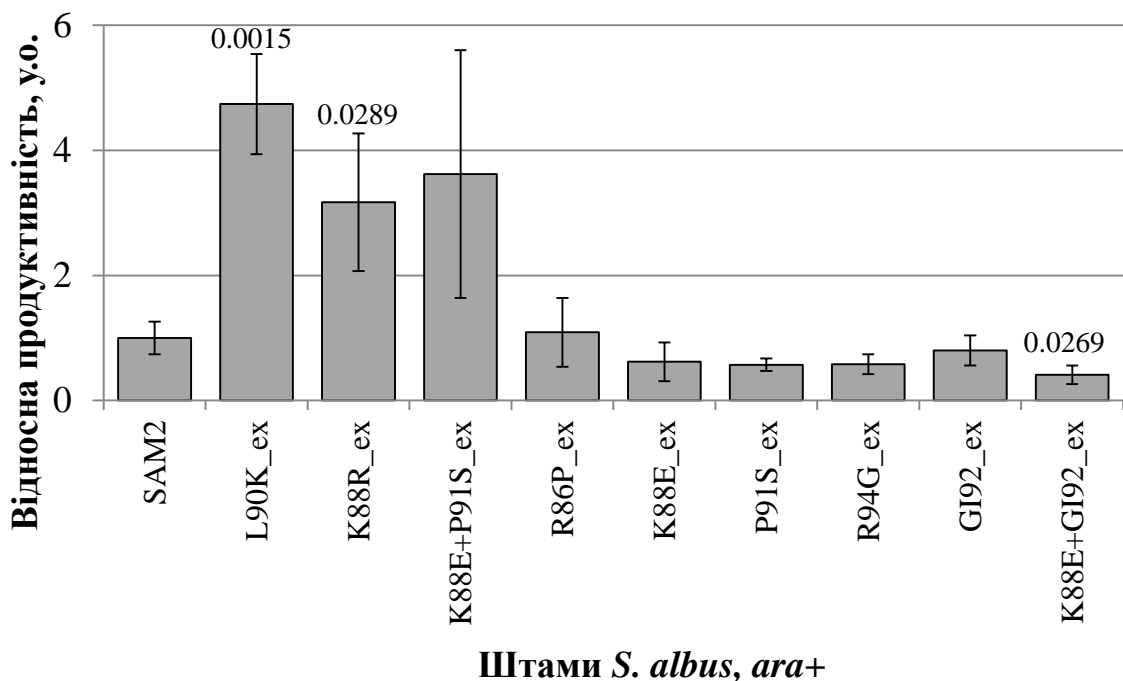


**Рис. 3.3.** Колонії K88R\_ex *ara*<sup>+</sup> після 72 год росту на ISP3.

Для кількісної характеристики продукції аранціаміцину проведено загальну екстракцію (з міцелію та культуральної рідини досліджуваних штамів, вирощених в рідкому середовищі SG1, оптимальному для синтезу аранціаміцину) вторинних метаболітів, а в отриманих екстрактах виміряно показник  $OG_{415}$  (для детекції червоно-помаранчевих аранціаміцинів). Результати нормалізовано відносно кількості сухої біомаси в 1 мл культуральної рідини для кожного штаму та подано як відносне значення до продуктивності SAM2 *ara*<sup>+</sup>, прийнятої за 1. Дані наведено на рис. 3.4. Статистично значуще, *ara*<sup>+</sup>-штами L90K\_ex та K88R\_ex синтезували в 3-4,5 рази більше, а K88E+GI92\_ex – вдвічі менше забарвленого метаболіту, ніж SAM2.

Тобто, принаймні кілька алелів *rpsL*, а саме L90K\_ex та K88E+P91S\_ex, здатні активізувати власний чи гетерогенний вторинний метаболізм *S. albus*. Далі такі штами можуть бути об'єктом для подальшої оптимізації продукції антибіотиків.

Відомо, що заміщення K88E в білку S12 для штамів стрептоміцетів зумовлює стійкість ( $Sm^R$ ) мутантних рибосом до стрептоміцину (Shima et al. 1996). Такий ефект є цілком зрозумілим у випадку із наявністю в геномі лише однієї копії мутантного алеля  $rpsL^{K88E}$ . Однак невідомо, чи у випадку меродиплоїдного штаму K88E\_ex мутантний білок S12 включатиметься у достатню кількість рибосом для виникнення фенотипу стійкості до стрептоміцину. Також складно спрогнозувати частку і часову динаміку співвідношення  $Sm^R/Sm^S$  рибосом в клітинах меродиплоїдного штаму.



**Рис. 3.4.** Відносна продукція забарвлених метаболітів  $ara^+$ -штамами, меродиплоїдними за геном  $rpsL$ . Нормалізовано відносно кількості сухої біомаси в 1 мл культури. Продукцію  $ara^+$ -штамамом SAM2 прийнято за 1. Представлено середній результат 3 повторів, планки похибок відображають стандартне відхилення. Значення p вказані за умови  $\leq 0.05$ .

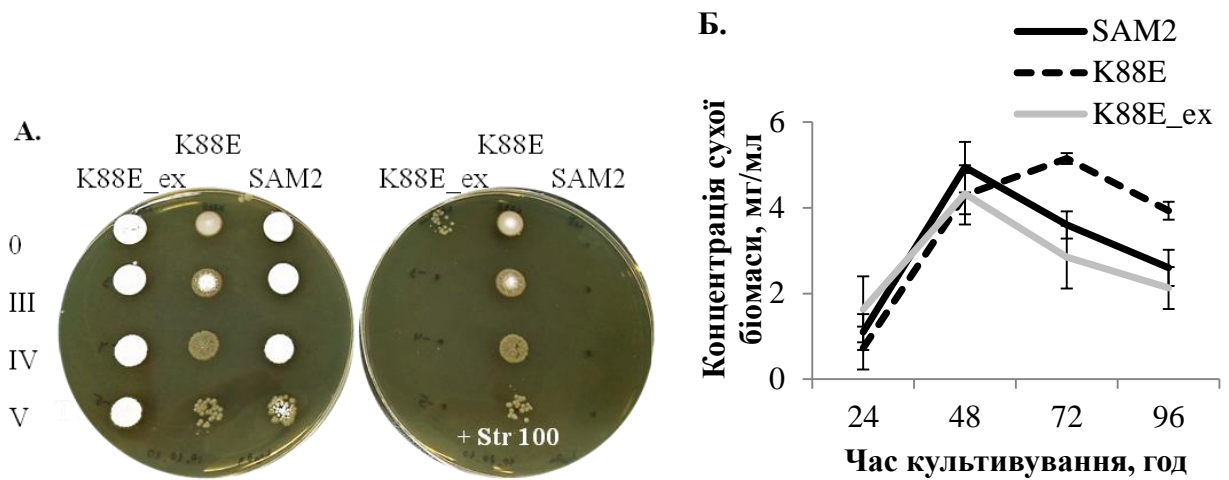
Ми визначили, що 100 мкг/мл стрептоміцину в середовищі TSA є бактерицидною концентрацією для SAM2, що зумовлює виникнення  $Sm^R$  колоній штаму SAM2 з частотою не більше ніж  $10^{-8}$ - $10^{-9}$ . Щодо

меродиплоїдного штаму K88E\_ex, то можливо, певна значуща частка Sm<sup>R</sup> рибосом в клітині частково змінюватиме стійкість останнього до стрептоміцину. Для перевірки такого припущення проведено наступний дослід. Визначали виживання колоній при рості на середовищі TSA з додаванням стрептоміцину до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Для цього штами SAM2, K88E (гомозиготний) та K88E\_ex (меродиплоїдний стан *rpsL*), що не піддавались попередній дії стрептоміцину, вирощували в рідкому середовищі TSB, а потім по 10 мкл культури та тисячного, десятитисячного і стотисячного розведень краплинково наносили на чашки без антибіотика (для оцінки концентрації КУО) та зі 100 мкг/мл стрептоміцину для виявлення стійких КУО. Чашки інкубували 48 год при 30°C та оцінювали ріст штамів. Типовий результат тесту відображено на рис. 3.5.А. Як і передбачалось, гомозиготний мутант K88E виявився повністю стійким, а SAM2 – чутливим до такої концентрації стрептоміцину. Цікаво відзначити, що практично завжди виявляли певну кількість Sm<sup>R</sup> колоній для меродиплоїдного штаму K88E\_ex. Така кількість варіювала залежно від того, як довго вирощували рідку культуру TSB перед нанесенням на чашки. Зокрема, більше Sm<sup>R</sup> КУО спостерігали в культурах, що росли 48-72 год. Швидше всього, чим вища кількість КУО (або ж біомаси) культури нанесена на чашку, тим вища імовірність виявити серед них клони стійкі до стрептоміцину. І, у випадку зі штамом K88E\_ex, пік накопичення сухої біомаси для нього (як і для SAM2) наставав саме близько 48 год росту (рис. 3.5.Б.).

Зважаючи на те, що стрептоміцети при рості в рідкому середовищі формують міцелій, а не окремі клітини, постають певні труднощі з підрахунком КУО культури. Адже колонія виростає із нитки міцелію, який фрагментується нерівномірно та часто, залежно від штаму і умов вирощування, утворює клубки і грудки. Тому для підрахунку частки Sm<sup>R</sup> КУО доцільніше використовувати гомогенні спорові суспензії, що і було зроблено. Штами SAM2, K88E та K88E\_ex газом висіяли на чашки SFM та



виросували до повного завершення морфогенезу (3-4 доби при 30°C) перед приготування спорових суспензій. Далі суспензії титрували (на неселективному середовищі TSA, для визначення загальної кількості КУО) та визначали кількість  $Sm^R$  КУО (на TSA зі стрептоміцином). Частку  $Sm^R$  КУО



**Рис. 3.5.** А. Вживання дикого типу (SAM2), гомозиготного (K88E) та меродиплоїдного (K88E\_ex) штамів на TSA без (зліва) та з додаванням стрептоміцину у концентрації 100 мкг/мл (справа). На чашки наносили по 10 мкл попередньо вирощених у TSB 48-годинних культур, без розведення (0) і розведених у тисячу (III) десять тисяч (IV) та сто тисяч разів (V). Інкубували 48 год при 30°C. Б. Накопичення сухої біомаси штамми стрептоміцетів при рості в рідкому середовищі TSB при 30°C. Штами засівали із прекультури. Відображено середній результат 3 повторів, планки похибок позначають стандартне відхилення.

обраховували як відношення їх кількості до загальної кількості КУО. Результати наведені в табл. 3.2. Виявили, що для SAM2 така частка приблизно рівна  $10^{-8}$ , тобто відповідає частоті утворення спонтанно стійких мутантів, а для K88E практично є 1. Щодо штаму K88E\_ex, то спостерігали

підвищення частки утворення Sm<sup>R</sup> КУО за досліджуваних умов на 2 порядки, порівняно з SAM2.

Таблиця 3.2.

**Частка Sm<sup>R</sup> КУО, отриманих зі спорових суспензій стрептоміцетів**

Штами <i>S. albus</i>	Частка Sm <sup>R</sup> КУО
SAM2	10 <sup>-8</sup>
K88E	1
K88E_ex	(5,2±0,5)×10 <sup>-6</sup>

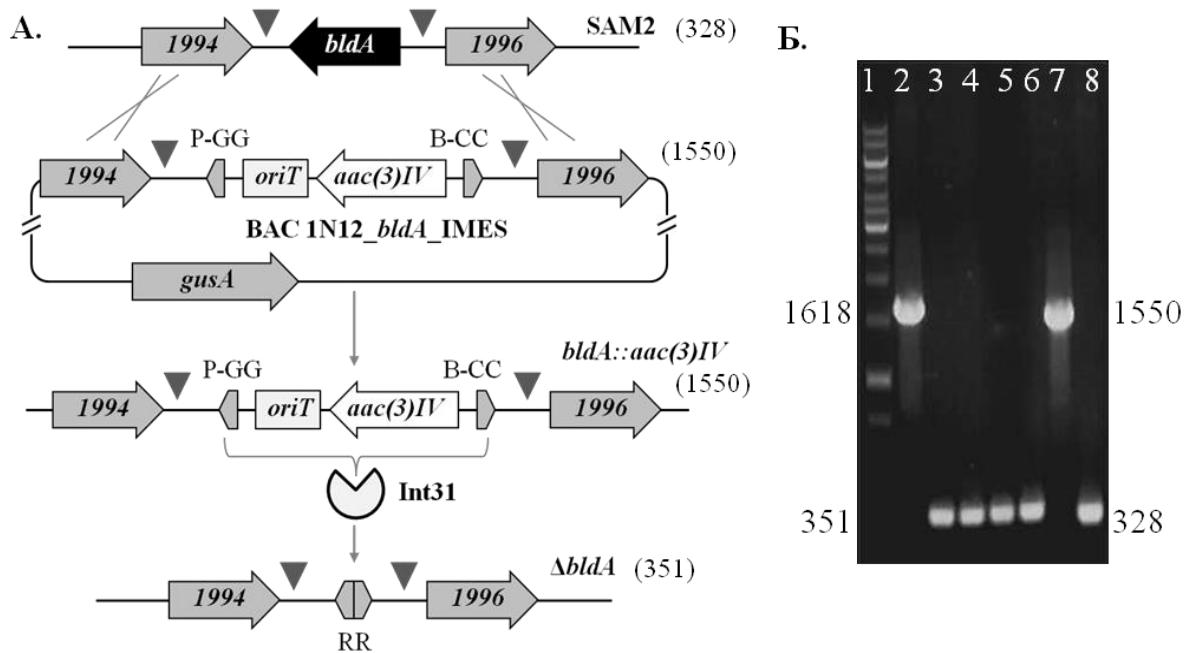
За матеріалами підрозділу опубліковано наступні праці: (Kharaton et al. 2016; Koshla, Borys, and Ostash 2017; Koshla et al. 2017; Борис та Кошла 2017; Кравець та Кошла 2017; Кошла та Остап 2017; Борис, Кошла, та Остап 2018).

Отже, у досліджуваних меродиплоїдних штамів *S. albus*, залежно від умов вирощування та того, який саме додатковий алель гену *rpsL* внесено, змінюються параметри росту, власного і гетерологічного вторинного метаболізму, та стійкості до стрептоміцину. Найімовірніше, рибосоми із різними варіантами білка S12 сприяють експресії різних груп генів. Можливо, така вибіркова експресія залежить від кількості мутантних рибосом в клітині в певний період розвитку, або ж потребує гетерогенної популяції рибосом для реалізації. Нами отримано перші докази того, що така гетерогенна популяція рибосом дійсно існує у культурі; про це непрямо свідчать показники стійкості до стрептоміцину у дослідженому меродиплоїдному штамі.

### 3.2. Конструювання та дослідження мутанта *S. albus* за геном *bldA*, що кодує лейцинову тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>

Мутанта *S. albus* SAM2 за геном *bldA* сконструйовано для вивчення процесів тРНК-опосередкованої регуляції експресії генів у згаданому штамі. Раніше такий мутант описаний не був. У *S. albus* J1074 тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> кодується геном *XNR\_RS09895* (*XNR\_1995*) та є єдиною тРНК, здатною розшифровувати кодон UUA (Додаток Е). Для нокауту гена *bldA* використовували попередньо отриманий конструкт на основі ВАС (1N12\_IMES), в якому послідовність гена *XNR\_1995* заміщено на касету стійкості до апраміцину (*aac(3)IV-oriT* із *patt-saac-oriT*), що фланковані сайтами впізнавання інтегрази Int31, P-GG та В-СС (рис.3.6.А). Конструкт кон'югативно перенесено в штам SAM2, рекомбінантів *bldA::aac(3)IV* відібрано за стійкістю до апраміцину та нездатністю розщеплювати специфічний для GusA субстрат X-gluc до продуктів блакитного забарвлення. Далі у клітини *bldA::aac(3)IV* кон'югативно перенесено плазмиду pUWLint31, з якої експресувалась інтеграза Int31. Остання впізнавала сайти P-GG та В-СС на флангах  $\Delta bldA::aac(3)IV$  і видаляла послідовність між ними з утворенням залишкового RR-сайту (Myronovskyi, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014). Таким чином, сконструйовано безмаркерного мутанта із делецією гена *XNR\_RS09895*,  $\Delta bldA$  (OK3). Очікувані геномні перебудови в згаданих штаммах підтверджено шляхом діагностичної ПЛР з використанням специфічних праймерів SA\_bldA\_XbaI\_up та SA\_bldA\_EcoRI\_gp (рис. 3.6.Б).

Для підтвердження того, що фенотип мутанта зумовлено саме нокаутом гена *bldA*, а не іншими спонтанними геномними перебудовами чи полярним ефектом, сконструйовано також комплементований штам  $\Delta bldA+bldA$ . Для комплементачії використали плазмиду pTOSbldA на основі інтегративного вектора pTOS (Herrmann et al. 2012) із клонуваним по сайтах HindIII і XbaI фрагментом, що містив ген *XNR\_1995* з власним промотором розміром приблизно 600 п.н.).

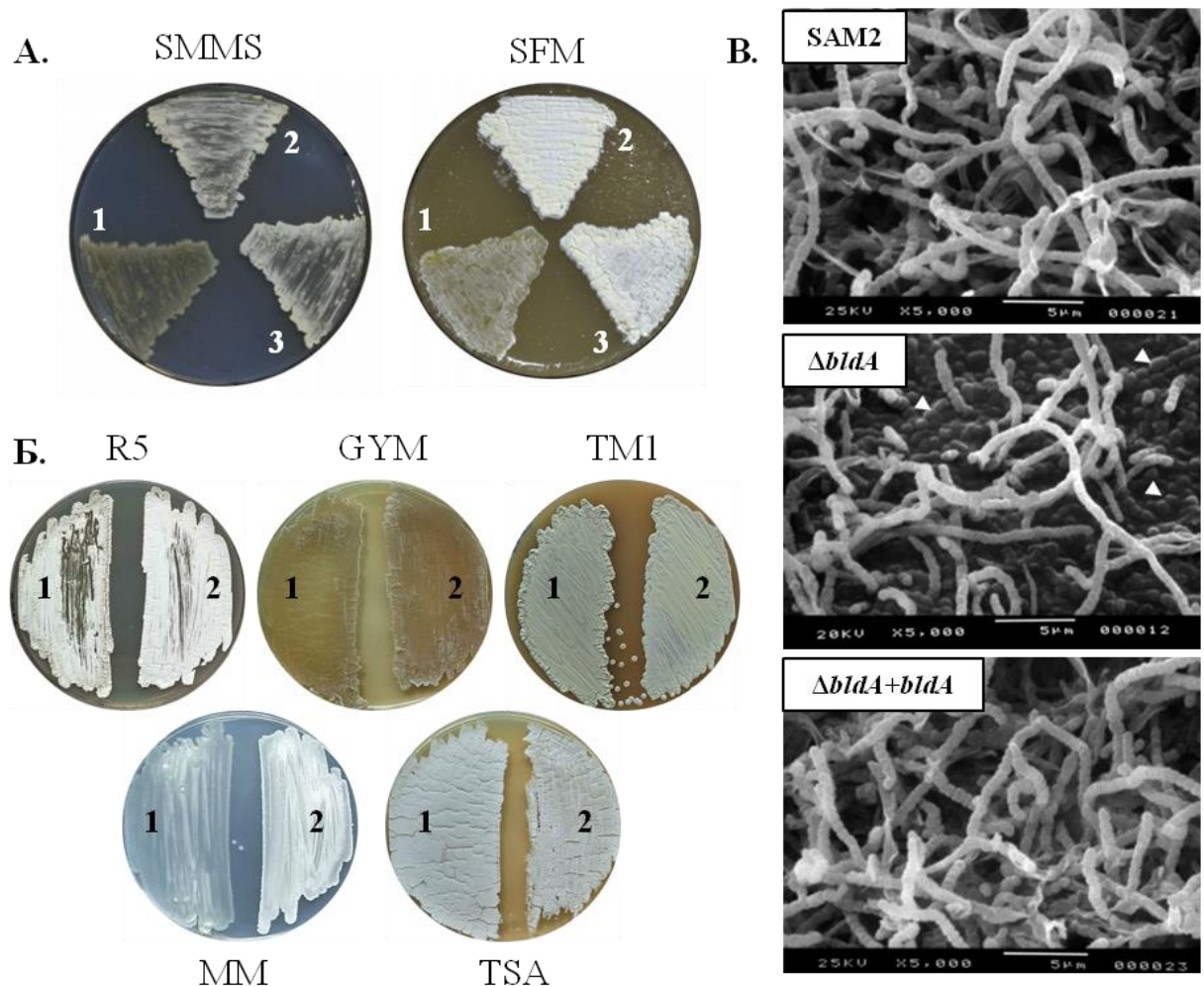


**Рис. 3.6.** А. Схема конструювання штаму *S. albus*  $\Delta bldA$  (OK3). *bldA* – ген *XNR\_1995*, що кодує тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>; *oriT* – ділянка початку кон'югативного переносу; *aac(3)IV* – ген стійкості до апраміцину; P-GG і B-CC – сайти впізнавання для інтегрази фага PhiC31, Int31; *gusA* – ген  $\beta$ -глюкуронідази GusA; RR – шрам після вирізання апраміцинової касети; трикутниками позначено сайти гібридизації для згаданих в тексті праймерів; в дужках вказано очікувані розміри продуктів ампліфікації в п.н. Б. Електрофореграма ПЛР-ампліфікації з використанням згаданих специфічних праймерів для підтвердження геномних перебудов у штамі  $\Delta bldA$ . Лунки: 1 – ДНК-маркер 1 kb DNA Ladder; 2 – позитивний контроль; 3-6 – видалення маркера в 4 незалежних клонах  $\Delta bldA$ ; 7 – заміщення гена *bldA* на апраміцинову касету в штамі *bldA::aac(3)IV*; 8 – ампліфікація гена *bldA* з геному SAM2. Числа вказують розмір отриманих фрагментів в п.н.

Далі для дослідження використовували штами SAM2,  $\Delta bldA$  та  $\Delta bldA+bldA$ . Параметри, за якими характеризували: ріст та морфологічний розвиток на низці твердих середовищ, здатність продукувати власні та

гетерологічні вторинні метаболіти, здатність експресувати ТГА-вмісні гени (в т. ч. і репортерні гени).

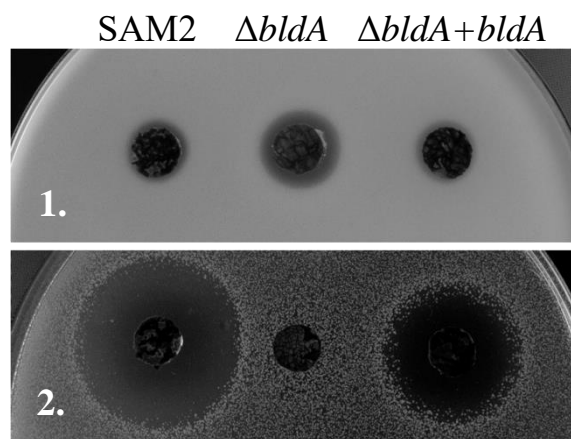
Варто зазначити, що при рості на багатьох твердих середовищах (інкубування протягом 3-5 діб при 30°C) *ΔbldA* не виявляв відмінностей від штаму дикого типу. Однак, на кількох середовищах, як-от SFM, MM чи SMMS, мутант відрізнявся макро- та мікроскопічно (рис. 3.7). Зокрема, він



**Рис. 3.7.** А, Б. Морфологія газонів штамів *S. albus* *ΔbldA* (1), SAM2 (2) і *ΔbldA+bldA* (3) на вказаних агаризованих середовищах. Вирощували 3 доби при 30°C. В. Скануюча електронна мікроскопія 3-денних газонів штамів стрептоміцетів, вирощених на SFM. Білими трикутниками позначено фрагментований субстратний міцелій штаму *ΔbldA*.

повільніше і менш щільно формував повітряний міцелій та спори. Внесення копії гена *bldA* у складі рTOS*bldA* повністю відновлювало морфологічні дефекти мутанта. Однак, нокаут *bldA* у *S. albus* не приводив до припинення програми морфологічного розвитку і не зумовлював виникнення типового Bld<sup>-</sup>-фенотипу, описаного для *S. griseus* (Kwak, McCue, and Kendrick 1996), *S. lividans* (Leskiw et al. 1991) чи *S. coelicolor* (Merrick 1976) (повне припинення формування повітряного міцелію).

Власну антибіотичну активність мутанта  $\Delta bldA$  досліджено методом біотестів проти тест-культур *C. famata* та *B. cereus*. Штами стрептоміцетів вирощували газом протягом 5 діб при 30°C на агаризованому SG2 перед виконанням біотесту, як описано у Методах. Типовий результат представлено на рис. 3.8. Нокаут гена *bldA* активізує синтез протигрибкових та пригнічує синтез протибактерійних метаболітів. Комплементация  $\Delta bldA$  нативним геном *bldA* відновлює продукцію згаданих метаболітів до рівнів SAM2.



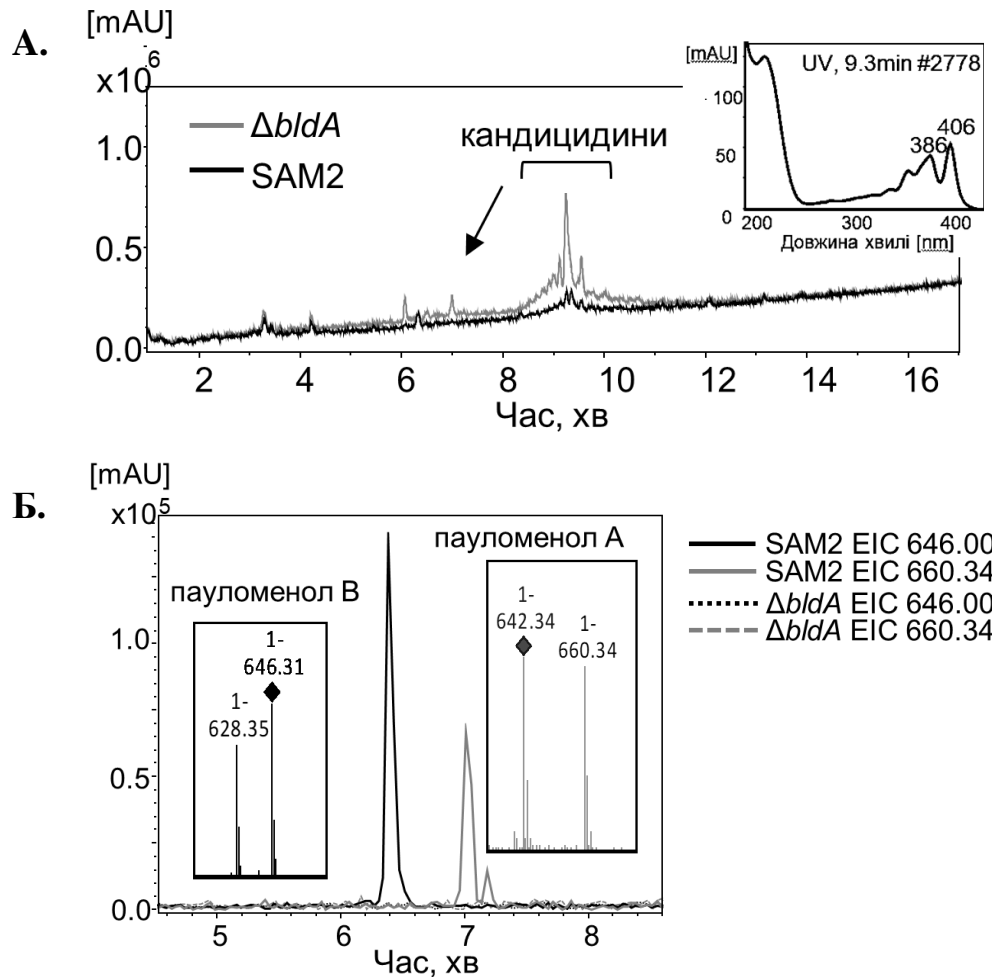
**Рис. 3.8.** Власна антибіотична активність штамів *S. albus* SAM2, мутанта  $\Delta bldA$  та комплементованого штаму  $\Delta bldA+bldA$  проти *C. famata* (1) та *B. cereus* (2).

Антибіотичні активності проти дріжджів та бактерій зумовлюються продукцією різних класів речовин. Як вже згадувалось, штам SAM2 здатний

до біосинтезу пауломенолів, пауломіцинів, кандицидинів, антиміцинів (рис.3.2) та низки інших вторинних метаболітів. За винятком біосинтезу пауломіцину (González et al. 2016), на сьогодні мало відомо про генетичний контроль вторинного метаболіту SAM2. Ми звернули свою увагу на кластер-асоційовані регулятори біосинтезу вторинних метаболітів у цьому штамі. Цікаво, що серед перелічених антибіотиків, наявність ТТА-кодонів властива лише для КГБ пауломіцинів, що чинять протибактерійну дію. Тому можна припустити, що нокаут гена *bldA* практично унеможлиблює біосинтез пауломіцинів, однак не кандицидинів чи антиміцинів. Останні, в свою чергу, надпродукуються, можливо, через перерозподіл ресурсів первинного метаболізму на їхню користь.

Для підтвердження цього припущення проведено ВЕРХ-МС екстрактів, отриманих з біомаси штамів SAM2 та  $\Delta bldA$  (рис. 3.9). Аналіз проводили, як описано в Методах. Штам  $\Delta bldA$  справді продукував більше кандицидин-подібних сполук, ніж SAM2 (рис. 3.9.A, сірий та чорний треки, відповідно). Разом з тим, продукція пауломенолів для  $\Delta bldA$  була нижчою рівня детекції (рис. 3.9.B).

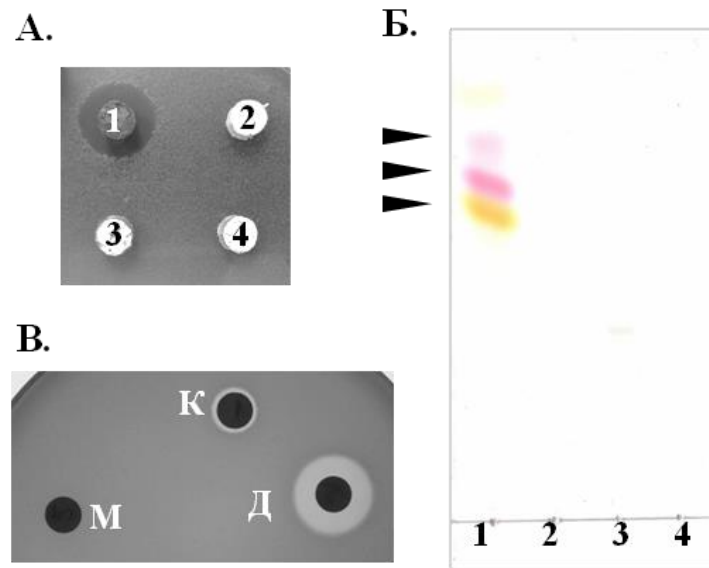
Результати продукції гетерогенних моеноміцину та аранціаміцину штамом  $\Delta bldA$  є ще одним доказом того, що нокаут гена *bldA* в *S. albus* практично скасовує продукцію антибіотиків, КГБ яких містять ТТА-кодони. Для цього у штам  $\Delta bldA$  перенесено косміди *moeno38-6* (КГБ моеноміцину) (Ostash et al. 2013) та *pOJ436ara* (КГБ аранціаміцину) (Luzhetskyu et al. 2007). Транскон'югантів з інтегрованими конструктами відбирали за стійкістю до гігроміцину та апраміцину, відповідно. Далі оцінювали продуктивність антибіотиків порівняно із *moeno38-6*<sup>+</sup> та *ara*<sup>+</sup> штамми SAM2. Очікувано виявили, що нокаут *bldA* практично повністю припиняє синтез як моеноміцину, так і аранціаміцину (рис. 3.10).



**Рис. 3.9.** А. Хроматограма ВЕРХ-МС етилацетатних екстрактів, отриманих з однакової кількості біомаси штамів SAM2 та  $\Delta bldA$ . Кандицидини детектували за часом виходу сполук та спектром УФ-поглинання (подано для сполук з часом виходу 9.3 хв). Б. Детекція мас-пиків пауломенолів за значенням  $m/z$  (негативна іонізація) у тих же екстрактах. Для А і Б: вісь абсцис – час виходу сполук, хв; вісь ординат – значення абсорбції в mAU.

Раніше описані кілька випадків експресії ТТА-вмісних генів в  $\Delta bldA$  штаммах стрептоміцетів, що пояснювали можливою містрансляцією UUA-кодону (Leskiw et al. 1991; Trepanier et al. 2002; Makitrynskyu et al. 2013). Однак, доволі важко виявити містрансляцію, використовуючи ТТА-вмісні КГБ, з кількох причин. По-перше, такі кластери містять десятки генів, і кодони ТТА властиві лише кільком з них. А якщо ТТА<sup>+</sup>-гени неактивно





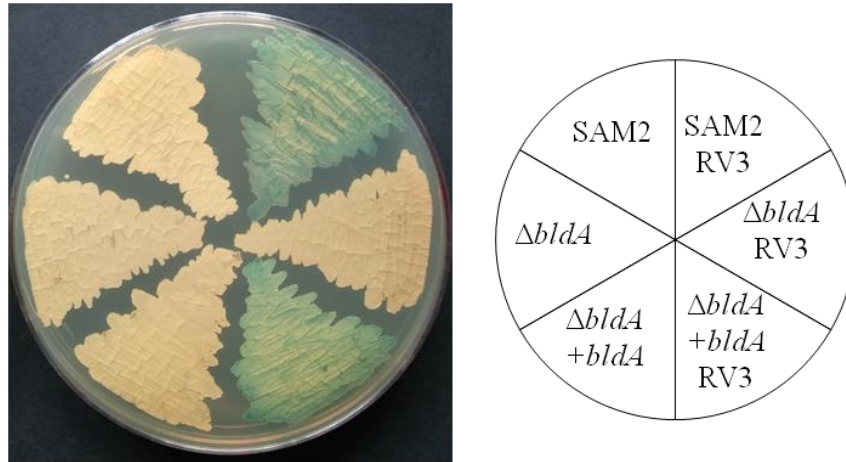
**Рис. 3.10.** Продукція штамом  $\Delta bldA$  гетерологічних антибіотиків, КГБ яких містять ТТА-кодони. **А.** Антибіотична активність проти *B. cereus*. Штами *S. albus*: 1 – SAM2 *ara*; 2 –  $\Delta bldA$  *ara*; 3 – SAM2; 4 –  $\Delta bldA$ . Стрептоміцети вирощували 5 діб на агаризованому SG1. **Б.** ТШХ екстрактів, отриманих з рідких культур стрептоміцетів (позначення як в А), вирощених 5 діб в середовищі SG1. Об'єм нанесених екстрактів нормалізовано відносно маси сухої біомаси в 1 мл культури. Трикутниками позначено комплекс аранціаміцинів, що продукує SAM2 *ara*<sup>+</sup>. **В.** Пригнічення росту *B. cereus* під дією екстрактів моеноміцинів з біомаси штамів SAM2 *moeno38-6* (Д) та  $\Delta bldA$  *moeno38-6* (М). Екстраговано метанолом та розчинено в однаковій кількості води. Об'єм екстрактів нормалізовано відносно концентрації сухої біомаси в 1 мл культури. Нанесено втричі більше екстракту на диск М. Як контроль (К), нанесено 0,1 мкг моеноміцину.

транскрибуються, кількість їх мРНК незначна. По-друге, експресія таких кластерів часто залежить від інших ТТА-вмісних регуляторів, що практично не утворюються в  $\Delta bldA$  штаммах (напр., AdpA). Загалом, продукція вторинних метаболітів є складним процесом і залежить від багатьох факторів. По-третє, кожен метод детекції вторинних метаболітів має свій

мінімальний поріг чутливості, і, якщо антибіотик продукується в надзвичайно малих кількостях, використані методи можуть його не виявити.

Тому, для докладнішої характеристики експресії ТТА<sup>+</sup>-генів в штамі *ΔbldA*, використано кілька ТТА-вмісних репортерних систем на основі генів *gusA* (кодує β-глюкуронідазу) (Myronovskyi et al. 2011) та *SCO3479* (ген *S. coelicolor*, кодує ортолога β-галактозидази). Такі репортерні системи є простими для тлумачення, оскільки рівень їхньої експресії безпосередньо визначає рівень активності репортера (глікозидазна активність). Такі репортери також чутливіші щодо детекції репортерної активності. Використання репортерної системи на основі гена *SCO3479* є можливим за рахунок того, що SAM2, на відміну від багатьох стрептоміцетів, не виявляє ендогенної галактозидазної активності щодо X-gal, оскільки не містить гена-ортолога *lacZ* (Koshla et al. 2017). Однак, методи для кількісного виявлення *SCO3479* для *S. albus* ще не розроблені, тому *SCO3479*-систему наразі можна використовувати лише для якісного аналізу. Натомість, GusA-активність можна охарактеризувати кількісно (Myronovskyi et al. 2011; Makitrynskyu et al. 2013).

Отже, плазмиду pRV3 (на основі інтегративного вектора pGСумRP21, містить ТТА<sup>+</sup>-версію гена *SCO3479* під контролем кумат-індукційного промотора (Koshla et al. 2017)) кон'югативно перенесено в SAM2, *ΔbldA* та *ΔbldA+bldA*. Транскон'югантів відібрано за стійкістю до апраміцину та спектиноміцину. Для детекції LacZ-активності RV3<sup>+</sup> та RV3<sup>-</sup> (контрольні) штами висівали на середовище TSA, що містило 30 мМ X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-β-D-галактопіранозид) та 50 мМ кумату (концентрація індуктора для оптимальної експресії з кумат-індукційного промотора). Чашки інкубували протягом 3 діб при 30°C. Типовий результат представлено на рис. 3.11. RV3<sup>+</sup>-штами дикого типу SAM2 та комплементований *ΔbldA+bldA* в зазначених умовах активно розщеплюють X-gal до продуктів



**Рис. 3.11.** β-галактозидазна активність штамів *S. albus* при рості на TSA з додаванням 30 мМ X-gal та 50 мМ індуктора кумату (кінцеві концентрації). Вигляд знизу. Штами засіяно як вказано на схемі праворуч. Вирощували 3 доби при 30°C. Утворення забарвленої речовини 5,5'-дибром-4,4'-дихлороіндиго свідчить про наявність β-галактозидазної активності.

синього забарвлення.  $\Delta bldA$  RV3 та усі штами без плазміди візуально β-галактозидазної активності не проявляють. Тобто, візуально не виявлено експресії ТТА<sup>+</sup>-гена *SCO3479* з плазміди pRV3 в  $\Delta bldA$ -мутанта за досліджуваних умов.

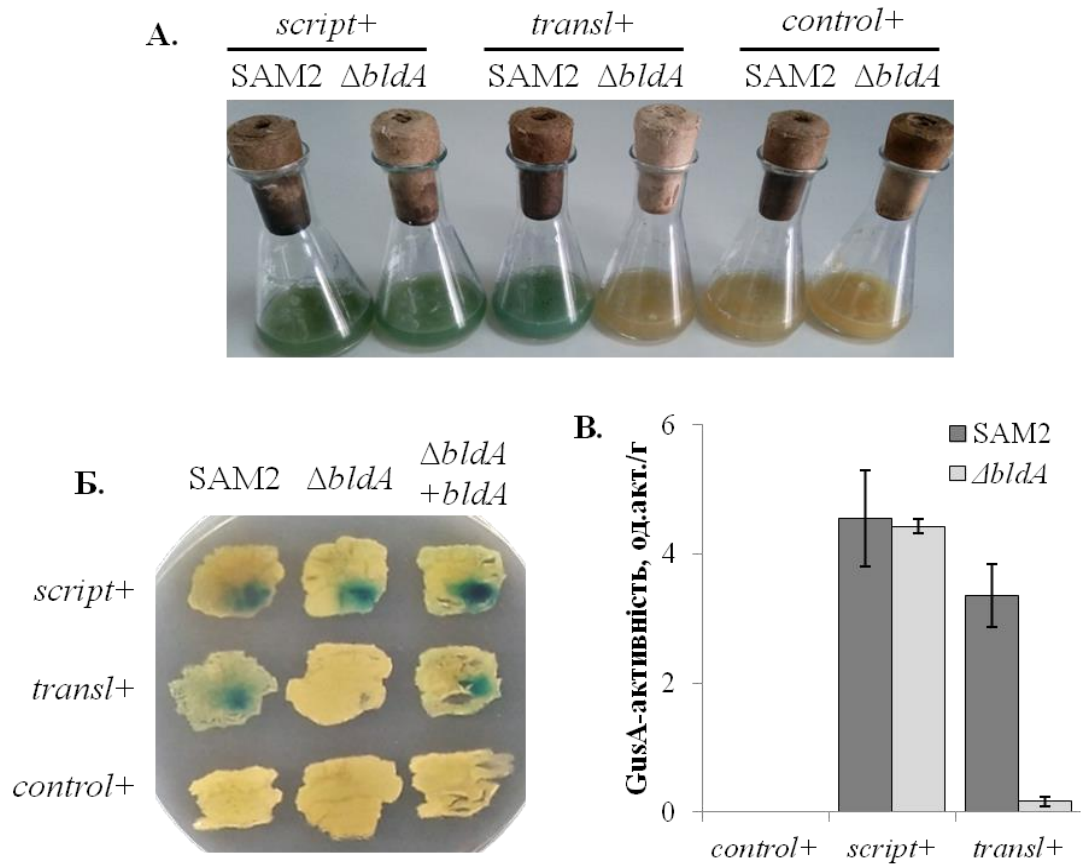
Іншою використаною ТТА-вмісною репортерною системою була вже наявна *gusA*-вмісна система, що включає в себе три інтегративні конструкти. Це плазміда padpAscript, що містила транскрипційне злиття промотора гена *adpA* *S. ghanaensis* з відкритою рамкою зчитування гена *gusA*; padpAtransl, що містила повне трансляційне злиття гена *adpA* (промотор та ORF) через лінкер HL4 з ORF *gusA*; варто зазначити, нативний ген *adpA* штаму *S. ghanaensis* містить ТТА-кодон; padpAcontrol, що містить трансляційне злиття як в padpAtransl, але без промотора *adpA*, (Makitrynskyu et al. 2010). Три плазміди індивідуально перенесені у штами SAM2 та  $\Delta bldA$ . Транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину. Результати тлумачили так: β-глюкуронідазна активність *control*<sup>+</sup>-штамів слугувала негативним контролем,

оскільки злиття без промотора *adpA-gusA* в нормі не експресується;  $\beta$ -глюкуронідазна активність *script*<sup>+</sup>-штамів корелює з транскрипційною активністю промотора *adpA<sub>p</sub>*;  $\beta$ -глюкуронідазна активність *transl*<sup>+</sup>-штамів відображає трансляційну активність злиття *adpA-gusA* під контролем *adpA<sub>p</sub>*.

Результати визначення  $\beta$ -глюкуронідазної активності продемонстровано на рис. 3.12. Візуально виявлена GusA-активність для рідких культур штамів SAM2, що несли як транскрипційне, так і трансляційне злиття *script*<sup>+</sup> та *transl*<sup>+</sup>, відповідно, та  $\Delta bldA$  *script*<sup>+</sup> (рис. 3.12.A).

При засіві штамів на агаризоване середовище та нанесенні розчину X-gluc безпосередньо на газони, виявлено високу активність розщеплення хромогенного субстрату для штамів  $\Delta bldA$  *script*<sup>+</sup>, SAM2 *script*<sup>+</sup> та SAM2 *transl*<sup>+</sup>,  $\Delta bldA+bldA$  *script*<sup>+</sup> та  $\Delta bldA+bldA$  *transl*<sup>+</sup>. Спостерігали утворення невеликої кількості синього продукту і для штаму  $\Delta bldA$  *transl*<sup>+</sup> (рис. 3.12.Б), що, можливо, було непомітним при рості в рідкому середовищі. Для *control*<sup>+</sup>-штамів GusA-активність не виявлено.

Далі кількісно характеризували  $\beta$ -глюкуронідазну активність стрептоміцетів за реакцією лізатів останніх з субстратом *p*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкуронідом. Лізати отримували з 48-годинних рідких культур, вирощених в TSB при 30°C. Активність обраховували за кількістю утвореного продукту реакції (визначали спектрофотометрично при довжині хвилі світла 415 нм) та подавали в од.акт. на 1 грам сухої біомаси культури. Виявили, що активність лізатів *script*<sup>+</sup>-штамів є приблизно однаковою як для SAM2, так і для  $\Delta bldA$ . На підставі цього виключено зміни транскрипційної активності промотора *adpA<sub>p</sub>* для штаму  $\Delta bldA$ , в порівнянні з диким типом. Оскільки ORF гена *adpA* містить TTA-кодон, очікуваною була б повна відсутність GusA-активності для штаму  $\Delta bldA$  *transl*<sup>+</sup>. Однак, незважаючи на це, така активність становила в середньому 0,16 од.акт./г, що в 21 раз нижча, ніж в SAM2 *transl*<sup>+</sup>, однак все ще детектується (рис. 3.12.В). Це може свідчити про утворення невеликої



**Рис. 3.12.**  $\beta$ -глюкуронідазна активність (GusA) штамів SAM2,  $\Delta bldA$ ,  $\Delta bldA+bldA$ , що несуть конструкти *padpAscript* (*script*<sup>+</sup>), *padpAtransl* (*transl*<sup>+</sup>), *padpAcontrol* (*control*<sup>+</sup>). **A.** Штами вирощували 48 год в 10 мл TSB при 30°C, потім додано X-gluc (30 мМ) та інкубовано 2 год. **Б.** Газони засіяно на TSA, інкубовано 48 год при 30°C, розчин X-gluc нанесено на правий нижній кут газонів (при вигляді знизу) та інкубовано 2 год. Наявність синього забарвлення в **A** та **Б** свідчить про GusA-активність. **В.** GusA-активність лізатів зазначених штамів стрептоміцетів. Виражена в од.акт. на грам сухої біомаси. Подано результат як мінімум трьох повторів, планки похибок позначають стандартне відхилення.

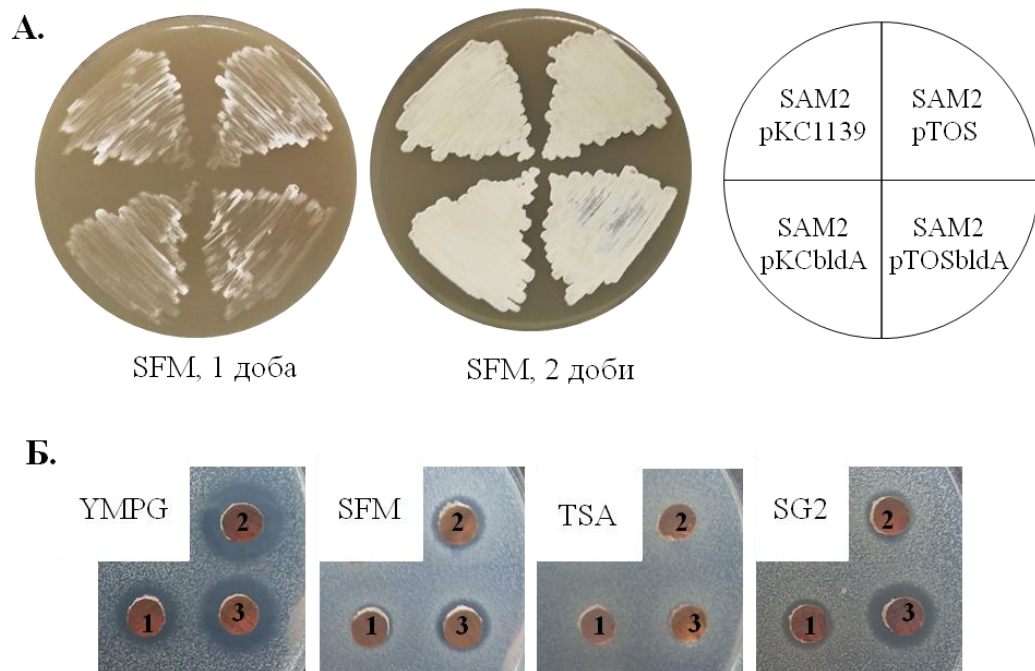
кількості, однак функціональних білкових молекул з GusA-активністю в штамі  $\Delta bldA$ , незважаючи на присутність ТТА-кодона в складі

трансляційного злиття *adpA-gusA* та відсутність тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> для його декодування (Koshla and Ostash 2018).

Для додаткового внесення копії *bldA* в SAM2 використали 2 конструкти: вже згадану інтегративну плазмиду pTOSbldA для введення однієї додаткової копії гена під контролем нативного промотора, та реплікативну плазмиду pKCbldA (на основі олігокопійного реплікативного вектора pKC1139 (Kieser et al. 2000), у який по сайтах дії HindIII/XbaI клоновано той же фрагмент, що і в pTOSbldA). Обидві плазмиди індивідуально перенесено у штам SAM2; так отримано штами SAM2 pTOSbldA та SAM2 pKCbldA. Транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину в обидвох випадках.

Внесення додаткових копій гена *bldA* не приводило до видимих морфологічних змін чи динаміки морфологічного розвитку при рості на твердих середовищах, порівняно з контрольними штамами, що несли порожні вектори pTOS чи pKC1139. На рис. 3.13.А проілюстровано ріст досліджуваних та контрольних штамів протягом першої та другої діб розвитку на середовищі SFM.

Враховуючи, що нокаут *bldA* практично припиняє експресію TTA<sup>+</sup>-кластера пауломіцинів для SAM2, цікавим є вплив наявності додаткових копій гена на продукцію протибактерійних речовин. Для визначення цього, провели біотест на пригнічення росту *B. cereus* під впливом метаболітів досліджуваних штамів (рис.3.13.Б). Виявили, що ефект на продукцію антибіотичних сполук залежить від середовища та кількості внесених додаткових копій гена. Наприклад, протибактерійна активність не детектувалась при рості стрептоміцетів на TSA, зростала, незалежно від кількості внесених додаткових копій гена, при рості на YMPG чи SFM. На SG2, лише надекспресант з внесеною pKCbldA (10-30 копій гена *bldA* на геном) виявляв підвищений синтез протибактерійних сполук, імовірно пауломіцинів (рис. 3.13.Б).



**Рис. 3.13.** А. Морфологія штамів *S. albus* з додатковими внесеними копіями гена *bldA* на середовищі SFM при 30°C. Штами засіяно як вказано на схемі праворуч. Б. Пригнічення росту *B. cereus* під дією метаболітів штамів SAM2 pTOS (1), SAM2 pTOSbldA (2), SAM2 pKCbldA (3). Стрептоміцети вирощували 5 діб при 30°C на вказаних середовищах перед виконанням біотесту.

За матеріалами підрозділу опубліковано наступні праці: (Рокицький та Кошла 2016, 2017).

Сконструйовано *bldA*-мутанта *S. albus*. Штам виявляє кондиційні дефекти морфологічного розвитку, однак все ще здатний до утворення повітряного міцелію і спор за певних умов. Мутант практично не продукує вторинні метаболіти, КГБ яких містять кодони ТТА, однак продукція кандицидинів зростає. В *bldA* не виявлено експресії ТТА-вмісних репортерних генів, за винятком низької експресії злиття *adpAp-adpA-gusA*.

### 3.3. Мутанти *S. albus* за генами, що кодують білки посттранскрипційних модифікацій тРНК

Серед усіх типів нуклеїнових кислот, для нуклеозидів тРНК характерна найбільша кількість різноманітних за своєю хімічною природою модифікацій. При цьому, специфічно модифікуються певні позиції молекули, залежно від функцій тієї чи іншої модифікації (El Yacoubi, Bailly, and de Crécy-Lagard 2012; Shepherd and Ibba 2015). Наприклад, перетворення уридину в псевдоуридин чи дигідроуридин потрібні для підтримання необхідної просторової структури молекул тРНК. Утворення інозину на місці аденозину в 34-му положенні тРНК<sup>Arg</sup><sub>IGC</sub> дає можливість розпізнавати аргінінові кодони CGA, CGC, CGU, адже інозин може утворювати “хиткі” пари з A, C та U. Для тРНК<sup>Lys</sup><sub>K2CAU</sub>, утвореної з тРНК<sup>Met</sup><sub>CAU</sub> шляхом приєднання залишку лізину в 34-му положенні, змінюється амінокислотна специфічність від метіоніну до ізолейцину (розшифровує кодон AUA) (Suzuki and Miyauchi 2010). Обсяг і роль модифікацій тРНК у біології стрептоміцетів досі не вивчались, і ми вирішили дослідити це питання на моделі *S. albus*.

**3.3.1. Біоінформатичний пошук генів, що кодують білки-модифікатори тРНК у стрептоміцетів.** Утворення кожної модифікації тРНК каталізують специфічні білки чи групи білків. Для ідентифікації можливих ортологів таких білків у стрептоміцетів, використовували програму BLASTP зі стандартними налаштуваннями. Проводили перехресне попарне вирівнювання з білками, функції яких визначені як такі, що модифікують нуклеїнові кислоти. Здебільшого, це були білки *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, бактерій родів *Pseudomonas* та *Bacillus*, оскільки саме для цих організмів найповніше вивчено процеси модифікації тРНК та описано функції ферментів, що ці модифікації каталізують. Виконали пошук ортологів низки білків, що модифікують тРНК, для *S. coelicolor* A(3)2 та



*S. albus* J1074 (Rokytskyu et al. 2016). Вибірку ідентифікованих протеїнів, що виявили високий та середній рівень гомології з відомими білками, перелічено в Таблиці 3.3 (подано за позначенням генів, що їх кодують).

Таблиця 3.3.

**Білки, що модифікують тРНК, та їхні можливі ортологи для  
*S. coelicolor* A(3)2 і *S. albus* J1074**

Білок	Назва	Модифікації (U – уридин, C – цитидин, A – аденозин, G – гуанозин)	Можливі ортологи	
			<i>S.</i> <i>coelicol</i> <i>or</i> A3(2) (SCO*)	<i>S. albus</i> J1074 (XNR_)
1	2	3	4	5
IscS	Цистеїн десульфураса	Кофактор для інших ензимів, що задіяні в тіо-модифікаціях тРНК	5486	1347 (RS06665)
IscU	Fe-S-вмісний асамблейний білок		1920	4942 (RS24480)
TruA	тРНК псевдоуридин (38,39,40) синтаза	U в псевдоуридин (Y)	4731	3758 (RS18620)
TruB	тРНК псевдоуридин (55) синтаза		5709	1143 (RS05670)
RluA	тРНК псевдоуридин (32) синтаза / рибосомна псевдоуридин синтаза A		2073	4806 (RS23805)
DusB	тРНК дигідроуридин синтаза B	U в дигідроуридин (D)	2497	4421 (RS21895)
TilS	тРНК лізидин (34) синтетаза	C в 2-лізидин (k <sup>2</sup> C) для тРНК <sup>Leu</sup> <sub>k2CAU</sub>	3406	3428 (RS17005)

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5
MnmA	тРНК-специфічна 2-тіоуридилаза	U в 2-тіоуридин ( $s^2U$ ), в т.ч. і для уже модифікованого U	5488	1345 (RS06655)
MiaA	тРНК (аденозин (37)-N6)-диметилалілтрансфераза	A в N6-ізопентеніладенозин ( $i^6A$ )	5791	1074 (RS05320)
MiaB	тРНК (N6-ізопентеніл аденозин (37)-C2)-метилтіотрансфераза	$i^6A$ в 2-метилтіо- $i^6A$ ( $ms^2i^6A$ )	5787	1078 (RS05340)
TsaC	тРНК N6-треонілкарбамоїладенозин (37) синтазний білок	A в N6-треонілкарбамоїладенозин ( $t^6A$ )	5362	1471 (RS07295)
TsaB	Частини тРНК N6-треонілкарбамоїладенозин (37) синтазного комплексу TsaBDE		4750	3789 (RS18775)
TsaD			4752	3791 (RS18785)
TsaE			4747	3786 (RS18760)
TadA	тРНК-специфічна аденозин деаміназа	A в інозин (I) для тРНК <sup>Arg</sup> <sub>ICG</sub>	4038	2881 (RS14295)
QueA	тРНК преQ1(34) S-аденозилметіонін рибозилтрансфераза-ізомераза	7-амінометил-7-деазагуанозин (preQ1tRNA) в епоксигуанозин (oQtRNA)	1804	5018 (RS24850)
TrmB	тРНК (гуанозин (46)-N7-метилтрансфераза	G в 7-метилгуанозин ( $m^7G$ )	4111	2813 (RS13945)
TrmD	тРНК (гуанозин (37)-N1)-метилтрансфераза	G в 1-метилгуанозин ( $m^1G$ )	5594	1214 (RS06025)

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5
TrmI	тРНК (аденозин (58)-N1)-метилтрансфераза	А в 1-метиладенозин (m <sup>1</sup> A)	1651	5177 (RS25660)

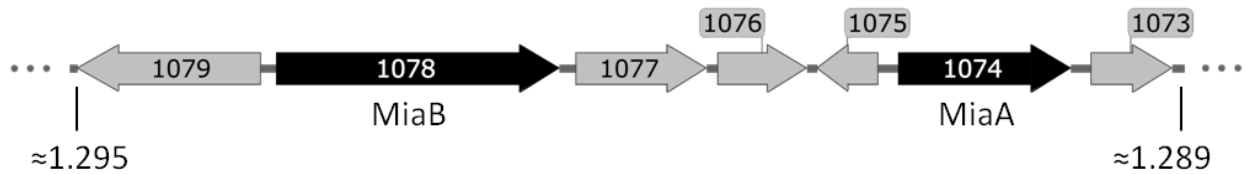
Примітка: \*позначено префікс ідентифікатора гена, що кодує білок; для *S. albus* подані старі та нові (в дужках) назви локусів, напр., для XNR\_1074 та XNR\_RS05320.

Однак варто зазначити, що стрептоміцети, як представники актинобактерій, філогенетично досить далекі від тих організмів, білки яких слугували еталонами для пошуку. Тому, для деяких груп білків, як-от різноманітних метилтрансфераз чи сульфуртрансфераз, не вдалось ідентифікувати можливих ортологів з задовільним рівнем гомології (хіти вирівнювання, S-рахунок яких становить 50-80 бітів і більше). Втім, ідентифіковано можливі білки стрептоміцетів, що задіяні в синтезі псевдоуридину, дигідроуридину, тіомодифікаціях, метилюванні основ, включенні лізинового, ізопентенілового, треонілкарбамоїлового залишків у позиції тРНК та ін.

Ідентифіковані білки стрептоміцетів становлять значний інтерес для вивчення процесів модифікації основ тРНК та тРНК-опосередкованої регуляції експресії генів роду *Streptomyces*, для яких ці процеси раніше не описані. Хіба що, за винятком *bldA*-регуляції, однак в цьому випадку не вивчали значення модифікацій тРНК, а зосереджувались на регуляторному тандемі тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> – UUA<sup>+</sup>-мРНК. Наші попередні дослідження ролі гена *bldA* вказують на те, що посттранскрипційні модифікації тРНК можуть слугувати засобом, який контролює час появи у клітині зрілої тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>.

Для подальшого дослідження обрано гени, що кодують можливих ортологів MiaA та MiaB (Pierrel et al. 2004; Schweizer, Bohleber, and Fradejas-

Villar 2017), *XNR\_1074* та *XNR\_1078*, відповідно (рис.3.14). Гени розташовані на невеликій відстані одне від одного, така їхня локалізація зберігається і в



**Рис. 3.14.** Організація генів, що кодують ортологів MiaA та MiaB, в геномі *S. albus* SAM2. Числами позначено приблизні хромосомні локації в млн.п.н.

багатьох інших стрептоміцетів. Згідно з опублікованими даними (Zaburannyi et al. 2014) та власними даними аналізу транскриптому J1074, які частково описані у (Ostash et al. 2018; Koshla et al. 2019), гени *XNR\_1074* та *XNR\_1078* не належать до тих, що транскрибуються активно.

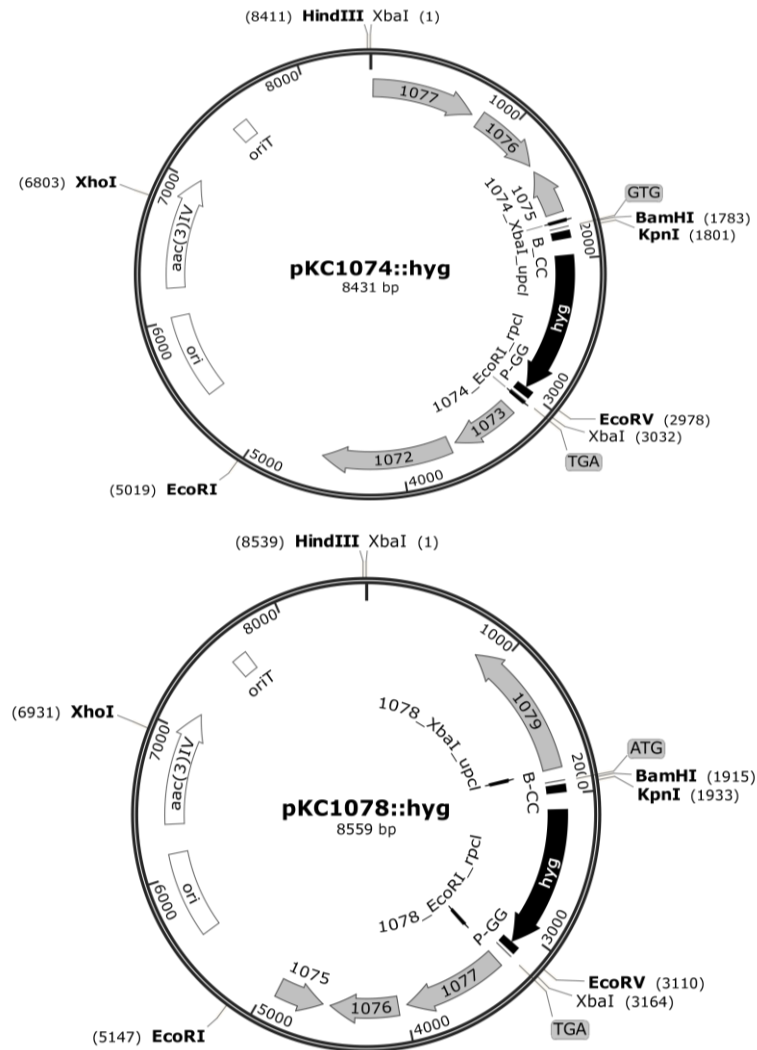
Білки MiaA та MiaB не є життєво важливими для *E. coli* чи *S. typhimurium*, однак, наявність каталізованих ними тРНК-модифікацій впливає на ефективність трансляції певних груп білків, загальні процеси росту та прояви деяких ознак (Persson et al. 1998; Aubee, Olu, and Thompson 2016, 2017). MiaA каталізує приєднання ізопентенілового залишку до позиції N6 аденозину для деяких із тих тРНК, що містять позиції A36A37, тобто розшифровують кодони, що починаються з U. Продукт реакції – N6-ізопентеніладенозин ( $i^6A$ ). MiaB є наступним ферментом, що модифікує ту ж саму позицію,  $i^6A37$ , з приєднанням метилтіо-групи в положенні C2 та утворенням 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенозину ( $ms^2i^6A37$ ). Описано, що MiaB використовує як субстрат продукт каталізу MiaA. Для *E. coli* Mia-контрольований процес модифікації закінчується утворенням  $ms^2i^6A37$  (Pierrel et al. 2004; Kaminska et al. 2007; Schweizer, Bohleber, and Fradejas-Villar 2017). Однак, для *S. typhimurium* характерна гіпермодифікація позиції A37, що контролюється гідроксилазою MiaE, та полягає в утворенні цис-

гідроксиізопентиніладенозину, як в складі  $ms^2io^6A37$ , так і  $io^6A37$  (Persson and Björk 1993; Mathevon et al. 2007). Шляхом первинного біоінформатичного аналізу можливого ортолога MiaE для стрептоміцетів не виявлено.

**3.3.2. Нокаут генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* і комплементация мутантних фенотипів.** Першим етапом дослідження функцій генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* було конструювання їхніх нокаутів для *S. albus* SAM2. Для генерації нокаутів використовували плазмиди рКС1074::hyg та рКС1078::hyg, карти яких зображені на рис.3.15.

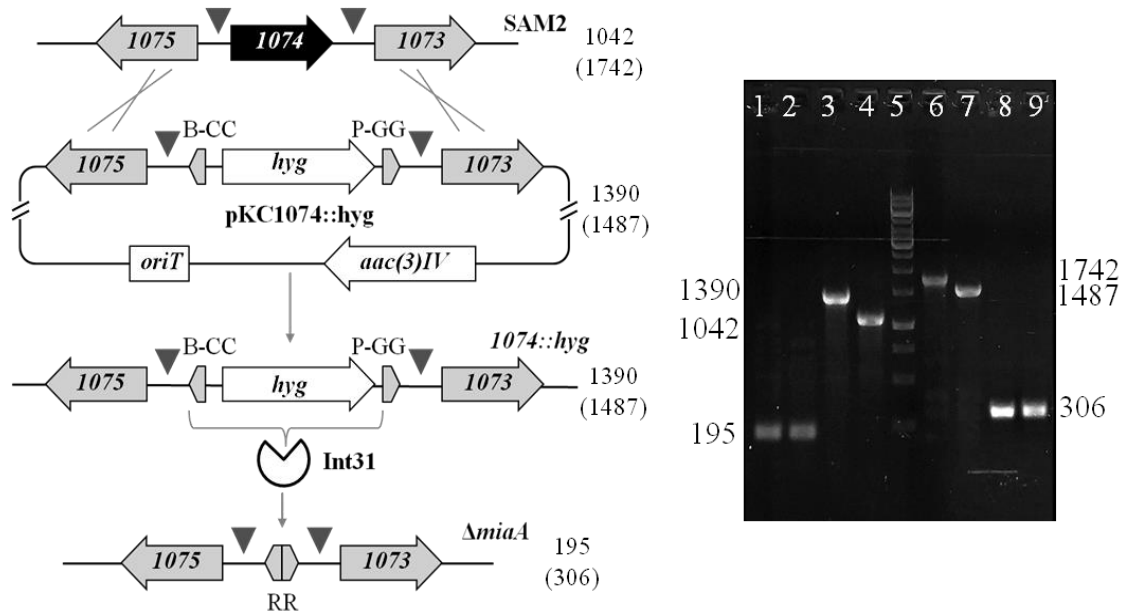
Обидві плазмиди сконструйовано на основі нереплікативного (у стрептоміцетах) вектора, рКС1132 (Kieser et al. 2000). З геному SAM2 за допомогою пар праймерів 1074\_XbaI\_up та 1074\_EcoRI\_gp, 1078\_XbaI\_up та 1078\_EcoRI\_gp, ампліфіковано фрагменти розміром 4,7 тис.п.н. та 5,4 тис.п.н., що містили гени *XNR\_1074* та *XNR\_1078*, відповідно. Обидва фрагменти клоновано по сайтах дії ендонуклеаз рестрикції XbaI та EcoRI в рКС1132; так сконструйовано рКС1074 і рКС1078. Далі в складі вказаних плазмід ORF генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* замінено на касети стійкості до гігromіцину за допомогою ПЛР-спрямованого заміщення фрагментів ДНК Redirect (Gust, Kieser, and Chater 2002; Gust et al. 2003). Касети стійкості до гігromіцину ампліфіковано із плазмиди patt-shyg (Myronovskyi, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014) з використанням пар праймерів 1074\_uprd та 1074\_rprd, 1078\_uprd та 1078\_rprd. В обох випадках, розмір ампліфікованих касет становив 1359 п.н. Після заміщення від генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* в рКС1074::hyg та рКС1078::hyg залишились лише старт- та стоп-кодони.

Отримані плазмиди перенесли в штам SAM2. Схему генерації мутантів, на прикладі генерації  $\Delta miaA$  штаму, зображено на рис. 3.16. Транскон'югантів, в яких відбувся первинний кросинговер, відбирали за стійкістю до гігromіцину. Серед цих клонів проводили селекцію апраміцин-чутливих рекомбінантів (ознака вторинного кросинговеру). Отже, фенотип



**Рис. 3.15.** Схеми плазмід pKC1074::hyg та pKC1078::hyg. *aac(3)IV* – ген стійкості до апраміцину; *ori* – ділянка початку реплікації від pUC18; *oriT* – ділянка початку кон'югаційного перенесення; *hyg* – ген стійкості до гігроміцину; P-GG та B-CC – сайти впізнавання інтегрази Int31; 1077, 1076 (і ін.) – ORFs генів SAM2; GTG, ATG – старт кодони генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078*, відповідно; TGA – стоп-кодони. Також вказані сайти гібридизації праймерів (напр., 1074\_XbaI\_upcl).

рекомбінантів *1074::hyg*, в яких відбулося заміщення ORF гена *XNR\_1074* на касету стійкості до гігроміцину, Am<sup>S</sup>, Hyg<sup>R</sup> (приблизно 7% серед усіх отриманих Hyg<sup>R</sup>-рекомбінантів). Для генерації безмаркерних мутантів, у

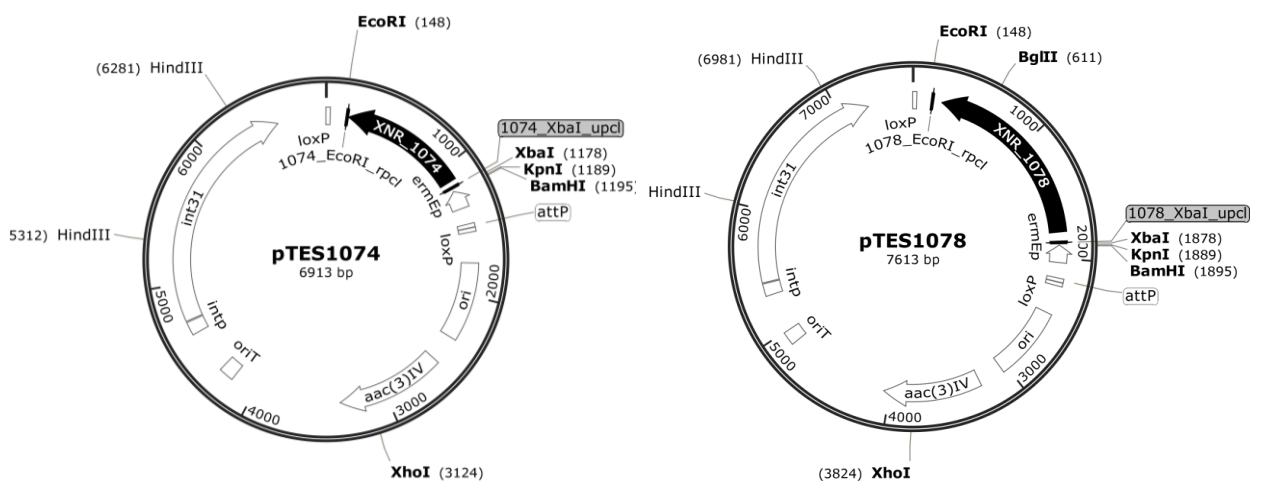


**Рис. 3.16. А.** Схема конструювання штаму  $\Delta miaA$  ( $\Delta miaB$  конструювали аналогічно). *1074* – *XNR\_1074* кодує ортолога *MiaA*; *hyg* – ген стійкості до гігроміцину; *oriT*, *aac(3)IV*, P-GG і B-CC, RR – див. рис. 3.5.А; трикутниками позначено сайти гібридизації праймерів *1074\_XbaI\_upc1* та *1074\_EcoRI\_rpc1*; вказано очікувані розміри ампліконів (в дужках – для праймерів *1078\_XbaI\_upc1* та *1078\_EcoRI\_rpc1* при генерації  $\Delta miaB$ ) в п.н. **Б.** ПЛР-діагностика genomних перебудов у  $\Delta miaA$  та  $\Delta miaB$ . Доріжки: 1,2 – видалення маркера в 2 клонах  $\Delta miaA$ ; 3 – заміщення *XNR\_1074* на *hyg* в штамі *1074::hyg*; 4 – ампліфікація *XNR\_1074* з геному SAM2; 5 – ДНК-маркер 1 kb DNA Ladder; 6 – ампліфікація *XNR\_1074* з геному SAM2; 7 – заміщення *XNR\_1078* на *hyg* в штамі *1078::hyg*; 8,9 – видалення маркера в 2 клонах  $\Delta miaB$ .

клітини *1074::hyg* переносили плазмиду pUWLint31, з якої експресували інтегразу фага PhiC31, Int31. Остання, як і у випадку генерації безмаркерного штаму  $\Delta bldA$ , впізнавала P-GG і B-CC сайти і видаляла послідовність між ними (Myronovskyi, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014). Таким чином, отримано штаму  $\Delta miaA$ , в якому на місці гена *XNR\_1074* залишився залишковий короткий RR-сайт. Коректність всіх хромосомних перебудов підтверджували шляхом ампліфікації специфічних ділянок за допомогою

праймерів 1074\_XbaI\_upcl 1074\_EcoRI\_rpc1, а у випадку конструювання  $\Delta miaB$  – з праймерами 1078\_XbaI\_upcl 1078\_EcoRI\_rpc1.

Плазміди для комплементації можливих фенотипів  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$  генами *XNR\_1074* та *XNR\_1078*, відповідно (які використовували також і для внесення додаткових копій вказаних генів у SAM2), сконструйовано на основі інтегративного вектора pTES (Herrmann et al. 2012) як наведено на рис. 3.17.



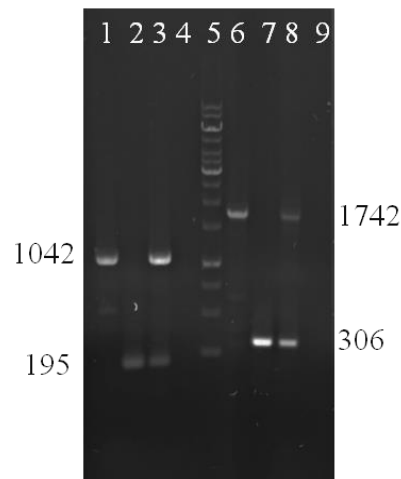
**Рис. 3.17.** Схематична будова плазмід pTES1074 та pTES1078. *aac(3)IV*, *ori*, *oriT* – див. рис. 3.14; *int31*, *intp* – ген інтегрази фага PhiC31 під контролем власного промотора; *loxP* – сайти впізнавання рекомбінази Cre; *attP* – сайт інтеграції фага PhiC31; *ermEp* – промотор гена еритроміцин-метилтрансферази *ermE*; *XNR\_1074*, *XNR\_1078* – гени SAM2. Також вказані сайти гібридизації праймерів (напр., 1074\_XbaI\_upcl).

Для цього з геному SAM2 із використанням пар праймерів 1074\_XbaI\_upcl 1074\_EcoRI\_rpc1, та 1078\_XbaI\_upcl 1078\_EcoRI\_rpc1 ампліфіковано фрагменти розміром 1042 і 1742 п.н., що містили ORFs генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* разом із можливими RBSs. Далі ці фрагменти клоновано по сайтах дії ендонуклеаз рестрикції XbaI і EcoRI під контроль



конститутивного промотора *ermEr*. Так сконструйовано плазміди рTES1074 і рTES1078.

Для комплементації можливих фенотипів  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$ , плазміди перенесено в мутантні штами. Отриманих комплементантів  $\Delta miaA+1074$  та  $\Delta miaB+1078$  відбирали за стійкістю до апраміцину. Факт інтеграції плазмід в хромосоми перевіряли за допомогою ампліфікації специфічних ділянок із праймерами 1074\_XbaI\_upcl та 1074\_EcoRI\_rpcl, 1078\_XbaI\_upcl та 1078\_EcoRI\_rpcl (рис. 3.18).

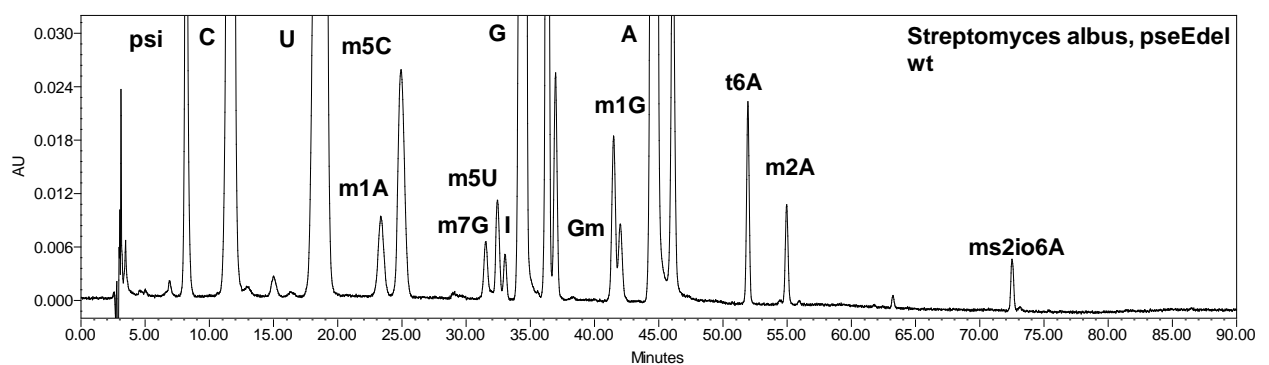


**Рис. 3.18.** Електрофореграма ПЛР-ампліфікації, специфічної для генів *XNR\_1074* (праймери 1074\_XbaI\_upcl 1074\_EcoRI\_rpcl, лунки 1-4) та *XNR\_1078* (праймери 1078\_XbaI\_upcl та 1078\_EcoRI\_rpcl, лунки 6-9). Лунки: 1 – ампліфікація *XNR\_1074* з геному SAM2; 2 – залишковий шрам на місці *XNR\_1074* в геномі  $\Delta miaA$ ; 3 – утворення 2 продуктів після внесення копії *XNR\_1074* у геномі  $\Delta miaA+1074$ ; 4 – негативний контроль; 5 – ДНК маркер 1 kb DNA Ladder; 6 – ампліфікація гена *XNR\_1078* з геному SAM2; 7 – залишковий шрам на місці *XNR\_1078* в геномі  $\Delta miaB$ ; 8 – утворення 2 продуктів після внесення копії *XNR\_1078* у геномі  $\Delta miaB+1078$ ; 9 – негативний контроль. Числа вказують розмір отриманих продуктів в п.н.

Для внесення додаткової копії генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* в геном SAM2, використовували ті ж інтегративні плазміди, що і для комплементації. Штами SAM2+1074 та SAM2+1078 відбирали за стійкістю до апраміцину.

**3.3.3. Аналіз модифікацій тРНК штамів SAM2, *ΔtiaA*, *ΔtiaB*.** Для підтвердження ролі продуктів генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* у процесах Міа-контрольованої модифікації аденозину, виділено та проаналізовано тРНК зі штамів-мутантів, а також дикого типу SAM2. Штами вирощували в рідкому середовищі TSB при 30°C протягом 48 год перед забором біомаси та ізоляцією фракції загальних тРНК. Далі молекули тРНК гідролізували до нуклеозидів і аналізували, як описано в Методах.

Варто зазначити, що такий аналіз модифікацій тРНК стрептоміцетів раніше не описаний (принаймні, на основі доступної інформації), тому важливим було ідентифікувати загальні різновиди модифікацій тРНК стрептоміцетів. Зокрема, на рис. 3.19 представлено результати ВЕРХ гідролізатів тРНК штаму *S. albus* SAM2. Як бачимо, ідентифіковано більшість мажорних модифікацій, характерних для тРНК бактерій загалом.



**Рис. 3.19.** Хроматограма ВЕРХ гідролізатів тРНК, отриманих зі штаму SAM2 (48 год росту в середовищі TSB). Вісь абсцис – час виходу сполук в хв, вісь ординат – значення абсорбції, в AU.

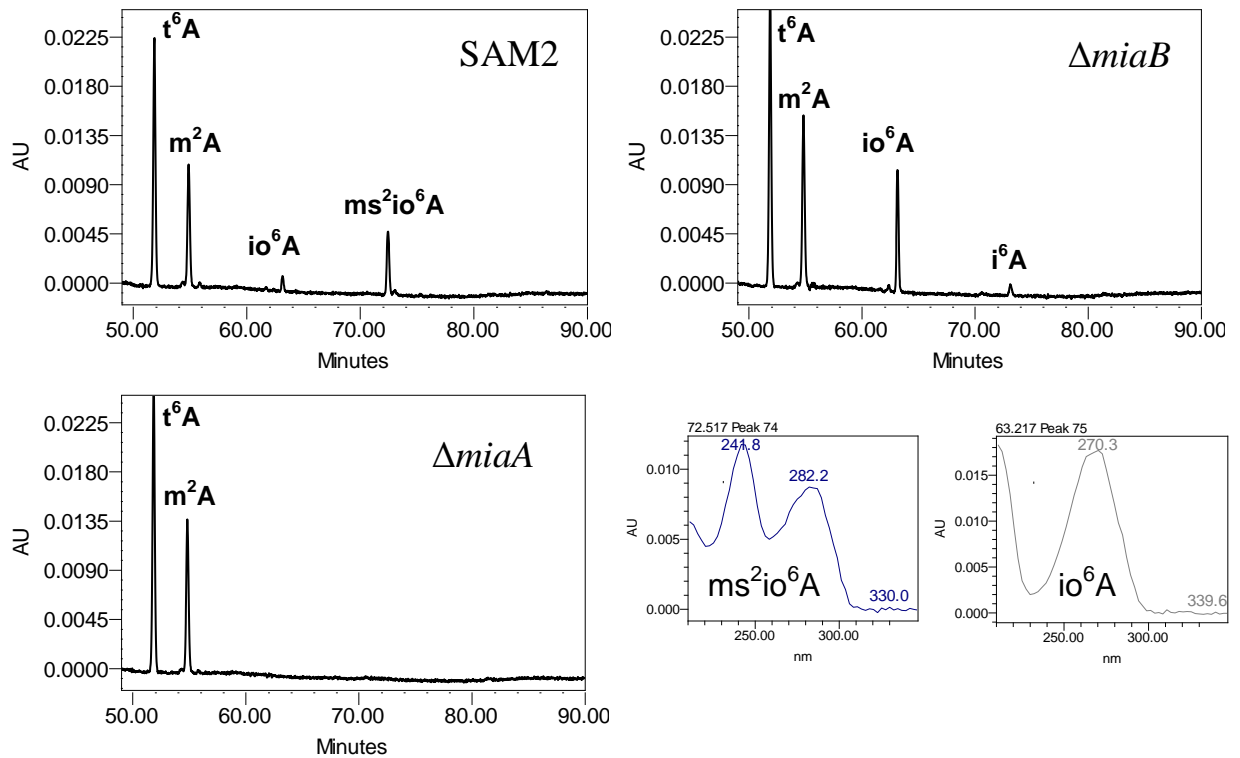
Для J1074 ідентифіковано можливі білки, що каталізують більшість цих модифікацій, як-от  $m^1G$ ,  $m^7G$ , I,  $t^6A$ ,  $ms^2i^6A$  (табл. 3.3). Низку модифікацій, які притаманні лише певним тРНК та представлені в слідових кількостях (як-от U34m,  $cmnm^5U$ , див. рис. 1.2 й 1.3), методом ВЕРХ виявити неможливо.

Докладніше зупинимося на виявленій модифікації  $ms^2i^6A$ , яку каталізують Mia-білки. Зважаючи на те, що ця модифікація присутня в гідроксильованій формі, геном SAM2 має кодувати три білки, які її каталізують, а саме ортологів MiaA, MiaB та MiaE (Kaminska et al. 2007).

Ортолога MiaE, згідно попереднього аналізу, за гомологією з ентеробактерійним білком, ідентифікувати не вдалося. Функцію продуктів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* в Mia-контрольованій модифікації A37 підтверджено за результатами аналізів гідролізатів тРНК мутантних штамів  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$ , що представлено на рис. 3.20.

Як бачимо, для SAM2 характерна присутність  $ms^2i^6A$  і, в меншій кількості,  $i^6A$ . Такі ж фінальні форми Mia-контрольованих модифікацій аденозину характерні і для іншого стрептоміцета, *S. ghanaensis* (Sehin et al. 2018). Штам  $\Delta miaA$  не формує жодних ізопентенілових похідних аденозину, оскільки нокаут *XNR\_1074* веде до скасування першої реакції модифікації, а в  $\Delta miaB$  не відбувається наступне метилгіювання. Водночас, нокаут *XNR\_1078* приводить до збагачення фракції  $i^6A$ . Таким чином, підтверджено, що продукти генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* є функціональними ортологами білків MiaA та MiaB в SAM2. Присутність гідроксильованої форми ізопентенілового залишку свідчить про наявність функціонального гомолога MiaE.

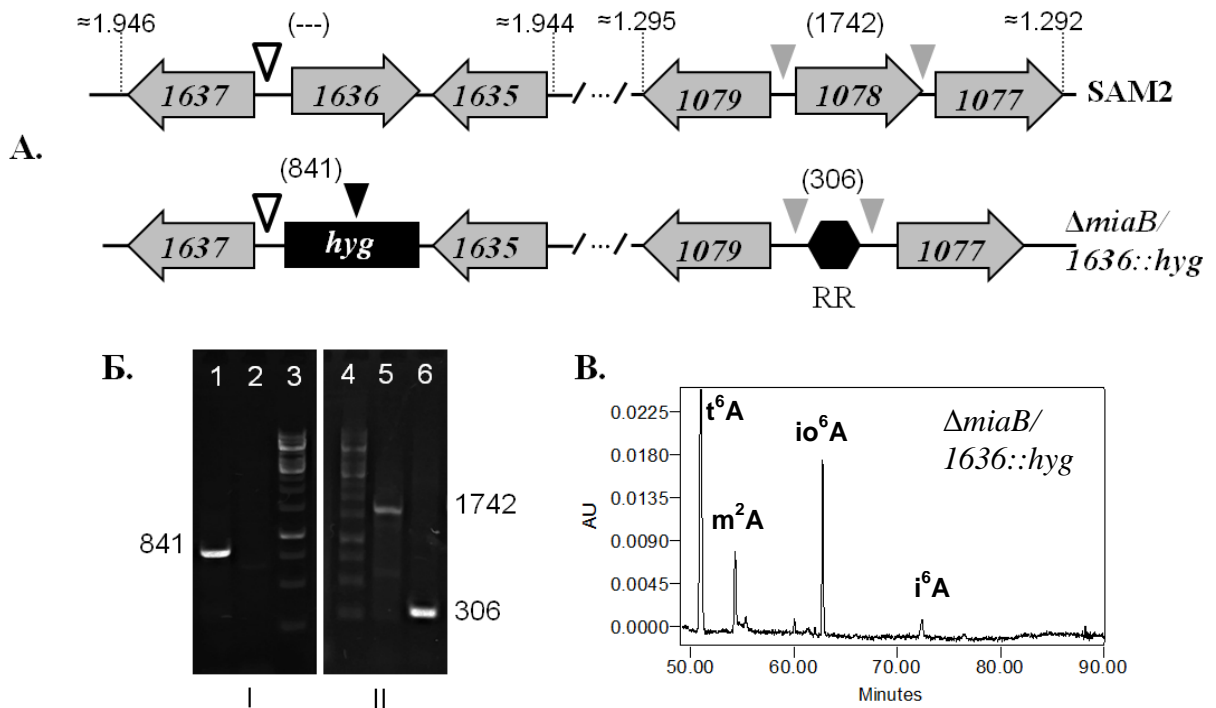
**3.3.4. Пошук можливого ортолога MiaE для SAM2.** Глибший аналіз протеому J1074, що ґрунтувався на пошуку домен-орієнтованих структурних гомологій (Zimmermann et al. 2018), дав змогу виявити можливого кандидата



**Рис. 3.20.** Хроматограми ВЕРХ гідролізатів тРНК штамів SAM2,  $\Delta miaB$ ,  $\Delta miaA$  та УФ-спектри, характерні для модифікованих ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A та io<sup>6</sup>A. Вісь абсцис – час виходу сполук в хв (або довжина хвилі світла, в нм, для спектрів), вісь ординат – значення абсорбції, в AU.

на роль MiaE, продукта гена *XNR\_1636* (*XNR\_RS08125*). Ген кодує можливу гідроксилазу, його ортологи присутні в геномах стрептоміцетів та в багатьох з них анотовані як MiaE-подібні білки. Сконструйований подвійний нокаутний штам  $\Delta miaB/1636::hyg$  (на основі  $\Delta miaB$  за допомогою плазміди p1636::hyg, аналогічно до описаного 1074::hyg) (рис. 3.21.А). Підтвердження заміщення гена *XNR\_1636* на касету стійкості до гігроміцину отримали на підставі ПЛР-ампліфікації зі специфічними праймерами xnr1636\_XbaIup (комплементарний до 5'-фланку перед ORF *XNR\_1636*) та pattshyg\_hyg\_gp (гібридується до ORF гена стійкості до гігроміцину) (рис. 3.21.Б).

Тим не менше, аналізуючи результати ВЕРХ гідролізатів тРНК штаму  $\Delta miaB/1636::hyg$ , ідентифікували модифікацію io<sup>6</sup>A (рис. 3.21.В). Це свідчить



**Рис. 3.21.** А. Схема заміщення гена *XNR\_1636* на касету стійкості до гігроміцину (*hyg*) в штамі  $\Delta miaB/1636::hyg$  (RR – шрам після нокауту *miaB*) та аналогічні ділянки хромосоми SAM2. Над пунктирами позначено хромосомні локації в млн.п.н. Сірими трикутниками позначено сайти гібридизації праймерів 1078\_XbaI\_upcl (II) і 1078\_EcoRI\_gpcl (II), білими – *xnr1636\_XbaI\_up* (I) і чорним – *pattshyg\_hyg\_gp* (I). В дужках наведені очікувані розміри продуктів в п.н. Б. Електрофореграми ПЛР-ампліфікації з використанням праймерів I та II. Лунки: 1 – заміщення *1636::hyg* в  $\Delta miaB/1636::hyg$ ; 2 – продукт в SAM2 відсутній; 3,4 – ДНК маркер 1 kb DNA Ladder; 5 – ампліфікація *XNR\_1078* з геному SAM2; 6 – шрам на місці *XNR\_1078* в геномі  $\Delta miaB$ . Числа вказують розміри отриманих продуктів в п.н. В. Хроматограма ВЕРХ гідролізатів тРНК штаму  $\Delta miaB/1636::hyg$ . Найвний пік гідроксильованої модифікації  $io^6A$ . Вісь абсцис – час виходу сполук в хв, вісь ординат – значення абсорбції, в AU.

про те, що ортолог *MiaE* все ще функціональний у штамі  $\Delta miaB/1636::hyg$ .

Тобто, продукт *XNR\_1636* не бере участі в гідроксилюванні іо<sup>6</sup>A в SAM2, або ж в геномі є ще один ген, який контролює таку реакцію. Не виключено, що цей фермент не виявляє гомології до описаних MiaE-подібних гідроксилаз. Це ускладнює їхній пошук лише на основі біоінформатичних порівнянь.

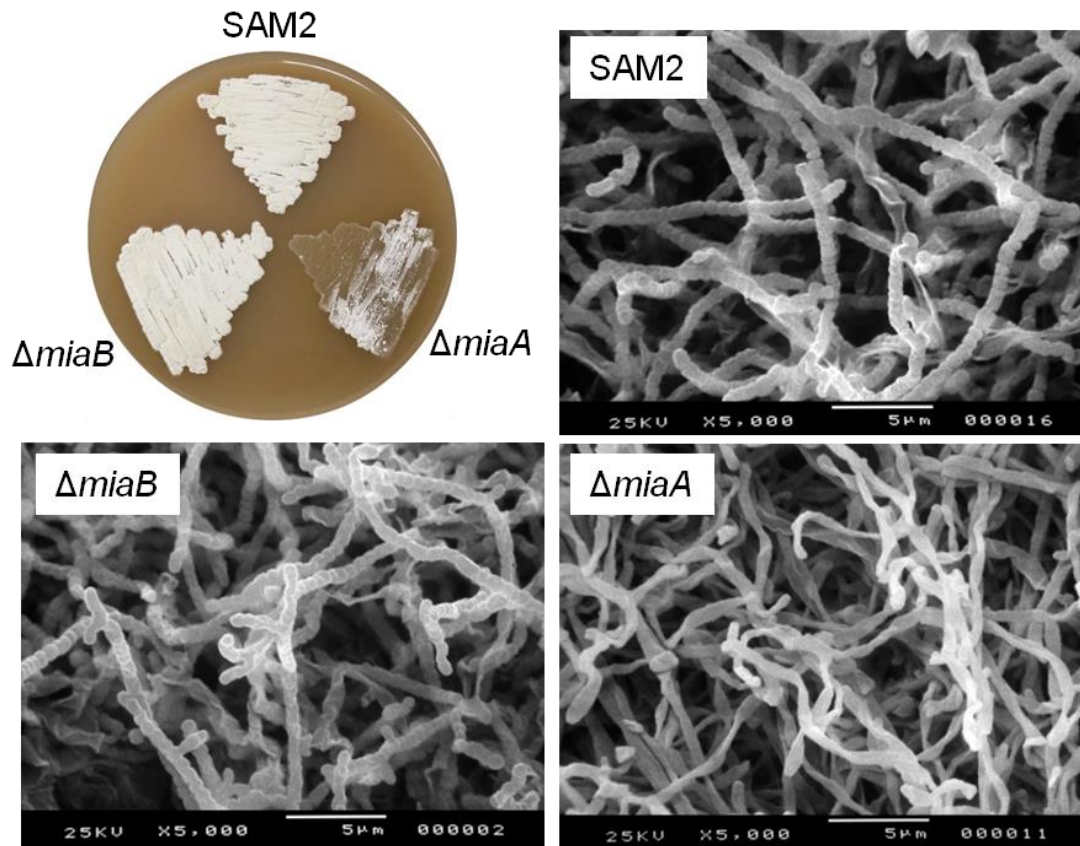
Таким чином, генетичний контроль A37-гідроксилювання тРНК<sub>ХХА</sub> в *S. albus* залишається актуальним питанням.

### 3.3.5. Морфологічний фенотип мутантів *ΔmiaA* та *ΔmiaB*.

Отриманих мутантів за генами посттранскрипційних модифікацій тРНК, *ΔmiaA* та *ΔmiaB*, аналізували за характеристиками росту на твердих середовищах. Виявили, що морфологічно мутант *ΔmiaB* практично не відрізнявся на макро- чи мікроскопічному рівні від SAM2 на багатьох з них.

Чи не єдині відмінності цей штаб виявляв при рості на агаризованих середовищах R5, TSA і ISP3, де протягом перших трьох діб формувал менш щільний газон повітряного міцелію, ніж дикий тип, однак протягом довшого інкубування відмінності зникали. У мутанта *ΔmiaA* виявили порушення морфологічного розвитку при рості на більшості твердих середовищ, як-от SFM, ISP3, TSA, SG1, SG1, SMMS та MM. Порушення полягали в затримці розвитку білого повітряного міцелію та формуванні спор, в середньому, на 24-36 год від таких у SAM2 (рис. 3.22). Втім, морфогенез *ΔmiaA* не заблоковано повністю і при тривалому інкубуванні (4-5 діб) мутантний штаб формувал спори на SFM і ISP3.

При рості в рідкому середовищі TSB мутант *ΔmiaA* проявив відмінності в темпах накопичення сухої біомаси. Зокрема, пік такого накопичення для *ΔmiaA* припадав приблизно на 72 год інкубування, тоді як для дикого типу – на 48 год. Що ж до мутанта *ΔmiaB*, крива накопичення

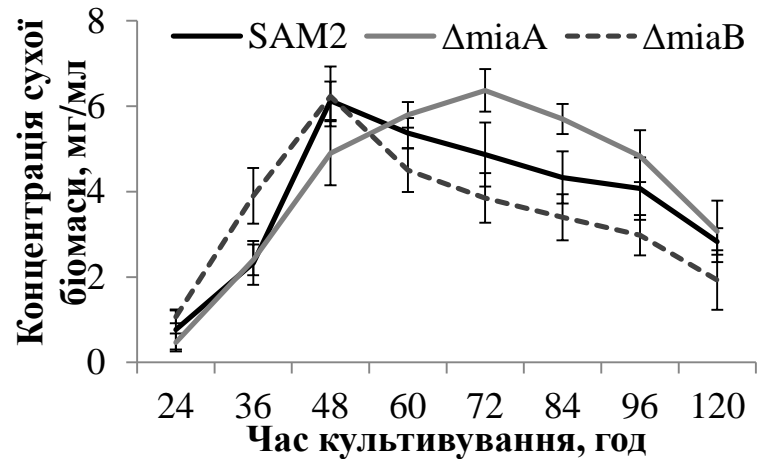


**Рис. 3.22.** Морфологічний фенотип штамів  $\Delta miaA$  та  $\Delta miaB$  при рості на SFM. Інкубували 2 доби при 30°C. Ті ж газони використали для скануючої електронної мікроскопії (у випадку  $\Delta miaA$  продемонстровано зображення фрагменту білого газону на стадії розвитку повітряних гіфів).

його біомаси загалом підпадала під тенденцію такої для SAM2 (планки похибок перекривалися для  $\Delta miaB$  та SAM2) (рис. 3.23).

Важливо зазначити, що фенотипові відмінності росту штаму  $\Delta miaA$  нівелювалися (частково чи повністю) при внесенні копії гена *XNR\_1074* в складі інтегративної плазмиди pTES1074. Комплементований штам  $\Delta miaA+1074$  не відрізнявся при рості на твердих чи в рідкому середовищі TSB від контрольного SAM2 pTES.

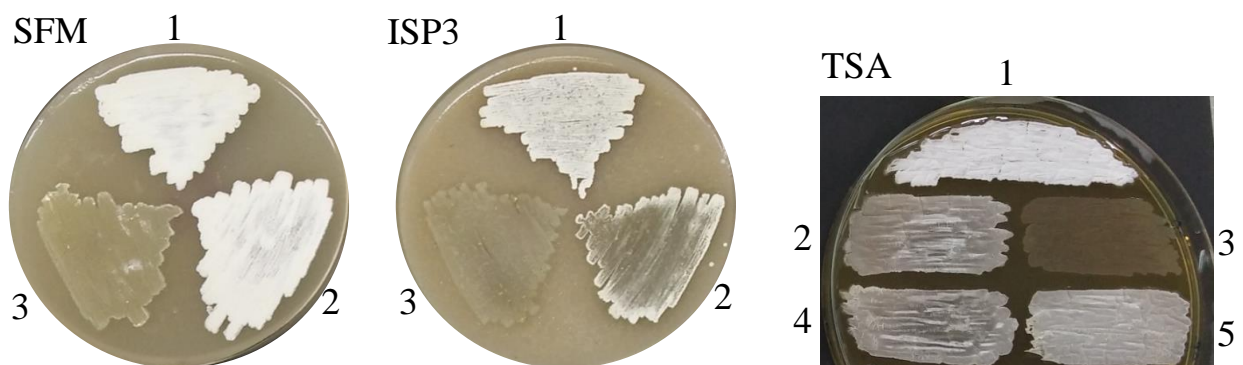
Незначні відмінності росту штаму  $\Delta miaB$  не відновлювались при комплементції геном *XNR\_1078* (з pTES1078) (рис. 3.24). Можливо, ці особливості є індивідуальними і не пов'язані з нокаутом гена *miaB*.



**Рис. 3.23.** Криві накопичення сухої біомаси штамів SAM2,  $\Delta miaA$  та  $\Delta miaB$ . Культуру вирощували в рідкому середовищі TSB при 30°C; для засіву використовували приблизно однакові кількості спор. Відображено результат 3 повторів; планки похибок позначають стандартні відхилення.

### 3.3.6. Вплив стресових умов на фенотип штамів $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$ .

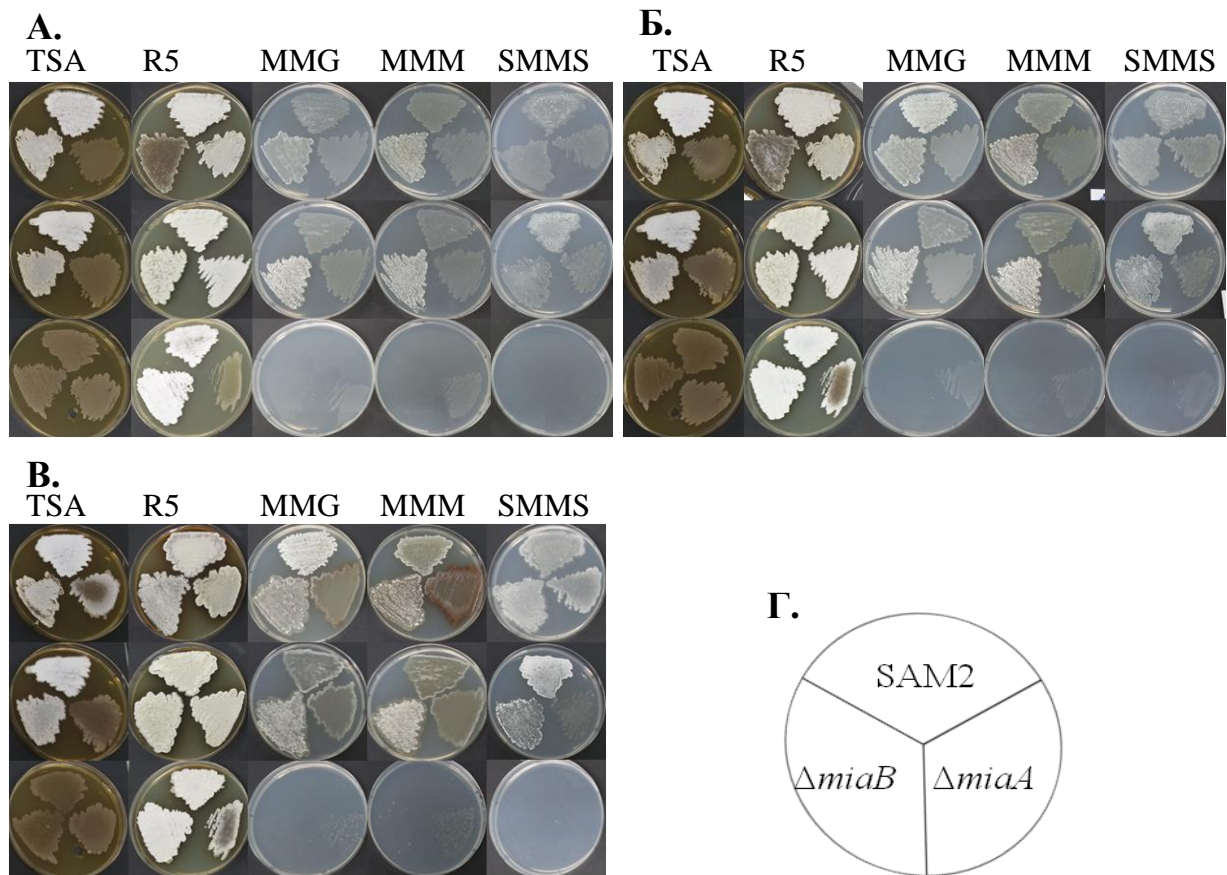
Досліджували вплив кількох стресових чинників на ріст мутантів. Першим із таких чинників був вплив підвищеної температури. Для проведення дослідження спостерігали ріст мутантних штамів на низці твердих середовищ (SFM, ISP3, TSA, SG1, SG2, R5, MMG, MMM, SMMS, ISP5) за дії різних температур



**Рис. 3.24.** Ріст штамів на твердих середовищах (2 доби, 30°C). 1. SAM2 pTES; 2.  $\Delta miaA+1074$ ; 3.  $\Delta miaA$  pTES; 4.  $\Delta miaB+1078$ ; 5.  $\Delta miaB$  pTES.



(30°C, 37°C, 42°C) протягом 6 діб. Штами висівали зі спорових суспензій (приблизно  $10^5$  спор на газон). Результати представлені на рис. 3.25. Загалом, спостерігали погіршення (майже до повної відсутності) росту трьох штамів



**Рис. 3.25.** Ріст штамів SAM2,  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$  на перелічених твердих середовищах протягом двох (А), трьох (Б) та шести діб (В) за впливу 30°C (кожний верхній ряд), 37°C (кожний середній ряд) та 42°C (кожний нижній ряд). Штами засіяно з однакової кількості спор на газон, як зображено на Г.

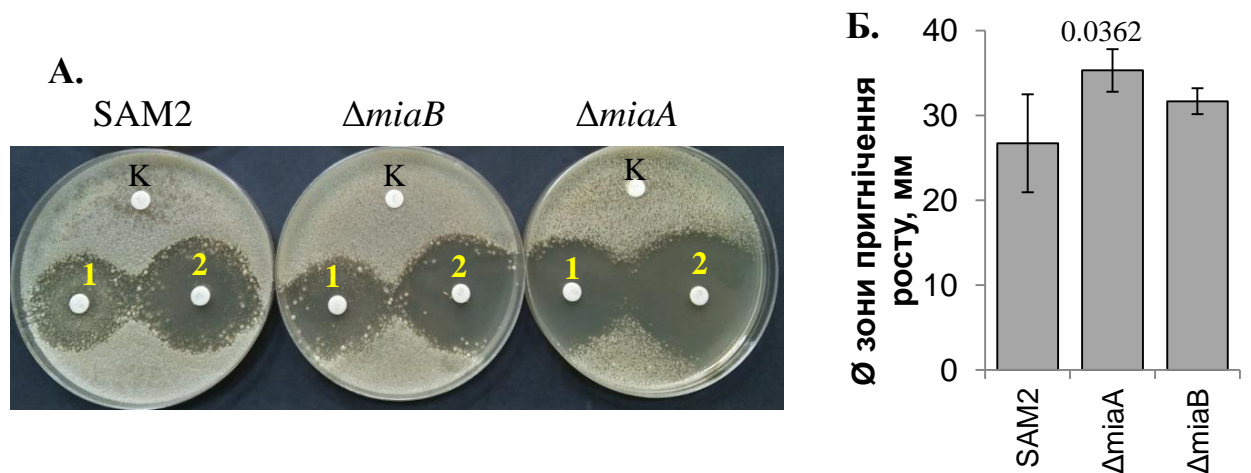
стрептоміцетів при 42°C на бідних середовищах. У випадку мутанта  $\Delta miaB$ , спостерігали вже згадані відмінності морфології газонів на середовищах TSA та R5 на перші доби росту при 30°C. При підвищених температурах ці відмінності зникали. Також виявили, що на пізніх стадіях росту на мінімальному середовищі з манітолом (і до меншої міри – з глюкозою) мутанти продукували забарвлені метаболіти, нехарактерні для SAM2.

Імовірно, цим кольоровим сполукам відповідають каротиноїди, синтез яких “вмикається” за умов стресу (Myronovskyi et al. 2014).

Штам  $\Delta miaA$  при рості на середовищах R5 (42°C) та SMMS (37°C) проявляв певну температурну чутливість та затримку росту, що, зокрема, не було настільки характерним для нормальної фізіологічної температури 30°C.

Іншим стресовим чинником виступав оксидативний стрес. Для цього досліджували стійкість мутантних штамів до дії пероксиду водню. Тест проводили, як описано в Методах. Виявили, що штам  $\Delta miaA$  за досліджуваних умов проявляв вищу чутливість до 10 і 20 мкмоль пероксиду водню, ніж SAM2 (рис. 3.26). Окрім цього, цікавою особливістю цього штаму є те, що гало пригнічення росту  $\Delta miaA$  навколо дисків з перекисом водню було практично стерильним, тоді як для  $\Delta miaB$  та SAM2 – заповнені численними колоніями.

Окрім цього, визначали стійкість штамів SAM2,  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$  до різних антибіотиків. Тест проводили, як описано в методах. Виявили, що за



**Рис. 3.26.** Пригнічення росту стрептоміцетів за впливу пероксиду водню. **А.** Пригнічення росту за дії 10 (1) та 20 (2) мкмоль  $H_2O_2$ ; К – контроль, дистильована вода. **Б.** Діаметри зон пригнічення росту за дії 10 мкмоль  $H_2O_2$ . Планки похибок відображають стандартні відхилення. Значення  $p$  подано за умови  $\leq 0.05$ .

досліджуваних умов суттєвої різниці між стійкістю мутантів  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$  та штаму дикого типу до використаних антибіотиків немає. Результати представлені в таблиці 3.4.

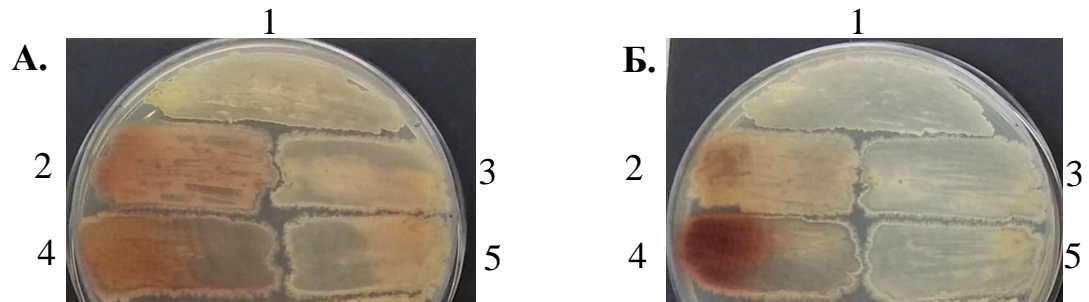
Таблиця 3.4.

**Стійкість штамів стрептоміцетів до різних антибіотиків**

Антибіотик	Клас	Концентрація, мкг на диск	Діаметр зони пригнічення росту, мм *		
			SAM2	$\Delta miaA$	$\Delta miaB$
1	2	3	4	5	6
Казугаміцин	Аміноглікозиди	30	13±0	16±1,4	14±0
Гентаміцин	-//-	10	26,5±5,8	25±4,7	25,5±5,8
Канаміцин	-//-	30	23,8±1,3	24±1,4	22,3±1,7
Стрептоміцин	-//-	30	19,8±2	19,8±1,7	20,3±2
Мономіцин	-//-	30	23±0,82	27,8±3,2	25,5±2,4
Рифампіцин	Анзаміцини	5	15±4,2	10,5±0,7	11±2,8
Цефалексин	Цефалоспорини	30	-	-	-
Левоміцетин	Хлорамфеніколи	30	21±1,4	24±5,7	20,5±0,7
Лінкоміцин	Лінкозаміди	15	27,5±2,1	25,5±0,7	28,5,0,7
Еритроміцин	Макроліди	15	21±3,6	20,8±2,8	19,3±1
Пеніцилін	Пеніциліни	10	-	-	-
Ампіцилін	-//-	10	-	-	-
Карбеніцилін	-//-	10	-	-	-
Оксацилін	-//-	10	-	-	-
Амоксицилін	-//-	10	-	-	-
Поліміксин А	Поліпептиди	300 од.	-	-	-
Тетрациклін	Тетрацикліни	30	9±0,82	11,8±5,2	8,5±1,3

\*вказані середні значення та стандартні відхилення

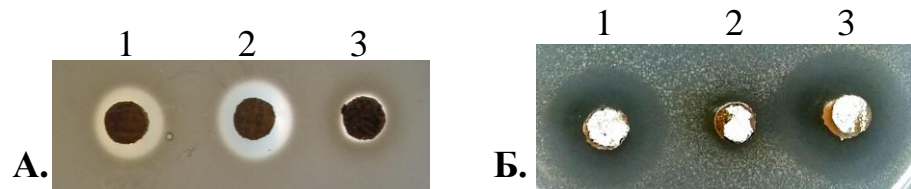
**3.3.7. Вторинний метаболізм штамів  $\Delta miaA$  та  $\Delta miaB$ .** Вторинний метаболізм досліджуваних штамів характеризували за їхньою здатністю продукувати власні та гетерологічні сполуки. Як вже згадувалось, при рості на агаризованому ММ з манітолом мутанти продукують червоно-оранжеві метаболіти, що, можливо, є речовинами каротиноїдної природи (Myronovsky et al. 2014). Особливо виражено це для штаму  $\Delta miaB$ . При заміні манітолу на глюкозу, така продукція не є настільки активною. Комплементовані штами  $\Delta miaB+1078$  та  $\Delta miaA+1074$  при рості на ММ проявляють фенотип дикого типу (рис. 3.27).



**Рис. 3.27.** Продукція забарвлених речовин штамами SAM2 pTES (1),  $\Delta miaA$  pTES (2),  $\Delta miaA+1074$  (3),  $\Delta miaB$  pTES (4) та  $\Delta miaB+1078$  (5) на агаризованому середовищі ММ з додаванням глюкози (А) чи манітолу (Б) як джерел карбону. Інкубували 5 діб при 30°C, вигляд знизу.

Нокаут генів *XNR\_1074* та *XNR\_1078* змінює і продукцію власних антибіотиків. Наприклад, у випадку штаму  $\Delta miaA$ , знижується активність проти *B. cereus* (при вирощуванні стрептоміцетів на середовищі R5), однак активізується синтез протигрибкових сполук (при використанні середовища SG2) (рис. 3.28). Для штаму  $\Delta miaB$  це теж характерно, однак в меншій мірі.

Зважаючи на специфіку продукції власних метаболітів штамом SAM2 в середовищі SG2 (рис. 3.2), можна припустити, що для мутантів зростає

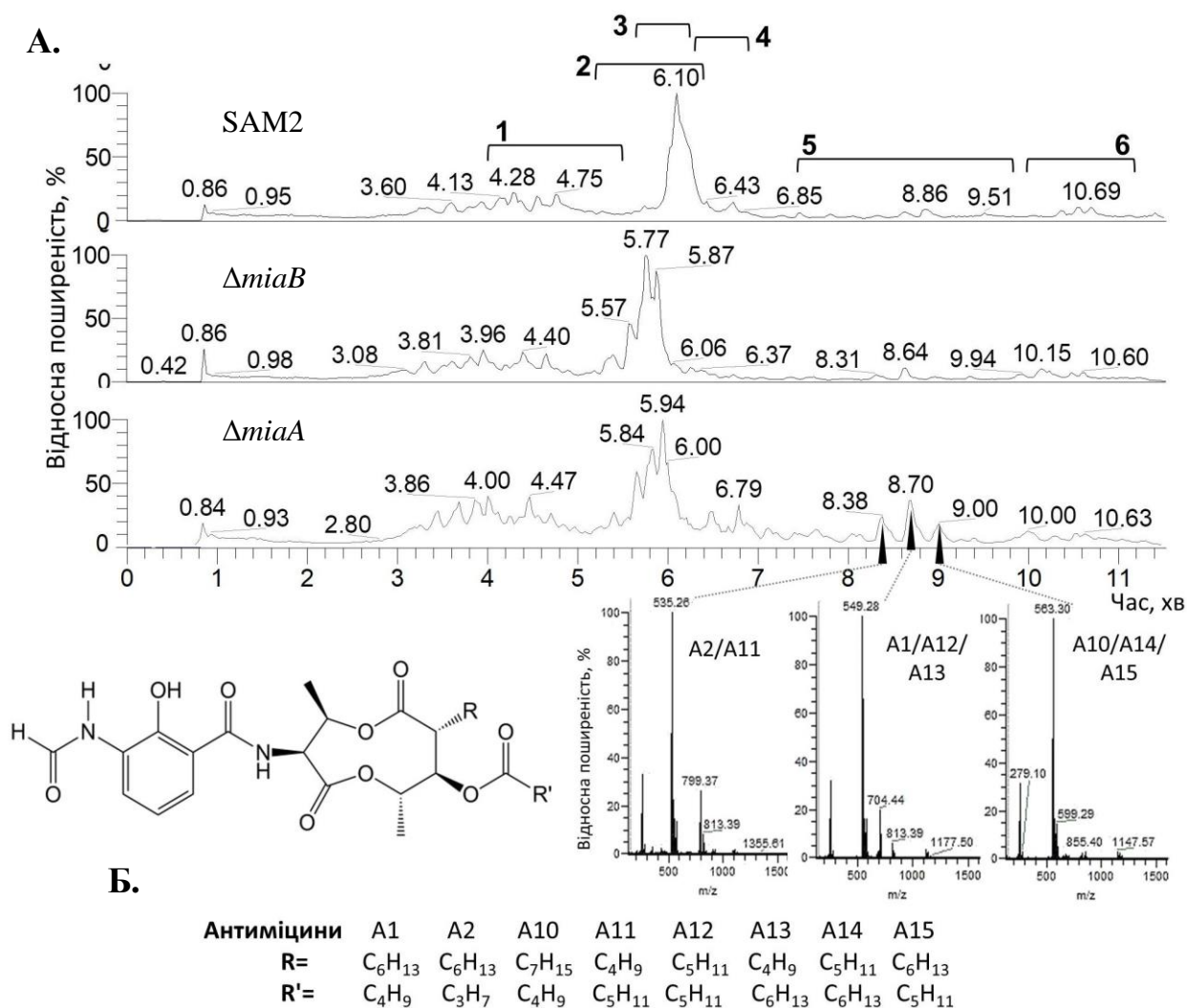


**Рис. 3.28.** Антибіотична активність штамів  $\Delta miaB$  (1),  $\Delta miaA$  (2) та SAM2 проти *C. famata* (А) та *B. cereus* (Б). Штами стрептоміцетів вирощували на агаризованих середовищах SG2 (А) чи R5 (Б) (5 діб, 30°C) перед вирізанням агарових блочків та виконанням біотесту.

продукція кандидинів чи антиміцинів, що проявляють активність проти евкаріотичних мікроорганізмів. Для підтвердження цього припущення, виконали ВЕРХ-МС аналізи екстрактів, отриманих із біомаси та супернатанту мутантних штамів  $\Delta miaB$  і  $\Delta miaA$ , вирощених в середовищі SG2 протягом 5 діб при 30°C. На рис. 3.29, А подано хроматограми ВЕРХ бутанольних екстрактів, отриманих із супернатанту штамів *S. albus*, вирощених в середовищі SG2. Аналізуючи розподіл  $m/z$  сполук, що формують найбільш виражені піки, вдалося ідентифікувати кілька класів вторинних метаболітів, що продукує SAM2. Усі ці класи характерні і для  $\Delta miaB$  та  $\Delta miaA$ . Однак, основною відмінністю для штаму  $\Delta miaA$  стали більш інтенсивні піки на 8-9 хв виходу. За розподілом мас іонів, ідентифікованими мажорними сполуками були антиміцини (A2/A11 (8.38 хв), A1/A12/A13 (8.70 хв) та A10/A14/A15 (9.00 хв)). Зважаючи, що антиміцини активні проти евкаріотичних організмів, підвищенням рівня їх продукції можна пояснити вищу активність штаму  $\Delta miaA$  проти *C. famata*. Мас-піки шуругамідів ( $m/z$  912.61, 928.48, 464.74 [ $2H^+$ ]) та кандидинів ( $m/z$  1093.58, 1109.58, 555.29 [ $2H^+$ ]) в  $\Delta miaA$  нижчі, ніж у SAM2 (рис. 3.30).

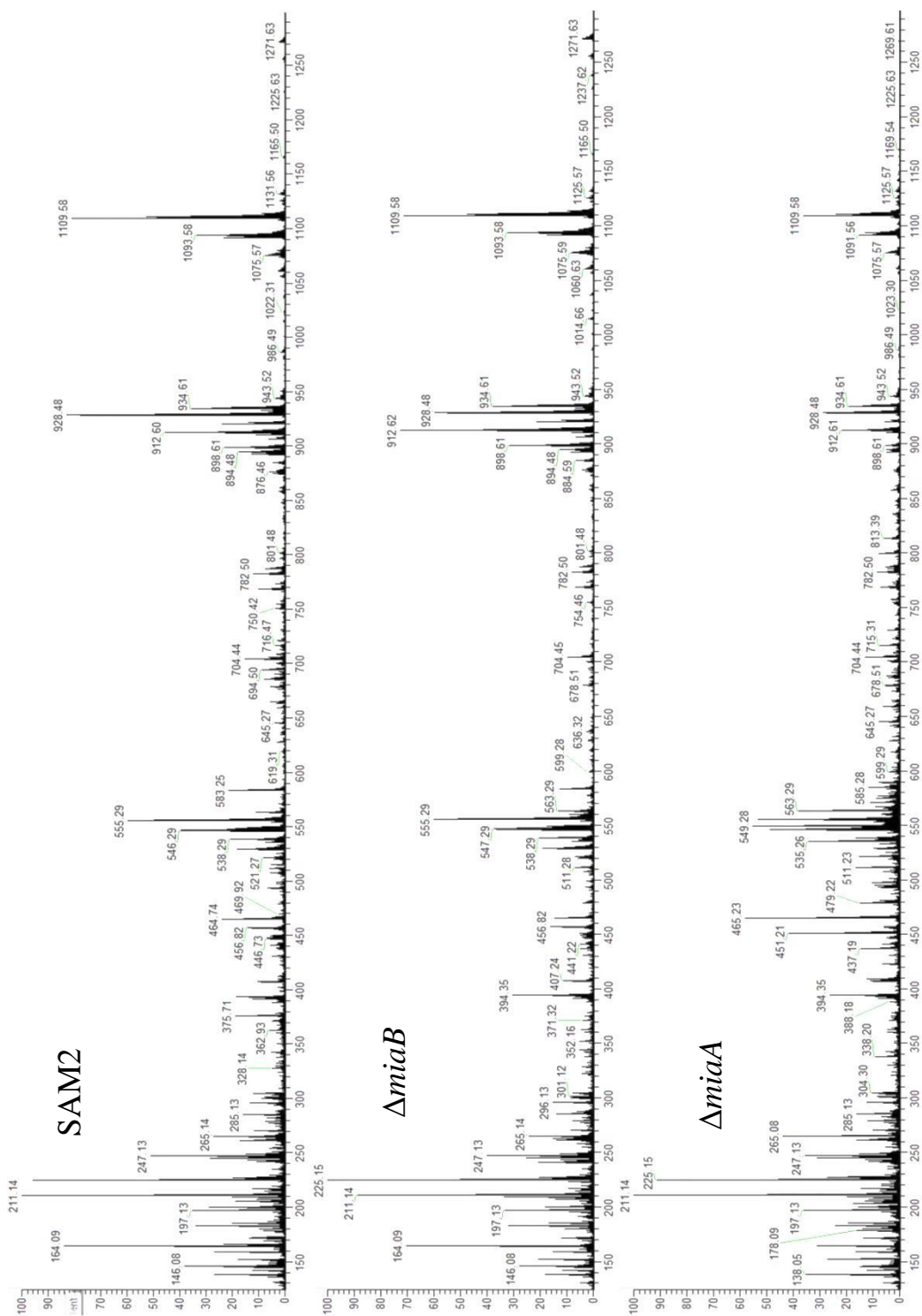
Для дослідження експресії гетерологічних КГБ моеноміцину та аранціаміцину штамми  $\Delta miaB$  та  $\Delta miaA$ , косміди pOJ436ara (Luzhetsky et al. 2007) та moeno38-6 (Ostash et al. 2013) перенесено в мутантні штамми. Транскон'югантів відбирали за стійкістю до відповідних антибіотиків.





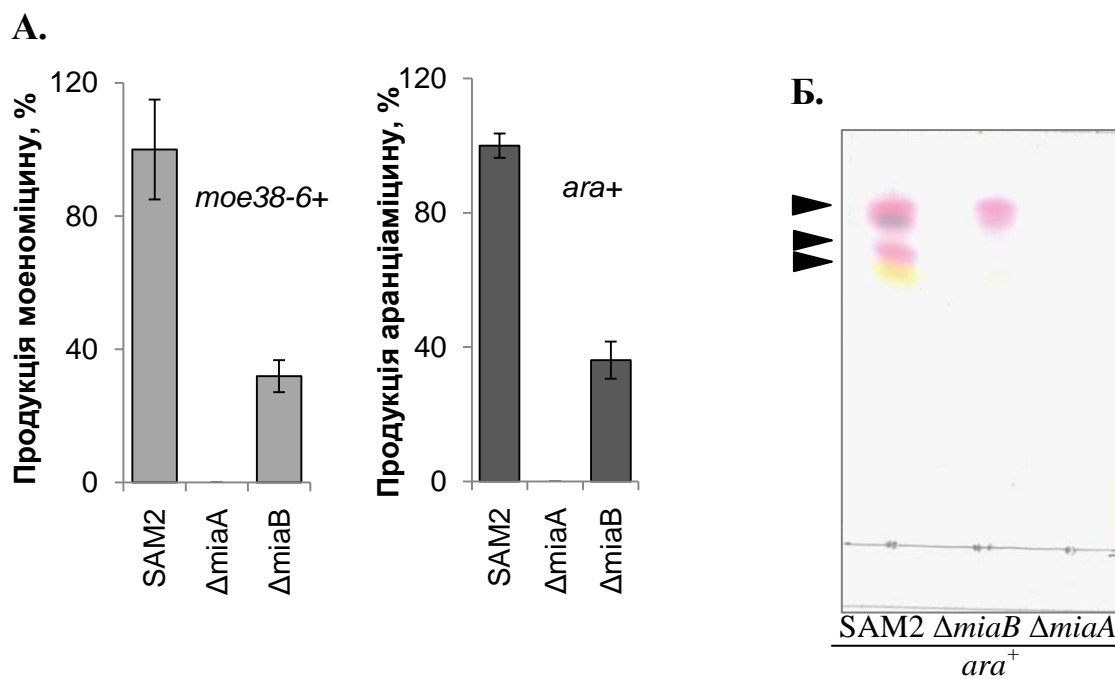
**Рис. 3.29.** А. Результати ВЕРХ-МС екстрактів SAM2,  $\Delta miaB$  і  $\Delta miaA$ . Вісь абсцис – час виходу сполук, хв; вісь ординат – відносна поширеність піків, %. 100% відповідає абсолютному значенню абсорбції максимального піку серед представлених (в AU). Зазначено час виходу сполук: 1) бутеноліди, 2) кандицидини, 3) шуругаміди, 4) пауломеноли, 5) антиміцини, 6) пауломіцини. Чорні трикутники позначають більш виражені піки сполук для  $\Delta miaA$ , порівняно з SAM2, значення  $m/z$  яких відповідають антиміцинам A2/A11 (8.38 хв), A1/A12/A13 (8.70 хв) та A10/A14/A15 (9.00 хв). Дані отримано в позитивному режимі іонізації **Б**. Хімічні формули згаданих антиміцинів.

Продукцію моюноміцину *моено38-б*<sup>+</sup> та аранціаміцину *ара*<sup>+</sup> штамми



**Рис. 3.30.** Розподіл мас-пиків сполук екстрактів (відповідні хроматограми ВЕРХ представлені на рис. 3.29, А) штамів SAM2,  $\Delta miaB$  і  $\Delta miaA$ . Вісь абсцис – значення m/z, вісь ординат – відносна поширеність піків, %. За 100% прийнято абсолютне значення абсорбції максимального піку серед представлених (в AU). Подано режим позитивної іонізації. Час виходу сполук – 0.01-11.27 хв.

характеризували, як описано в Методах. Виявили, що в  $\Delta miaB$  продукція обидвох антибіотиків суттєво знижувалась, а для  $\Delta miaA$  була практично відсутньою (рис. 3.31).



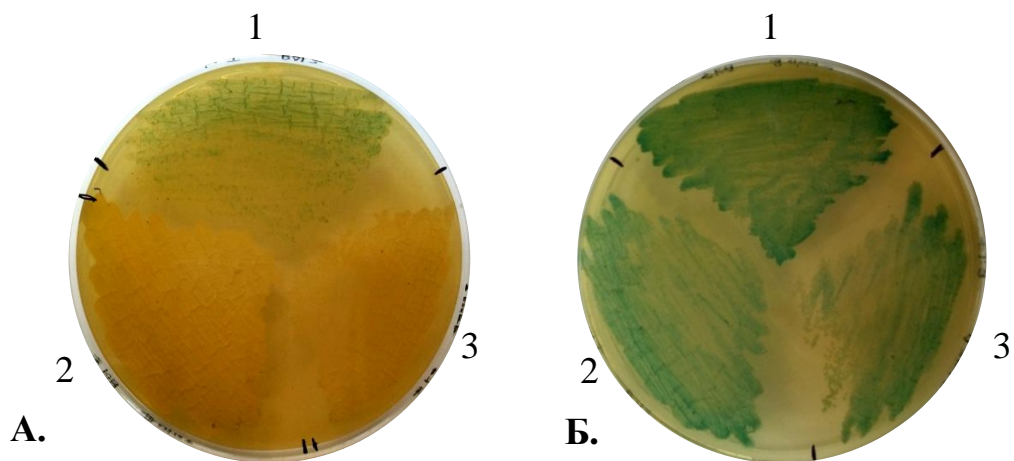
**Рис. 3.31.** А. Продукція моеноміцину та аранціаміцину штамами стрептоміцетів. 100% відповідають рівням продукції дикого типу (SAM2). Це приблизно 0,5 мг нозокоміцину А на 1 л культури штаму SAM2 *моено38-6<sup>+</sup>* та така продуктивність аранціаміцину, що відповідає індексу продуктивності 1,8 для SAM2 *ара<sup>+</sup>*, відповідно. Продукція антибіотиків нормалізована відносно однакової кількості сухої біомаси. Планки похибок позначають значення стандартних відхилень. Б. ТШХ етилацетатних екстрактів (розчинених у метанолі та нормалізованих відносно біомаси), отриманих із *ара<sup>+</sup>*-штамів, що використовували і для характеристики продукції. Трикутниками позначено комплекс аранціаміцинів, що продукує SAM2 *ара<sup>+</sup>*.

**3.3.8. Експресія ТТА-вмісних репортерних генів штамами  $\Delta miaA$  та  $\Delta miaB$ .** Ми відзначили, що практично повна відсутність продукції штамом  $\Delta miaA$  певного антибіотика корелює з присутністю у його КГБ генів,



що містять ТТА-кодони. Отже, справедливо припустити, що згаданий мутант не здатний ефективно експресувати ТТА-вмісні гени (а саме – декодувати кодони UUA у їхніх мРНК). Для перевірки використано кілька вищезгаданих ТТА<sup>+</sup>-репортерних систем, а саме конструкт pRV3 (Koshla et al. 2017), а також плазміди, що містять транскрипційне чи трансляційне злиття *adpA-gusA* (Makitrynskyu et al. 2013).

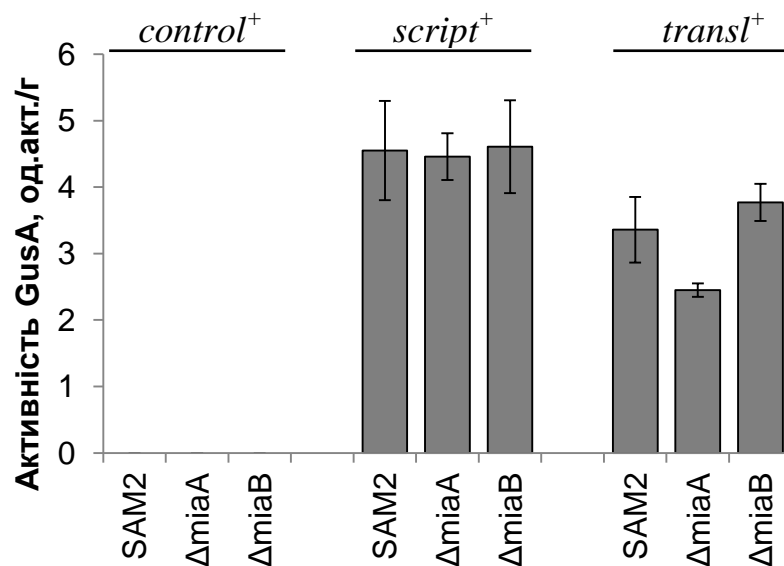
Плазміду pRV3 перенесли в штами  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$ , транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину. RV3<sup>+</sup> штами вирощували на середовищі TSA з додаванням X-gal (30 мМ) в умовах без індуктора кумату та при його оптимальній концентрації (50 мМ). Виявили, що без індуктора за умов базальної транскрипції ТТА-вмісного *SCO3479*, штам SAM2 RV3 виявляє слабку, а  $\Delta miaA$  RV3 та  $\Delta miaB$  RV3 – практично відсутню  $\beta$ -глюкозидазну активність. Тим не менше, за присутності оптимальної концентрації індуктора кумату  $\beta$ -глюкозидазну активність проявляють усі штами (рис. 3.32).



**Рис. 3.32.** Експресія ТТА-вмісного репортера *lacZ* у штамів SAM2 RV3 (1),  $\Delta miaB$  RV3 (2) та  $\Delta miaA$  RV3 (3) на чашках TSA+X-gal (30 мМ) без (А) та з (Б) індуктором куматом (50 мМ). Чашки інкубували 60 год при 30°C, вигляд знизу.

Плазміди *padpAscript*, *padpAtransl*, *padpAcontrol* теж індивідуально перенесли в мутантні штами, транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину. Вимірювали рівень  $\beta$ -глюкуронідазної активності в лізатах відповідних штамів, отриманих із 48-годинних рідких культур TSB (Myronovskyi et al. 2011; Makitrynskyu et al. 2013). Виявили, що рівень активності промотора *adpA<sub>p</sub>* приблизно однаковий як для мутантних штамів, так і для дикого типу. Однак, трансляційне злиття *adpA-gusA* в штамі  $\Delta miaA$  експресується нижче, ніж в штаммах  $\Delta miaB$  чи SAM2 (рис. 3.33).

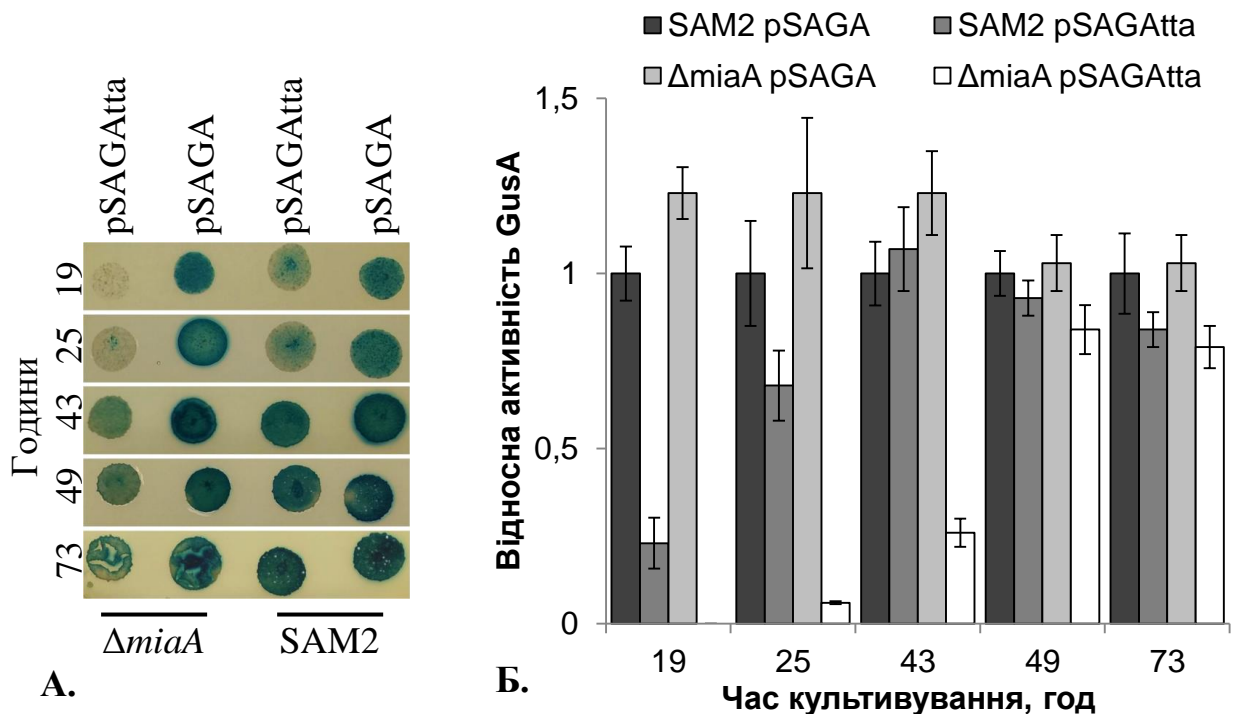
Отримані результати можуть свідчити про ускладнену трансляцію кодону UUA у штамі  $\Delta miaA$ , оскільки, скоріше всього, тРНК<sup>Leu</sup><sub>UUA</sub> потребує модифікації  $ms^2$ :іо<sup>6</sup>A37 для нормального функціонування.



**Рис. 3.33.**  $\beta$ -глюкуронідазна (GusA) активність штамів SAM2,  $\Delta miaB$  та  $\Delta miaA$ , що несуть конструкти *padpAcontrol* (*control*<sup>+</sup>), *padpAscript* (*script*<sup>+</sup>) та *padpAtransl* (*transl*<sup>+</sup>). Вказані середні значення трьох повторів та стандартні відхилення.

Для підтвердження цього припущення використали ще одну кодон-специфічну репортерну систему, що складається із плазмід pSAGA (на основі інтегративного вектора pSET152 із клонованим геном *gusA* під контролем

промотора *aac(3)IV<sub>p</sub>*) та pSAGAtta (другий кодон CTC гена *gusA* замінений на TTA). Плазмиди індивідуально перенесені в штами SAM2 і  $\Delta miaA$ . Транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину.  $\beta$ -глюкуронідазну активність в отриманих штаммах характеризували якісно (нанесенням однакової кількості розчину X-glus на поверхню газонів стрептоміцетів на різні години росту) та кількісно (вимірюванням активності GusA в лізатах рідких культур (Myronovskyi et al. 2011; Makitrynskyu et al. 2013)). Результати представлені на рис. 3.34. Важливо зазначити, що на рис. 3.34.Б представлена



**Рис. 3.34.**  $\beta$ -глюкуронідазна активність штамів SAM2 pSAGA, SAM2 pSAGAtta,  $\Delta miaA$  pSAGA і  $\Delta miaA$  pSAGAtta. **А.** Однакову кількість спор штамів нанесено на агаризоване середовище TSB, інкубовано вказану кількість годин при 30°C, нанесено розчин X-glus. Синє забарвлення свідчить про  $\beta$ -глюкуронідазну активність. **Б.** Обчислена відносна GusA-активність лізатів штамів стрептоміцетів, отриманих із рідких культур TSB, відібраних на вказані години росту. Як 1 для кожної години прийнято абсолютне значення (в од.акт/г) для лізату штаму SAM2 pSAGA. Вказані середні значення трьох повторів та стандартні відхилення.

відносна активність  $\beta$ -глюкуронідази (як 1 для кожної представленої години взято абсолютну  $\beta$ -глюкуронідазну активність лізату штаму SAM2 pSAGA, в од. акт на 1 г сухої біомаси культури).

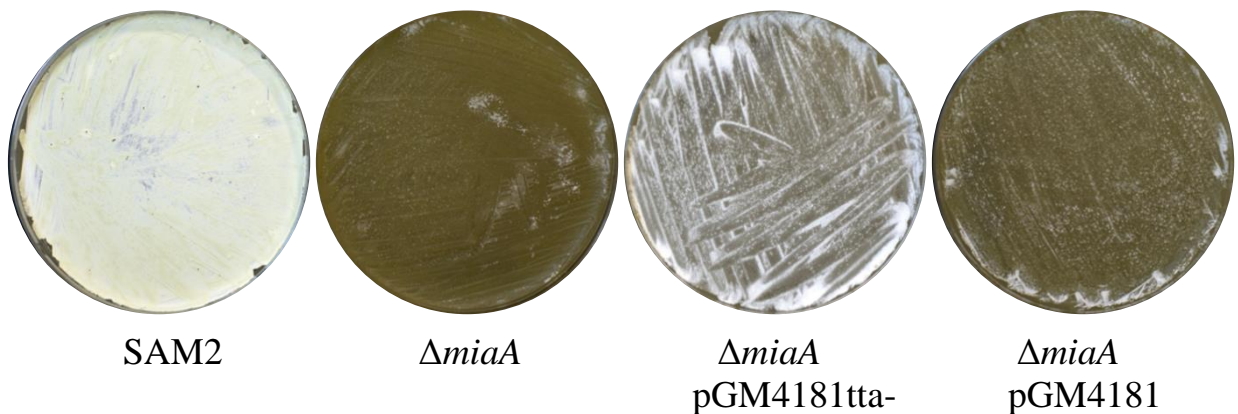
Як бачимо, ТТА-вмісна версія гена *gusA* в штамі дикого типу експресується гірше, особливо на ранніх годинах росту. Однак, починаючи з другої доби росту, для SAM2 експресія ТТА<sup>+</sup>-версії репортерного гена майже вирівнюється з експресією ТТА<sup>-</sup> *gusA*. Можливо, на ранніх стадіях росту тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> не є повністю функціональною або ж її концентрація низька.

Тим не менше, штам  $\Delta miaA$  практично не експресує (або експресує слабо) ТТА-вмісну версію гена *gusA* на перші дві доби росту. Тоді як експресія ТТА<sup>-</sup> *gusA* є на досить високому рівні вже починаючи з 19 години. Такі результати свідчать про ускладнену трансляцію UUA-вмісних транскриптів штамом  $\Delta miaA$ . Швидше всього, причиною є низька ефективність (проте не повна втрата функціональності) прочитування кодону UUA тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, у якої відсутня модифікація ms<sup>2</sup>:io<sup>6</sup>A37.

**3.3.9. Роль кодону ТТА та тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> у виявленні морфотипу мутанта  $\Delta miaA$ .** Зважаючи на кореляцію між затримкою формування повітряного міцелію та ускладненою експресією ТТА-вмісних конструктів штамом  $\Delta miaA$  на перших добах росту, вирішено дослідити, чи повністю залежить морфотип  $\Delta miaA$  від модифікації ms<sup>2</sup>:io<sup>6</sup>A37 тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>.

Одним із експериментів для такої перевірки стала комплементация морфотипу  $\Delta miaA$  геном *adpA S. albus*, що не містив ТТА кодону. Для цього використали дві уже сконструйовані плазміди, pGM4181 (конструювання описане в (Yushchuk et al. 2018), містила ген *XNR\_4181 (adpA S. albus)* під контролем промотора *moeE5<sub>p</sub>*) і pGM4181tta- (містила синтетичний ген *XNR\_4181*, ТТА-кодон в складі якого замінений на СТС). Обидва конструкти перенесено в штам  $\Delta miaA$ , транскон'югантів відбирали за стійкістю до апраміцину.

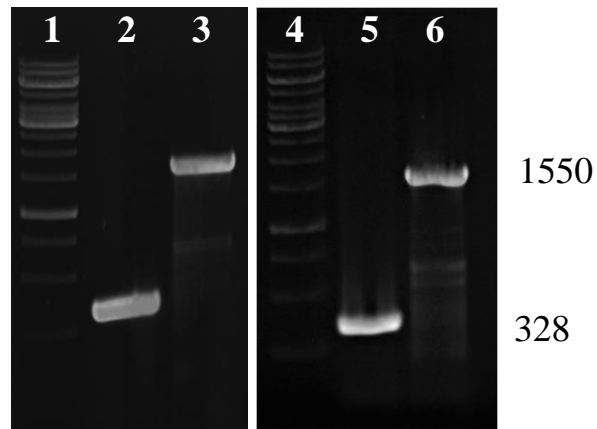
Виявили, що експресія ТТА<sup>-</sup> *adpA* частково комплементує морфотип  $\Delta miaA$ , однак не відновлює його до рівня SAM2 (рис. 3.35). Таке явище можна пояснити тим, що *adpA* – не єдиний ТТА-вмісний ген, задіяний в морфологічному розвитку культури (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011; Naskl and Bechthold 2015). Також, трансляція необхідних для нормального розвитку білків залежить і від інших тРНК<sub>XXA</sub>, що підлягають Міа-залежній модифікації. Отже, дефектний морфотип  $\Delta miaA$  зумовлено пошкодженою/сповільненою трансляцією низки кодонів, що декодуються родиною тРНК<sub>XXA</sub>. До цієї родини тРНК належить й тРНК<sub>UAA</sub>, і наші результати вказують, що *miaA*-мінус мутація частково блокує трансляцією кодонів UUA, особливо за умов, коли кількість UUA-вмісного транскрипту або гіпомодифікованої тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> – низька (напр., лаг-фаза росту культури).



**Рис. 3.35.** Комплементация фенотипу штаму  $\Delta miaA$  ТТА<sup>-</sup> -версією гена *adpA* в складі pGM4181tta-. Конструкт pGM4181 несе нативну версію *adpA*. Газони вирощували 45 год на SFM.

Ще одним цікавим експериментом стало дослідження фенотипів подвійних мутантів з делеціями генів *miaA* і *bldA*, *miaB* і *bldA*. Якщо морфотип  $\Delta miaA$  повністю залежить від прочитання UUA кодону тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>, то, при нокауті гена *bldA* в штамі  $\Delta miaA$ , мав би виявлятися фенотип мутанта  $\Delta bldA$ .

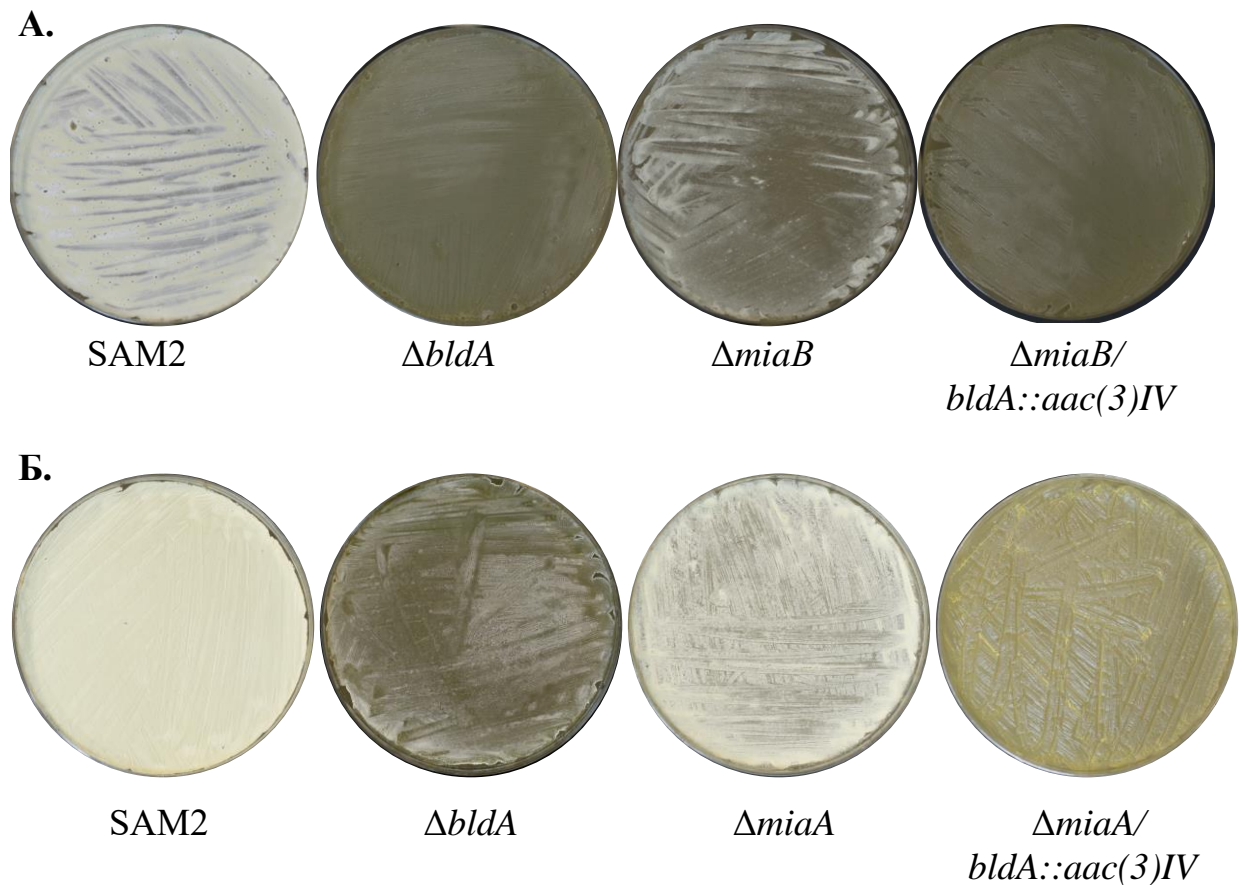
Для генерації подвійних мутантів  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$  та  $\Delta miaB/bldA::aac(3)IV$  використали ту ж стратегію, що і для конструювання штаму  $bldA::aac(3)IV$  (див. пункт 3.2). Мутантів  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$  і  $\Delta miaB/bldA::aac(3)IV$  відбирали за стійкістю до апраміцину та  $GusA^-$  - фенотипом. Факт заміщення гена  $bldA$  на касету стійкості до апраміцину в геномах  $\Delta miaA$  і  $\Delta miaB$  підтверджено за допомогою ПЛР-ампліфікації зі специфічними праймерами SA\_bldA\_XbaI\_up та SA\_bldA\_EcoRI\_gp (рис.3.36).



**Рис. 3.36.** Заміщення гена  $bldA$  на касету стійкості до апраміцину. Електрофореграми ПЛР-ампліфікації з використанням згаданих в тексті праймерів. Лунки: 1,4 – ДНК маркер 1 kb DNA Ladder; 2 – ампліфікація гена  $bldA$  з геному  $\Delta miaB$ ; 3 – заміщення гена  $bldA$  на касету стійкості до апраміцину в геномі  $\Delta miaB/bldA::aac(3)IV$ ; 2 – ампліфікація гена  $bldA$  з геному  $\Delta miaA$ ; 3 – заміщення гена  $bldA$  на касету стійкості до апраміцину в геномі  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$ . Числа вказують розмір отриманих продуктів в п.н.

Спостерігали, що для подвійного мутанта  $\Delta miaB/bldA::aac(3)IV$  при рості на твердих середовищах, властивий фенотип мутанта  $\Delta bldA$  (рис. 3.37, А). Це ще раз доводить відсутність значного вплив нокауту гена  $miaB$  на морфологічний розвиток SAM2. Проте, наявність нокауту двох генів  $miaA$  та

*bldA* в одному штамі приводить до виникнення ще більш виражених дефектів розвитку, ніж нокаут кожного з генів окремо. Як представлено на рис. 3.37, Б, подвійний мутант  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$  практично не здатний до формування повітряного міцелію навіть на п'яту добу росту на твердому середовищі SFM (на TSA і ISP3 теж). Тобто, для штаму  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$  характерний “класичний” *bld*-фенотип, що не спостерігали ні для  $\Delta miaA$ , ні для  $\Delta bldA$ .



**Рис. 3.37.** Морфологічний фенотип штаму SAM2 і мутантів  $\Delta miaA$ ,  $\Delta miaB$ ,  $\Delta bldA$ ,  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$ ,  $\Delta miaB/bldA::aac(3)IV$ . Газони вирощували дві доби на ISP3 (А) чи п'ять діб на SFM (Б) при 30°C.

Результати підтверджують, що морфотип  $\Delta miaA$  не є абсолютно, а лише частково, залежним від ефективного функціонування тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> та експресії UUA-вмісних транскриптів. Очевидно, модифікація і<sup>6</sup>A37 є необхідною для нормального функціонування низки тРНК. Останні, через

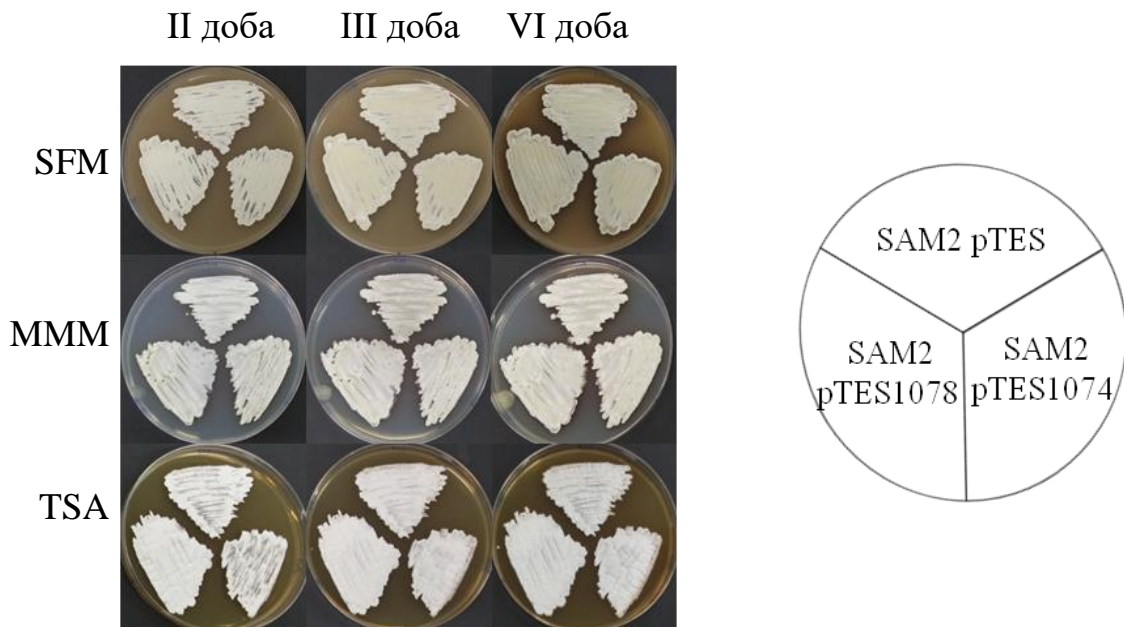


трансляцію відповідних кодонів в складі мРНК, теж вносять свою роль в нормальний розвиток та метаболізм штаму SAM2. В той же час, відсутність *MiaB*-контрольованої модифікації не впливає значним чином на морфологічний розвиток. Принаймні, поза межами можливого опосередкованого впливу через тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>.

### 3.3.10. Внесення додаткової копії генів *miaA* і *miaB* у штаму SAM2.

Для виявлення ефекту внесення додаткової копії вказаних генів, використали ті ж конструкції, що і при комплементации відповідних мутантів, а саме плазмиди pTES1074 і pTES1078. Плазмиди індивідуально перенесено в штаму SAM2. Транскон'югантів відібрано за стійкістю до апраміцину. Як контроль, використано порожній вектор pTES і штаму SAM2 pTES.

Досліджували ріст (рис. 3.38) і антибіотичну активність штамів SAM2 pTES1074 (додатково внесено *miaA*) та SAM2 pTES1078 (додатково внесено



**Рис. 3.38.** Морфологічний фенотип штамів із додатково внесеними копіями генів *miaA* і *miaB* на другу, третю та шосту доби росту на вказаних середовищах при 30°C. Штами засіяно як вказано на схемі.



*miaB*). За досліджуваних умов не виявили видимих фенотипових змін досліджуваних штамів, порівняно із контрольним штамом.

Гени *miaA* та *miaB* кодують білки з ензиматичною активністю. Скоріше всього, рівень їх експресії в дикому типі є оптимальним для перетворення всього необхідного субстрату (в даному випадку, пулу тРНК, що підлягають Міа-модифікаціям), тому подальша надекспресія не є ефективною. Лімітуючим фактором виступає концентрація субстрату, а саме тРНК, що і при внесенні додаткових копій генів *miaA* та *miaB*, залишається на рівні такої в дикому типі.

Результати підрозділу опубліковані в наступних тезах доповідей на конференціях: (Koshla et al. 2017; Sehin, Koshla, and Ostash 2018; Koshla, Sehin, and Ostash 2018; Koshla et al. 2018; Кравець, Кошла, та Осташ 2018; Кравець, Осташ, та Кошла 2019).

Отже, вперше для стрептоміцетів сконструйовано нокаутні штами за генами, що кодують білки посттранскрипційної модифікації нуклеозидів тРНК, а саме МіаА та МіаВ. Роль продуктів нокаутних генів доведена експериментально. Окрім цього, описано фенотипи мутантів, в тому числі і синтез ними вторинних метаболітів. Виявлено, що експресія ТТА-вмісних конструктів штамом  $\Delta miaA$  є ускладненою, причиною чого може бути те, що тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> без модифікації ms<sup>2</sup>:io<sup>6</sup>A37 не здатна ефективно декодувати UUA-кодон. Ушкоджена трансляція UUA в *miaA*-мутанті пояснює лише частково його фенотип, оскільки інші кодони, що декодуються тРНК<sub>ХХА</sub>, також важливі для процесів морфогенезу і вторинного метаболізму *Streptomyces*.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Експресія генів є складним і контрольованим процесом у всіх організмів. Значну і виправдану увагу дослідники актиноміцетів приділяють вивченню регуляції транскрипції, як першого етапу реалізації генетичного матеріалу. Тим не менше, трансляція і механізми, що визначають її вибірковість і ефективність, є не менш важливими для нормального метаболізму (Day and Tuite 1998; Csárdi et al. 2015; Guo 2018). Загалом, відомими прикладами мутацій стрептоміцетів, що можуть вести до зміни експресії генів на рівні трансляції, є мутації генів *rpsL* (Shima et al. 1996; Hosaka, Xu, and Ochi 2006; Wang et al. 2009) та *bldA* (Leskiw et al. 1991; Kwak, McCue, and Kendrick 1996; Hackl and Bechthold 2015; Hou et al. 2018). Фенотипові ефекти цих мутацій нашоухують на думку, що, змінюючи властивості основних учасників трансляції (як-от компонентів рибосом чи тРНК), можна значним чином модифікувати метаболізм. Тобто, у перспективі, можна змінювати експресію тих чи інших груп генів, маніпулюючи процесом синтезу білків.

Ця робота є дослідженням механізмів трансляційного рівня експресії генів у стрептоміцетів. Зокрема, вона є першою у вивченні таких життєво важливих процесів, як посттранскрипційні модифікації нуклеозидів тРНК стрептоміцетів, які раніше для цих організмів не досліджувались.

У роботі ми пропонуємо нову експериментальну модель для вивчення згаданих регуляторних механізмів на основі штаму *S. albus* SAM2, похідного від J1074, у якому видалено псевдо-сайт інтеграції бактеріофага PhiC31, *pse* (Bilyk and Luzhetskyu 2014). Згадана властивість важлива, оскільки часто використовують вектори, що інтегруються в сайт бактеріофага PhiC31, зокрема і в цій роботі, а наявність одного визначеного сайту інтеграції дає

зможу контролювати кількість копій вектора на геном. Для штаму SAM2 характерна і низка інших переваг. Зокрема, це природно мінімізований геном, що налічує 6,8 млн.п.н. (один із найменших для стрептоміцетів), відсутність системи рестрикції-модифікації *SalGI*, дисперсний ріст в рідкій культурі та швидкий морфогенез на твердому середовищі, простота генетичних маніпуляцій (Zaburannyi et al. 2014). В той же час, морфологічно штам проходить всі етапи клітинного циклу, характерні для стрептоміцетів, та здатний продукувати антибіотики, хоч і не має яскраво вираженого вторинного метаболізму за лабораторних умов. Саме тому різноманітні штами *S. albus* використовують як ефективну платформу для гетерологічної експресії КГБ вторинного метаболізму актинобактерій (Wendt-Pienkowski et al. 2005; Gullón et al. 2006; Baltz 2010; Makitrynskyu et al. 2010).

Шляхом додаткового внесення чи нокауту генів в SAM2, продукти яких безпосередньо чи опосередковано впливають на трансляцію, та подальшим аналізом мутантів доступними методами, вдалося виявити цікаві ефекти, зокрема і на вторинний метаболізм.

Як вже згадувалось, мутації гена *rpsL*, що приводять до амінокислотних заміщень в рибосомному білку S12, описані для стрептоміцетів, а механізми виникнення спричинених ними фенотипів частково пояснені (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003; Hosaka, Xu, and Ochi 2006). Втім, дію мутацій вивчали переважно на “чистих” мутантах, в геномі яких представлена лише один (мутантний) алель гена *rpsL*. Для цього дослідження ми використали дещо іншу стратегію впливу на метаболізм, що полягала у внесенні додаткової мутантної копії *rpsL* в геном SAM2. Отримані меродиплоїдні штами містили дві різні версії гена (дикого типу і мутантний), а, отже, були здатні експресувати дві форми S12. В клітинах меродиплоїдів потенційно існує гетерогенна популяція рибосом, що само по собі цікаво і привертає увагу дослідників (Calamita et al. 2018; Genuth and Barna 2018; Lilleorg et al. 2018). Наразі невідомо, яким є співвідношення двох популяцій

рибосом, чи змінюється воно в часі та з розвитком культури. Та, що основне, зовсім не описані механізми, які ведуть від формування гетерогенної популяції рибосом до спричинених нею фенотипових проявів. Ще одним цікавим аспектом вивчення меродиплоїдного стану гена *rpsL* у стрептоміцетів є можливість додатково вносити ті алелі гена, які не вдалось отримати в “чистому” вигляді, можливо, через їхню летальність. Зокрема, для SAM2 це алелі *rpsL*<sup>L90K</sup> чи *rpsL*<sup>K88R</sup>, адже для меродиплоїдних штамів можлива негативна дія певних алелів нівелюється наявним алелем дикого типу.

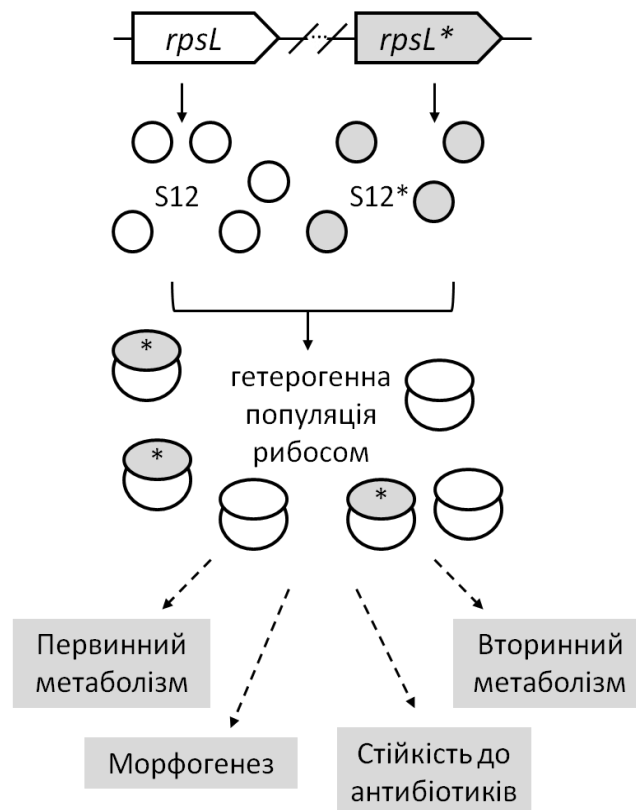
У цій роботі ми використали просту модель на основі штаму SAM2 для початкових досліджень меродиплоїдного стану гена *rpsL* на метаболізм стрептоміцетів. Одним із перших питань, що постало – чи включаються мутантні версії білка S12 в рибосоми меродиплоїдів при наявності білка дикого типу в клітинах? І, хоч прямих доказів цього ми не маємо, однак можна припустити, що певна частка рибосом містить мутантний білок. На користь цього свідчить зміна фенотипів при внесенні різних додаткових алелів *rpsL* у меродиплоїдів. Наприклад, такими фенотипами є морфологія штаму GI92\_ex на твердих середовищах чи різний рівень продукції вторинних метаболітів мутантами. На даному етапі важко судити, які саме механізми викликають згадані зміни. Наприклад те, що аранціаміцин надпродукується у відповідь на внесення певних мутацій, а продукція моеноміцину досліджуваними штамми практично не міняється, може вказувати на зміну експресії регуляторів КГБ аранціаміцину в певних меродиплоїдних штаммах. Або ж, гетерогенні рибосоми впливають на первинний метаболізм попередників аранціаміцину (пул залишків ацил-КоА), тоді як не зачіпають метаболізм попередників моеноміцину (пул вуглеводів та ізопренових залишків).

Зокрема, звернемо увагу на фенотипову нестабільність штаму K88R\_ex *ara*+, що продемонстровано на рис.3.3. Причина виникнення двох

морфотипів колоній цього штаму достеменно невідома. Втім, це може бути проявом різних рівнів експресії мутантного алеля *rpsL*<sup>K88R</sup>, які виявляються в різних фенотипах колоній. Однак, виникнення морфологічного фенотипу є складним процесом. Тому для дослідження співвідношення двох популяцій рибосом ми обрали простішу ознаку, а саме – стійкість до стрептоміцину. Теоретично, якщо в клітинах наявна достатня кількість стрептоміцин-стійких рибосом, такий штам мав би виявляти змінений рівень стійкості до стрептоміцину. І справді, ми спостерігали підвищену частку утворення Sm<sup>R</sup> КУО для спор і рідкої культури штаму K88E\_ex (як відомо, алель *rpsL*<sup>K88E</sup> спричинює виникнення стійкості до стрептоміцину в бактерій (Shima et al. 1996)). Наразі точна причина цього невідома. Можна припустити кілька варіантів подій, що підвищують частку Sm<sup>R</sup> КУО в культурі, а саме: (1) спонтанні геномні мутації, що приводять до Sm<sup>R</sup>; (2) мутації нативного гена *rpsL*, що приводять до втрати функції білка S12, які в дикого типу є летальними, однак колонії виживають за рахунок наявності копії *rpsL*<sup>K88E</sup>; (3) в певній частині колоній K88E\_ex експресія *rpsL*<sup>K88E</sup> і включення мутантного S12 в рибосоми є на достатньо високому рівні для виникнення стійкості до стрептоміцину. Ми вважаємо, що перші два сценарії малоімовірні, враховуючи значне (на два порядки) зростання стійкості саме в культурі меродиплоїда. Це значно перевищує частоту появи спонтанних мутацій. Тому наймовірніше, що зростання стійкості викликано саме включенням мутантного білка S12 у рибосоми. Зростання частки Sm<sup>R</sup> з часом культивування також найпростіше пояснити не через зростання частки спонтанних мутантів, а як наслідок зростання частки рибосом, що містять мутантний білок S12. Останнє явище може бути викликано більшою стабільністю рибосом, що містять мутантний білок (Okamoto-Nosoya et al. 2003). Відтак, коли білковий синтез на пізній фазі росту фактично припиняється і пул рибосом дикого типу скорочується, фракція мутантних рибосом залишається незмінною. В сумі це вестиме до зростання частки

мутантних рибосом.

Отже, ефекти наявності потенційно гетерогенної популяції рибосом за білком S12 в клітинах меродиплоїдних штамів *S. albus* різноманітні та залежать від того, який додатковий алель гена *rpsL* внесено. І, хоч механізми виникнення фенотипів меродиплоїдів потребують подальшого дослідження, вже зараз можна звернути увагу на практичне значення кількох сконструйованих штамів, а саме L90K\_ex та K88E+P91S\_ex, що становлять інтерес для вивчення та подальшого вдосконалення, як надпродуцентів антибіотиків. На рис. 4.1 пропонуємо загальну схему прояву меродиплоїдного стану гена *rpsL* у *S. albus*. За рахунок наявності двох алелів гена *rpsL*, експресуються дві форми білка S12 – нативна та мутантна, що можуть включатись в структуру рибосом. Утворюється гетерогенна популяція рибосом в клітині, що, через низку процесів, веде до змін властивостей меродиплоїдів, як-от продукції вторинних метаболітів, стійкості до антибіотиків тощо.



**Рис. 4.1.** Загальна схема прояву меродиплоїдного стану гена *rpsL* у *S. albus*.

Іншим важливим доробком цієї роботи є початок дослідження процесів посттранскрипційних модифікацій тРНК, адже раніше цей важливий аспект біології тРНК для стрептоміцетів не вивчався. Як відомо, модифікації тРНК необхідні для оптимізації процесів трансляції, її швидкості та точності. Гіпомодифікація чи повна відсутність модифікацій певних позицій тРНК значним чином впливає на процес декодування мРНК. Порушення процесів модифікації тРНК призводять до біологічних феноменів вищого порядку – як-от порушення певних ланок метаболізму, морфогенезу чи стресової відповіді в бактерій, мітохондропатій чи дистрофій в людини тощо (Gu, Begley, and Dedon 2014; Bohnsack and Sloan 2018; Pereira et al. 2018).

Ми також зацікавились посттранскрипційними модифікаціями тРНК через наявність унікального регуляційного тандему у стрептоміцетів, а саме ТТА-кодону та тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>, що цей кодон розшифровує (Leskiw, Bibb, and Chater 1991; Takano et al. 2003; Chater and Chandra 2008; Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011; Hackl and Bechthold 2015). Адже відомо, що немає часової затримки початку накопичення тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> в клітинах стрептоміцетів (Pettersson and Kirsebom 2011), однак трансляція транскриптів, що містять UUA-кодони, є неефективною на ранніх стадіях росту (Leskiw et al. 1993; Kataoka, Kosono, and Tsujimoto 1999; Rebets et al. 2006). Можливо, така пізня активація тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> залежить від процесів модифікації нуклеозидів. Тому генерація і вивчення властивостей мутанта *S. albus ΔbldA* були необхідними передумовами дослідження мутантів за генами посттранскрипційних модифікацій. Слід наголосити, що біохімічний контроль МіА-шляху добре вивчено на модельних об'єктах, і він не був у фокусі цієї роботи. Тут ми зосередились на вивченні фізіологічних наслідків нокауту генів МіА-шляху у стрептоміцетів.

Мутант *S. albus ΔbldA* не виявляв класичного морфологічного *bld*-фенотипу, описаного для інших стрептоміцетів. Лише за певних умов

вищого рівня спостерігали певні дефекти росту штаму  $\Delta bldA$ , однак мутант був здатний до формування повітряного міцелію і спор практично на всіх твердих середовищах. Взявши до уваги результати експресії репортерного злиття  $adpA-gusA$  в  $\Delta bldA$ , можна припустити, що ТТА-кодон в складі гена  $adpA$  може на низькому рівні містранслюватись на фоні відсутності тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. Можливо, в штамі  $\Delta bldA$  утворюється достатня кількість білка AdpA для бодай часткового проходження циклу морфологічного розвитку. Втім, не виявлено жодних ознак експресії інших ТТА-вмісних генів (як-от в складі КГБ антибіотиків чи репортера pRV3) для  $\Delta bldA$ . До речі, подібний випадок містрансляції гена  $adpA$  в складі цього ж репортерного злиття  $adpA-gusA$  описаний і для мутанта *S. ghanaensis*  $\Delta bldA$ , при тому, що не вдалось виявити присутність епімерази MoeE5, ген якої містить два ТТА-кодони. Автори висувають припущення, що жорстка BldA-залежна регуляція експресії  $adpA$ , властива для *S. coelicolor*, *S. griseus* та *S. clavuligerus*, не є настільки суворою для *S. ghanaensis* (Makitrynskyu et al. 2013). Схоже, це ж припущення можна застосувати і для *S. albus*.

Відомо, що Mia-контрольовані модифікації характерні для позиції A37 більшості тРНК<sub>XHA</sub>. Тому, вивчаючи перших нокаутних штамів стрептоміцетів за генами, що кодують ортологів MiaA та MiaB, ми зосереджувались на кількох основних аспектах, а саме, на послідовних етапах синтезу модифікації, на властивостях нокаутних штамів та їх характеристикі, і на тому, чи впливає відсутність Mia-контрольованих модифікацій на експресію ТТА-вмісних генів.

Враховуючи те, що раніше біосинтез Mia-залежних модифікацій позиції A37 тРНК для стрептоміцетів не описаний, опираючись на результати цієї роботи, пропонуємо наступну послідовність синтезу для SAM2 (рис.4.2). (1) першою реакцією є утворення модифікації i<sup>6</sup>A37, що каталізує функціональний гомолог MiaA, XNR\_1074; (2) далі утворюється модифікація ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37, що є продуктом каталізу XNR\_1078, функціонального гомолога



MiaB; (3) фінальним кроком є гідроксилування ізопентенілового залишку, як в складі  $i^6$ A37 так і в  $ms^2i^6$ A37 з утворенням  $io^6$ A37 та  $ms^2io^6$ A37, відповідно, функціональним гомологом MiaE, наразі невідомим для SAM2.

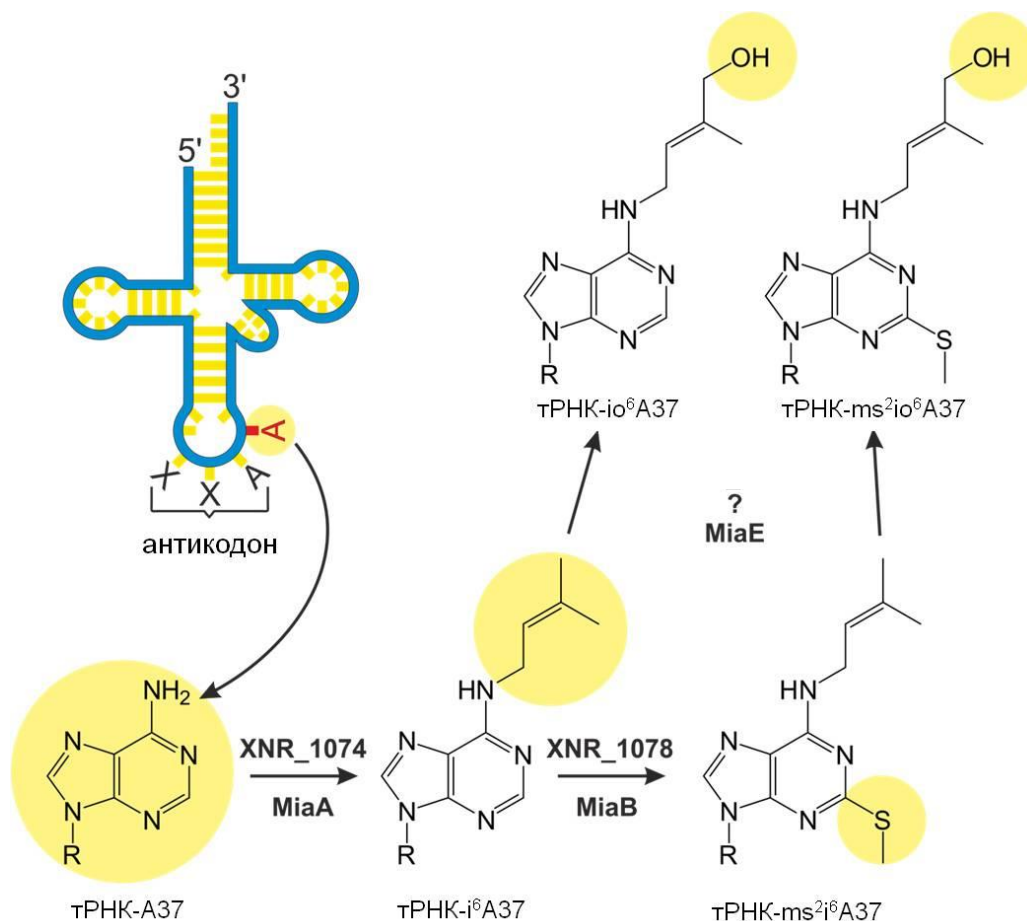


Рис. 4.2. Mia-залежні модифікації позиції A37 тРНК<sub>XXA</sub> для *S. albus* SAM2. Пояснення в тексті.

Варто відзначити, що штам  $\Delta miaA$  мав виразніший фенотип, очевидно, через блокування проходження найпершого етапу Mia-шляху модифікації тРНК. Делеція гена *XNR\_1074* веде до затримки морфологічного розвитку *S. albus* та зміни вторинного метаболізму на користь накопичення антиміцинів, при цьому, КГБ антибіотиків, що містять ТГА-кодони, практично не експресуються. Морфогенез стрептоміцетів знаходиться під контролем глобального регулятора AdpA (Nguyen et al. 2003), ген якого

містить ТТА-кодон та який, за результатами експресії репортерного злиття *adpA-gusA*, гірше транлюється в штамі  $\Delta miaA$  (див. рис. 3.33).

Досліджуючи глибше експресію ТТА-вмісних репортерів (ТТА-вмісні версії генів *gusA* та *lacZ*) у штамі  $\Delta miaA$ , варто відзначити, що такі гени експресуються гірше, ніж у дикому типі. Особливо при умовах низької транскрипції гена (без індуктора кумату у випадку  $pRV3^+$ -штамів, рис.3.32, А) чи на ранніх стадіях росту (ТТА-вмісна версія гена *gusA*, рис.3.34). Тут важливо зробити кілька висновків. По-перше, експресія ТТА-вмісних генів у штамі  $\Delta miaA$  ускладнена. По-друге, чим вищий рівень транскрипції ТТА-вмісного гена (тобто, чим більша кількість UUA-вмісної мРНК наявна), тим вища імовірність ефективної експресії такого гена в  $\Delta miaA$ .




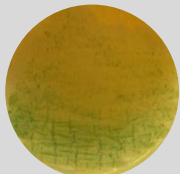




Ми припускаємо кілька причин описаних ефектів: (1) тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> не здатна ефективно розшифровувати UUA без модифікації  $m^2i^6A37$ ; (2) ефективна трансляція UUA-мРНК залежить від рівня транскрипції ТТА-вмісного гена, чим він вищий – тим вища імовірність прочитання UUA кодонів немодифікованою тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>; (3) можливо, через часову затримку розвитку культури  $\Delta miaA$ , накопичення тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> відбувається набагато повільніше, ніж у SAM2, що, в свою чергу, не дає змоги ефективно функціонувати позитивній регуляторній петлі BldA-AdpA (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011).

Хоча умови експресії ТТА-вмісного транскрипту в SAM2 і  $\Delta miaA$  складно точно визначити, усі наявні дані вказують на те, що експресія цих траскриптів в штамі  $\Delta miaA$  ускладнена. Але чи можна повністю пояснити фенотипи мутанта лише нездатністю ефективно транлювати UUA-кодони? Адже морфологічний фенотип  $\Delta miaA$  комплементується геном *adpA*, в якому ТТА кодон замінений на СТС, лише частково (рис.3.35). Та й фенотипи  $\Delta miaA$  і  $\Delta bldA$  частково подібні. Модифікація  $m^2i^6A37$  характерна і для інших тРНК<sub>XXX</sub>, невже ці немодифіковані тРНК жодним чином не виявляються? Для відповіді на ці питання ми сконструювали подвійного

мутанта  $\Delta miaA/bldA::aac(3)IV$ . Тепер, якщо ефекти мутації *miaA* проявляються лише через зниження ефективності тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>, то подвійний мутант мав би виявляти фенотип штаму  $\Delta bldA$ . Врахувавши, що морфологічний фенотип подвійного мутанта є дефектнішим, ніж фенотипи одинарних мутантів, ми дійшли висновку, що таке припущення є хибним. Очевидно, й інші тРНК, що підлягають Mia-модифікаціям, та гени, що містять відповідні кодони, є важливими для проходження нормального морфологічного розвитку штамом *S. albus* SAM2.

Хоча морфологічні та метаболічні дефекти  $\Delta miaA$  викликані порушенням декодуванням не тільки кодонів UUA, експресія генів із ТТА-кодонами в  $\Delta miaA$  однозначно має суттєвий внесок у досліджені нами явища. Кодон ТТА представлений виключно в генах, що не є життєво важливими, зокрема і в генах морфогенезу й синтезу антибіотиків. Тому кодон UUA і тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> можна вважати модельною системою для дослідження ролі посттранскрипційних модифікацій тРНК у біології прокаріотів. Перевагами такої системи є відносно невелика кількість генів, в складі яких присутні ТТА кодон(и); життєва неважливість цих генів; наявність лише однієї копії гена *bldA*, продуктом якого є єдина тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub>, що цей кодон декодує, а також виразні фенотипи, які є результатом неоптимального функціонування згаданої тРНК. Зокрема, до таких фенотипів можна віднести як морфологічні дефекти, так і зміни продукції вторинних метаболітів, КГБ яких або містять ТТА-кодони, або контролюються BldA-залежними регуляторами.

Саме тому, при описанні ролі модифікації ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A37 в *S. albus*, як приклад, ми використовуємо тРНК<sup>Лей</sup><sub>UAA</sub> та гени з ТТА-кодонами, що вона розкодує (рис.4.3). При цьому варто пам'ятати, що реалізація функції ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A37 відбувається і через пул інших тРНК<sub>ХХА</sub> та трансляцію їхніх відповідних кодонів.

	SAM2 тРНК <sup>Leu</sup> <sub>UAA</sub> -ms <sup>2</sup> io <sup>6</sup> A37	$\Delta$ miaA тРНК <sup>Leu</sup> <sub>UAA</sub> -A37
Ріст субстратного міцелію	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низька концентрація тРНК</li> <li>• Гіпомодифіковані тРНК</li> </ul> ❖ Неефективна трансляція UUA-вмісних мРНК 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низька концентрація тРНК</li> <li>• Відсутність модифікації</li> </ul> ❖ Абортивна трансляція UUA-вмісних мРНК 
Утворення повітряних гіфів і спор	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Підвищення концентрації тРНК</li> <li>• Зрілі тРНК</li> </ul> ❖ Ефективна трансляція UUA-вмісних мРНК...  <div data-bbox="544 1122 860 1330" style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;">             Морфогенез і спорулювання Синтез ТТА-залежних ВМ           </div> <p>...незалежно від кількості мРНК</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>X-gal</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>X-gal, кумат</p>  </div> </div> <p>pRV3<sup>+</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Підвищення (сповільнене) концентрації тРНК</li> <li>• Відсутність модифікації</li> </ul> ❖ Ускладнена трансляція UUA-вмісних мРНК...  <div data-bbox="1090 1122 1447 1330" style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;">             Ускладнений та сповільнений морфогенез Відсутній синтез ТТА-залежних ВМ           </div> <p>... та вища імовірність трансляції при високих кількостях мРНК</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>X-gal</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>X-gal, кумат</p>  </div> </div> <p>pRV3<sup>+</sup></p>

**Рис. 4.3.** Загальна роль модифікації ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A37 в метаболізмі *S. albus* на прикладі однієї з тРНК, що підлягають Mia-залежним модифікаціям, та кодону UUA, що вона розшифровує.

Загалом, Міа-контрольовані модифікації тРНК відіграють важливу роль в нормальному розвитку культури, а їх відсутність веде до виникнення складних фенотипів. Цікавим напрямком стало б дослідження внеску модифікації  $m^2i^6A37$  (та й інших модифікацій тРНК загалом) на експресію кластерів генів біосинтезу різних класів антибіотиків. Можливо, така експресія значним чином залежить від кодонного складу генів вторинного метаболізму.

Окремо хочу відзначити практичне значення отриманих результатів. По-перше, за матеріалами роботи опубліковано патент України на корисну модель “Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074”, що полягає у додатковому внесенні алеля  $rpsL^{L90K}$  (Кошла та Осташ 2017). Враховуючи, що отриманий меродиплоїд L90K\_ex надсинтезує аранціаміцин (майже у п’ять разів, порівняно з диким типом), штам може служити як основа для подальшого вдосконалення надпродуцентів полікетидних антибіотиків. По-друге, виявлено надсинтез кандицидинів штамом  $\Delta bldA$ , порівняно з диким типом (Koshla et al. 2017). І, хоч наразі точно не відомо, які механізми лежать в основі такого надсинтезу, нокаут гена *bldA* може служити цікавою стратегією для створення штамів-надпродуцентів тих антибіотиків, продукція яких не залежить від наявності тРНК<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. По-третє, сконструйований штам  $\Delta miaA$  надсинтезує антибіотики антимицини (Koshla et al. 2019). Це доводить вплив (механізми якого, однак, потребують подальшого вивчення) згаданих посттранскрипційних модифікацій тРНК на експресію принаймні деяких КГБ антибіотиків та відкриває нові шляхи для конструювання штамів стрептоміцетів із бажаними властивостями.

## ВИСНОВКИ

У результаті виконання роботи на основі штаму *Streptomyces albus* SAM2 розроблено експериментальну модель для вивчення процесів, що впливають на експресію генів на рівні трансляції у стрептоміцетів. З її допомогою, досліджено вплив меродиплоїдного стану гена *rpsL* на метаболізм штаму *S. albus* SAM2. Сконструйовано та описано фенотипи делеційного мутанта SAM2 за геном лейцил-тРНК *bldA*. Вперше сконструйовано та описано властивості делеційних мутантів *Streptomyces albus* SAM2 за генами, що кодують білки посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК.

1. Поєднання у геномі *Streptomyces albus* SAM2 алелів гена рибосомного білка S12 дикого типу та його алеля з точковими мутаціями викликає низку фенотипових змін. Так, внесення мутантного алеля гена *rpsL*<sup>G192</sup> порушує нормальний перебіг морфогенезу на агаризованих середовищах, а внесення *rpsL*<sup>K88E</sup> підвищує стійкість до стрептоміцину. Стрептоміцин-стійкість останнього штаму на пізніх стадіях росту можна тлумачити як поступове накопичення в культурі рибосом, які містять мутантний білок S12(K88E).
2. Внесення алеля *rpsL*<sup>L90K</sup> у штаму SAM2 виявляється у надпродукції гетерологічного антибіотика аранціаміцину та активізації ендогенного вторинного метаболізму. Штаму *Streptomyces albus* L90K\_ex є перспективним для подальшого вдосконалення та використання як господаря для надекспресії кластерів генів біосинтезу полікетидних антибіотиків.
3. Делеція гена *bldA* у *Streptomyces albus* SAM2 призводить до кондиційних (залежних від умов вирощування) порушень морфогенезу, однак не спричинює повного блокування розвитку

повітряного міцелію і спор. Штам  $\Delta bldA$  практично не продукує пауломіцину – власного антибіотика *S. albus*, гени біосинтезу якого містять ТТА-кодони. Незначний рівень експресії  $\Delta bldA$  мутантом деяких ТТА-вмісних репортерних генів вказує на містрансляцію цього кодону, зокрема, у складі гена плейотропного транскрипційного фактора *adpA*.

4. В *Streptomyces albus* SAM2 ген *XNR\_1074 (miaA)* кодує тРНК (аденозин (37)-N6)-диметилалілтрансферазу, а ген *XNR\_1078 (miaB)* – тРНК (N6-ізопентеніл аденозин (37)-C2)-метилтіотрансферазу, що задіяні в синтезі гіпермодифікованого залишку аденозину,  $m^2i^6A_{37}$ , в 37-й позиції тРНК<sub>ХХА</sub>.
5. Делеція гена *miaA* в *Streptomyces albus* SAM2 призводить до суттєвого гальмування росту та морфологічного розвитку, та пригнічення експресії кластерів генів вторинного метаболізму, що містять гени з ТТА кодонами. Делеція гена *miaB* не мала суттєвого впливу на ріст і морфологічний розвиток *S. albus*.
6. Порівняно із диким типом,  $\Delta miaA$  мутант накопичує підвищені кількості антимицинів та виявляє підвищену чутливість до пероксиду водню. Цей мутант також відрізняється від батьківського штаму за ростом і синтезом вторинних метаболітів за культивування при підвищених температурах (37 °C і 42 °C).
7. Морфологічні та метаболічні дефекти  $\Delta miaA$  мутанта особливо виразні на початкових етапах розвитку (24-48 год росту) і викликані неефективним декодуванням не лише кодона UUA, але й інших кодонів родини UXX.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agarwal, D., S. Gregory, and M. O'Connor. 2011. "Error-Prone and Error-Restrictive Mutations Affecting Ribosomal Protein S12." *J. Mol. Biol.* 410(1):1–9. doi:10.1016/j.jmb.2011.04.068.
2. Al-Bassam, M., M. Bibb, M. Bush, G. Chandra, and M. Buttner. 2014. "Response Regulator Heterodimer Formation Controls a Key Stage in *Streptomyces* Development." *PLoS Genet.* 10(8):e1004554. doi:10.1371/journal.pgen.1004554.
3. Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. 1961. "Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* 81(5):741–746.
4. Anderson, T., P. Brian, and W. Champness. 2001. "Genetic and Transcriptional Analysis of *absA*, an Antibiotic Gene Cluster-Linked Two-Component System That Regulates Multiple Antibiotics in *Streptomyces coelicolor*." *Mol. Microbiol.* 39(3):553–566.
5. Aubee, J., M. Olu, and K. Thompson. 2016. "The i6A37 tRNA Modification Is Essential for Proper Decoding of UUX-Leucine Codons During *rpoS* and *iraP* Translation." *RNA* 22(5):729–742. doi:10.1261/rna.053165.115.
6. ———. 2017. "TrmL and TusA Are Necessary for *rpoS* and MiaA Is Required for *hfq* Expression in *Escherichia coli*." *Biomolecules* 7(2):pii:E39. doi:10.3390/biom7020039.
7. Baltz, R. 2010. "*Streptomyces* and *Saccharopolyspora* Hosts for Heterologous Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(8):759–772. doi:10.1007/s10295-010-0730-9.
8. Banerjee, R., S. Chen, K. Dare, M. Gilreath, M. Praetorius-Ibba, M. Raina, N. Reynolds, T. Rogers, H. Roy, S. Yadavalli, and M. Ibba. 2010. "tRNAs: Cellular Barcodes for Amino Acids." *FEBS Lett.* 584(2):387–395. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.013.



9. Barka, E., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, H.-P. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch, and G. van Wezel. 2016. "Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1):1–43. doi:10.1128/MMBR.00019-15.
10. Barnard, A., N. Simpson, K. Lilley, and G. Salmond. 2010. "Mutations in *rpsL* That Confer Streptomycin Resistance Show Pleiotropic Effects on Virulence and the Production of a Carbapenem Antibiotic in *Erwinia carotovora*." *Microbiology* 156:1030–1039. doi:10.1099/mic.0.034595-0.
11. Bentley, S., K. Chater, A.-M. Cerdeño-Tárraga, G. Challis, N. Thomson, K. James, D. Harris, M. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. Barrell, J. Parkhill, and D. Hopwood. 2002. "Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Nature* 417(6885):141–147. doi:10.1038/417141a.
12. Bérdy, J. 2012. "Thoughts and Facts about Antibiotics: Where We Are Now and Where We Are Heading." *J. Antibiot. (Tokyo)*. 65(8):385–395. doi:10.1038/ja.2012.27.
13. Bibb, M. 1996. "The Regulation of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Microbiology* 142(6):1335–1344. doi:10.1099/13500872-142-6-1335.
14. Bibb, M., Á. Domonkos, G. Chandra, and M. Buttner. 2012. "Expression of the Chaplin and Rodlin Hydrophobic Sheath Proteins in *Streptomyces venezuelae* Is Controlled by  $\sigma$ (BldN) and a Cognate Anti-Sigma Factor, RsbN." *Mol. Microbiol.* 84(6):1033–1049. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08070.x.

15. Bibb, M., V. Molle, and M. Buttner. 2000. "sigma(BldN), an Extracytoplasmic Function RNA Polymerase Sigma Factor Required for Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *J. Bacteriol.* 182(16):4606–4616.
16. Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. Seno, R. Rao, and B. Schonert. 1992. "Plasmid Cloning Vectors for the Conjugal Transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." *Gene* 116(1):43–49.
17. Bilyk, B., and A. Luzhetskyy. 2014. "Unusual Site-Specific DNA Integration into the Highly Active pseudo-*attB* of the *Streptomyces albus* J1074 Genome." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(11):5095–5104. doi:10.1007/s00253-014-5605-y.
18. Björk, G., K. Jacobsson, K. Nilsson, M. Johansson, A. Byström, and O. Persson. 2001. "A Primordial tRNA Modification Required for the Evolution of Life?" *EMBO J.* 20(1):231–239. doi:10.1093/emboj/20.1.231.
19. Björk G., J. Ericson, C. Gustafsson, T. Hagervall, Y. Jönsson, and P. Wikström. 1987. "Transfer RNA Modification." *Annu Rev Biochem.* 56:263–287. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.001403.
20. Björkman, J., P. Samuelsson, D. Andersson, and D. Hughes. 1999. "Novel Ribosomal Mutations Affecting Translational Accuracy, Antibiotic Resistance and Virulence of *Salmonella typhimurium*." *Mol. Microbiol.* 31(1):53–58.
21. Blodgett, J., J. Zhang, and W. Metcalf. 2005. "Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Heterologous Expression of the Phosphinothricin Tripeptide Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736." *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(1):230–240. doi:10.1128/AAC.49.1.230-240.2005.
22. Boccaletto, P., M. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. Limbach, A. Kotter, M. Helm, and J. Bujnicki. 2018. "MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways. 2017 Update." *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D303–307.

- doi:10.1093/nar/gkx1030.
23. Bohnsack, M., and K. Sloan. 2018. “The Mitochondrial Epitranscriptome: The Roles of RNA Modifications in Mitochondrial Translation and Human Disease.” *Cell. Mol. Life Sci.* 75(2):241–260. doi:10.1007/s00018-017-2598-6.
  24. Bruni, C., V. Colantuoni, L. Sbordone, R. Cortese, and F. Blasi. 1977. “Biochemical and Regulatory Properties of *Escherichia coli* K-12 *hisT* Mutants.” *J. Bacteriol.* 130(1):4–10.
  25. Bush, M., N. Tschowri, S. Schlimpert, K. Flårdh, and M. Buttner. 2015. “c-di-GMP Signalling and the Regulation of Developmental Transitions in Streptomyces.” *Nat. Rev. Microbiol.* 13(12):749–760. doi:10.1038/nrmicro3546.
  26. Byrgazov, K., O. Vesper, and I. Moll. 2013. “Ribosome Heterogeneity: Another Level of Complexity in Bacterial Translation Regulation.” *Curr. Opin. Microbiol.* 16(2):133–139. doi:10.1016/j.mib.2013.01.009.
  27. Calamita, P., G. Gatti, A. Miluzio, A. Scagliola, and S. Biffo. 2018. “Translating the Game: Ribosomes as Active Players.” *Front. Genet.* 9:533. doi:10.3389/fgene.2018.00533.
  28. Capstick, D., J. Willey, M. Buttner, and M. Elliot. 2007. “SapB and the Chaplins: Connection Between Morphogenetic Proteins in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 64(3):602–613. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05674.x.
  29. Carr, J., S. Gregory, and A. Dahlberg. 2005. “Severity of the Streptomycin Resistance and Streptomycin Dependence Phenotypes of Ribosomal Protein S12 of *Thermus thermophilus* Depends on the Identity of Highly Conserved Amino Acid Residues.” *J. Bacteriol.* 187(10):3548–3550. doi:10.1128/JB.187.10.3548-3550.2005.
  30. Carter, A., W. Clemons, D. Brodersen, R. Morgan-Warren, B. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. “Functional Insights from the Structure of the 30S Ribosomal Subunit and Its Interactions with Antibiotics.” *Nature*

- 407(6802):340–348. doi:10.1038/35030019.
31. Cayama, E., A. Yépez, F. Rotondo, E. Bandeira, A. Ferreras, and F. Triana-Alonso. 2000. “New Chromatographic and Biochemical Strategies for Quick Preparative Isolation of tRNA.” *Nucleic Acids Res.* 28(12):E64.
  32. Chandra, G., and K. Chater. 2008. “Evolutionary Flux of Potentially *bldA*-Dependent *Streptomyces* Genes Containing the Rare Leucine Codon TTA.” *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(1):111–126. doi:10.1007/s10482-008-9231-5.
  33. Chang, G., J. Roth, and B. Ames. 1971. “Histidine Regulation in *Salmonella typhimurium*. 8. Mutations of the *hisT* Gene.” *J. Bacteriol.* 108(1):410–414.
  34. Chater, K. 1972. “A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*.” *J. Gen. Microbiol.* 72(1):9–28. doi:10.1099/00221287-72-1-9.
  35. ———. 2001. “Regulation of Sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): A Checkpoint Multiplex?” *Curr. Opin. Microbiol.* 4(6):667–673.
  36. Chater, K., and G. Chandra. 2006. “The Evolution of Development in *Streptomyces* Analysed by Genome Comparisons.” *FEMS Microbiol. Rev.* 30(5):651–672. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x.
  37. Chater, K., and G. Chandra. 2008. “The Use of the Rare UUA Codon to Define Expression Space for Genes Involved in Secondary Metabolism, Development and Environmental Adaptation in *Streptomyces*.” *J. Microbiol.* 46(1):1–11. doi:10.1007/s12275-007-0233-1.
  38. Crick, F. 1966. “Codon-Anticodon Pairing: The Wobble Hypothesis.” *J. Mol. Biol.* 19(2):548–555.
  39. Csárdi, G., A. Franks, D. Choi, E. Airoidi, and D. Drummond. 2015. “Accounting for Experimental Noise Reveals That mRNA Levels, Amplified by Post-Transcriptional Processes, Largely Determine Steady-State Protein Levels in Yeast.” *PLoS Genet.* 11(5):e1005206. doi:10.1371/journal.pgen.1005206.
  40. Davanloo, P., M. Sprinzl, K. Watanabe, M. Albani, and H. Kersten. 1979.

- “Role of Ribothymidine in the Thermal Stability of Transfer RNA as Monitored by Proton Magnetic Resonance.” *Nucleic Acids Res.* 6(4):1571–1581.
41. Day, D., and M. Tuite. 1998. “Post-Transcriptional Gene Regulatory Mechanisms in Eukaryotes: An Overview.” *J. Endocrinol.* 157(3):361–371.
42. Demirci, H., L. Wang, F. Murphy, E. Murphy, J. Carr, S. Blanchard, G. Jogl, A. Dahlberg, and S. T. Gregory. 2013. “The Central Role of Protein S12 in Organizing the Structure of the Decoding Site of the Ribosome.” *RNA* 19(12):1791–1801. doi:10.1261/rna.040030.113.
43. Dihanich, M., D. Najarian, R. Clark, E. Gillman, N. Martin, and A. Hopper. 1987. “Isolation and Characterization of MOD5, a Gene Required for Isopentenylation of Cytoplasmic and Mitochondrial tRNAs of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Mol. Cell. Biol.* 7(1):177–184.
44. Elliot, M., M. Bibb, M. Buttner, and B. Leskiw. 2001. “BldD Is a Direct Regulator of Key Developmental Genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *Mol. Microbiol.* 40(1):257–269.
45. Ericson, J., and G. Björk. 1986. “Pleiotropic Effects Induced by Modification Deficiency next to the Anticodon of tRNA from *Salmonella typhimurium* LT2.” *J. Bacteriol.* 166(3):1013–1021.
46. Fernández-Moreno, M., J. Caballero, D. Hopwood, and F. Malpartida. 1991. “The *act* Cluster Contains Regulatory and Antibiotic Export Genes, Direct Targets for Translational Control by the *bldA* tRNA Gene of *Streptomyces*.” *Cell* 66(4):769–780.
47. Flärdh, K., E. Leibovitz, M. Buttner, and K. Chater. 2000. “Generation of a Non-Sporulating Strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the Manipulation of a Developmentally Controlled *ftsZ* Promoter.” *Mol. Microbiol.* 38(4):737–749.
48. Fu, J., S. Wenzel, O. Perlova, J. Wang, F. Gross, Z. Tang, Y. Yin, A. Stewart, R. Müller, and Y. Zhang. 2008. “Efficient Transfer of Two Large Secondary

- Metabolite Pathway Gene Clusters into Heterologous Hosts by Transposition.” *Nucleic Acids Res.* 36(17):e113. doi:10.1093/nar/gkn499.
49. Gehrke, C., and K. Kuo. 1989. “Ribonucleoside Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography.” *J. Chromatogr.* 471:3–36.
50. Genuth, N., and M. Barna. 2018. “The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life.” *Mol. Cell* 71(3):364–374. doi:10.1016/j.molcel.2018.07.018.
51. Gerber, A., and W. Keller. 1999. “An Adenosine Deaminase That Generates Inosine at the Wobble Position of tRNAs.” *Science* 286(5442):1146–1149.
52. Gessner, A., T. Heitzler, S. Zhang, C. Klaus, R. Murillo, H. Zhao, S. Vanner, D. Zechel, and A. Bechthold. 2015. “Changing Biosynthetic Profiles by Expressing *bldA* in *Streptomyces* Strains.” *ChemBioChem* 16(15):2244–2252. doi:10.1002/cbic.201500297.
53. González, A., M. Rodríguez, A. Braña, C. Méndez, J. Salas, and C. Olano. 2016. “New Insights into Paulomycin Biosynthesis Pathway in *Streptomyces albus* J1074 and Generation of Novel Derivatives by Combinatorial Biosynthesis.” *Microb. Cell Fact.* 15(1):56. doi:10.1186/s12934-016-0452-4.
54. Gramajo, H., E. Takano, and M. Bibb. 1993. “Stationary-Phase Production of the Antibiotic Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Is Transcriptionally Regulated.” *Mol. Microbiol.* 7(6):837–845.
55. Gregory, S., J. Cate, and A. Dahlberg. 2001. “Streptomycin-Resistant and Streptomycin-Dependent Mutants of the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus*.” *J. Mol. Biol.* 309(2):333–338. doi:10.1006/jmbi.2001.4676.
56. Gu, C., T. Begley, and P. Dedon. 2014. “tRNA Modifications Regulate Translation During Cellular Stress.” *FEBS Lett.* 588(23):4287–4296. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.038.
57. Gullón, S., C. Olano, M. Abdelfattah, A. Braña, J. Rohr, C. Méndez, and J. Salas. 2006. “Isolation, Characterization, and Heterologous Expression of the Biosynthesis Gene Cluster for the Antitumor Anthracycline Steffimycin.” *Appl.*

- Environ. Microbiol.* 72(6):4172–4183. doi:10.1128/AEM.00734-06.
58. Guo, H. 2018. “Specialized Ribosomes and the Control of Translation.” *Biochem. Soc. Trans.* 46(4):855–869. doi:10.1042/BST20160426.
59. Gust, B., G. Challis, K. Fowler, T. Kieser, and K. Chater. 2003. “PCR-Targeted *Streptomyces* Gene Replacement Identifies a Protein Domain Needed for Biosynthesis of the Sesquiterpene Soil Odor Geosmin.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(4):1541–1546. doi:10.1073/pnas.0337542100.
60. Gust, B., T. Kieser, and K. Chater. 2002. *PCR Targeting System in Streptomyces Coelicolor A(3)2*. Norwich: John Innes Centre.
61. Guthrie, E., C. Flaxman, J. White, D. Hodgson, M. Bibb, and K. Chater. 1998. “A Response-Regulator-like Activator of Antibiotic Synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an Amino-Terminal Domain That Lacks a Phosphorylation Pocket.” *Microbiology* 144(3):727–738. doi:10.1099/00221287-144-3-727.
62. Hackl, S., and A. Bechthold. 2015. “The Gene *bldA*, a Regulator of Morphological Differentiation and Antibiotic Production in *Streptomyces*.” *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 348(7):455–462. doi:10.1002/ardp.201500073.
63. Helm, M., C. Florentz, A. Chomyn, and G. Attardi. 1999. “Search for Differences in Post-Transcriptional Modification Patterns of Mitochondrial DNA-Encoded Wild-Type and Mutant Human tRNA<sup>Lys</sup> and tRNA<sup>Leu</sup>(UUR).” *Nucleic Acids Res.* 27(3):756–763.
64. Hengst, C. den, N. Tran, M. Bibb, G. Chandra, B. Leskiw, and M. Buttner. 2010. “Genes Essential for Morphological Development and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* Are Targets of BldD during Vegetative Growth.” *Mol. Microbiol.* 78(2):361–79.
65. Heo, G.-Y., W.-C. Kim, G.-J. Joo, Y.-Y. Kwak, J.-H. Shin, D.-H. Roh, H.-D. Park, and I.-K. Rhee. 2008. “Deletion of *xylR* Gene Enhances Expression of Xylose Isomerase in *Streptomyces lividans* TK24.” *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(5):837–844.

66. Herrmann, S., T. Siegl, M. Luzhetska, L. Petzke, C. Jilg, E. Welle, A. Erb, P. Leadlay, A. Bechthold, and A. Luzhetskyy. 2012. "Site-Specific Recombination Strategies for Engineering Actinomycete Genomes." *Appl. Environ. Microbiol.* 78(6):1804–1812. doi:10.1128/AEM.06054-11.
67. Hesketh, A., J. Sun, and M. Bibb. 2001. "Induction of ppGpp Synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown Under Conditions of Nutritional Sufficiency Elicits *actII*-ORF4 Transcription and Actinorhodin Biosynthesis." *Mol. Microbiol.* 39(1):136–144.
68. Hesketh, A., W. Chen, J. Ryding, S. Chang, and M. Bibb. 2007. "The Global Role of ppGpp Synthesis in Morphological Differentiation and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Genome Biol.* 8(8):R161. doi:10.1186/gb-2007-8-8-r161.
69. Higo, A., S. Horinouchi, and Y. Ohnishi. 2011. "Strict Regulation of Morphological Differentiation and Secondary Metabolism by a Positive Feedback Loop between Two Global Regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*." *Mol. Microbiol.* 81(6):1607–1622. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07795.x.
70. Holberger, L., and C. Hayes. 2009. "Ribosomal Protein S12 and Aminoglycoside Antibiotics Modulate A-Site mRNA Cleavage and Transfer-Messenger RNA Activity in *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 284(46):32188–32200. doi:10.1074/jbc.M109.062745.
71. Hopwood, D., M. Bibb, K. Chater, T. Kieser, C. Bruton, H. Kieser, D. Lydiate, C. Smith, J. Ward, and H. Schrempf. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces : A Laboratory Manual*. Norwich: The John Innes Foundation.
72. Hopwood, D. 1967. "Genetic Analysis and Genome Structure in *Streptomyces coelicolor*." *Bacteriol. Rev.* 31(4):373–403.
73. Horinouchi, S., and T. Beppu. 2007. "Hormonal Control by A-Factor of Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces*." *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 83(9–10):277–295.



doi:10.2183/pjab/83.277.

74. Hosaka, T., J. Xu, and K. Ochi. 2006. “Increased Expression of Ribosome Recycling Factor Is Responsible for the Enhanced Protein Synthesis During the Late Growth Phase in an Antibiotic-Overproducing *Streptomyces coelicolor* Ribosomal *rpsL* Mutant.” *Mol. Microbiol.* 61(4):883–897. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05285.x.
75. Hou, B., L. Tao, X. Zhu, W. Wu, M. Guo, J. Ye, H. Wu, and H. Zhang. 2018. “Global Regulator BldA Regulates Morphological Differentiation and Lincomycin Production in *Streptomyces lincolnensis*.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(9):4101–1415. doi:10.1007/s00253-018-8900-1.
76. Iqbal, M., Y. Mast, R. Amin, D. Hodgson, STREAM Consortium, W. Wohlleben, and N. Burroughs. 2012. “Extracting Regulator Activity Profiles by Integration of de novo Motifs and Expression Data: Characterizing Key Regulators of Nutrient Depletion Responses in *Streptomyces coelicolor*.” *Nucleic Acids Res.* 40(12):5227–5239. doi:10.1093/nar/gks205.
77. Jakimowicz, D., S. Mouz, J. Zakrzewska-Czerwinska, and K. F. Chater. 2006. “Developmental Control of a parAB Promoter Leads to Formation of Sporulation-Associated ParB Complexes in *Streptomyces coelicolor*.” *J. Bacteriol.* 188(5):1710–1720. doi:10.1128/JB.188.5.1710-1720.2006.
78. Kaiser, B., and B. Stoddard. 2011. “DNA Recognition and Transcriptional Regulation by the WhiA Sporulation Factor.” *Sci. Rep.* 1(1):156. doi:10.1038/srep00156.
79. Kaminska, K., U. Baraniak, M. Boniecki, K. Nowaczyk, A. Czerwonec, and J. Bujnicki. 2007. “Structural Bioinformatics Analysis of Enzymes Involved in the Biosynthesis Pathway of the Hypermodified Nucleoside ms2io6A37 in tRNA.” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 70(1):1–18. doi:10.1002/prot.21640.
80. Kataoka, M., S. Kosono, and G. Tsujimoto. 1999. “Spatial and Temporal Regulation of Protein Expression by *bldA* within a *Streptomyces lividans*

- Colony.” *FEBS Lett.* 462(3):425–429.
81. Kelemen, G., and M. Buttner. 1998. “Initiation of Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces*.” *Curr. Opin. Microbiol.* 1(6):656–662.
82. Kharaton, Y., O. Koshla, M. Lopatniuk, Y. Sehin, O. Kuzemko, Kh. Yusktiv, I. Ostash, A. Luzhetskyy, K. Ochi, and B. Ostash. 2016. “Generation and Study of *Streptomyces albus* J1074 and *S. cyanogenus* S136 *rpsL* Merodiploid Strains.” Abstracts of XII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 19–21.
83. Kieser, T., M. Bibb, M. Buttner, K. Chater, and D. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
84. Kimura, M., and J. Kimura. 1987. “The Complete Amino Acid Sequence of Ribosomal Protein S12 from *Bacillus stearothermophilus*.” *FEBS Lett.* 210(1):91–96.
85. Koshla, O., O. Borys, and B. Ostash. 2017. “Heterologous Aranciamycin Production by *rpsL* Merodiploids of *Streptomyces albus* J1074.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.
86. Koshla, O., V. Kravets, Kh. Yusktiv, and B. Ostash. 2017. “Some Properties of *Streptomyces albus* J1074 Strains Carrying *rpsL* Missense Mutation K88E.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.
87. Koshla, O., and B. Ostash. 2018. “A Genetic Assay System to Study Mistranslation of Leucyl Codon UUA in *Streptomyces*.” *Вісник Львівського університету. Серія біологічна* 77:70–75. doi:10.30970/vlubs.2018.77.08.
88. Koshla, O., I. Rokytsky, I. Ostash, T. Busche, J. Kalinowski, E. Mösker, R. Süßmuth, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Secondary Metabolome and Transcriptome of *Streptomyces albus* J1074 in Liquid Medium SG2.” *Cytol. Genet.* 53(1):1–7.
89. Koshla, O., I. Rokytsky, J. Sehin, L. Kirsebom, A. Luzhetskyy, and

- B. Ostash. 2017. “Switch of the Switch? Posttranscriptional TRNA Modifications as Regulators in *Streptomyces* Biology.” Abstracts of EMBO conference Bacterial networks (BacNet17), Sant Feliu de Guixols, Spain, September 9-14.
90. Koshla, O., Y. Sehin, and B. Ostash. 2018. “The Role of *miaA* and *miaB* Genes in *Streptomyces albus* SAM2 Metabolism.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
91. Koshla, O., O. Yushchuk, I. Ostash, Y. Dacyuk, M. Myronovskyi, G. Jäger, R. Süßmuth, A. Luzhetskyy, A. Byström, L. Kirsebom, and B. Ostash. 2019. “Gene *miaA* for Post-transcriptional Modification of tRNA<sub>XXXA</sub> is Important for Morphological and Metabolic Differentiation in *Streptomyces*.” *Mol. Microbiol.* 112(1):249-265. doi:10.1111/mmi.14266.
92. Koshla, O., O. Yushchuk, I. Ostash, V. Kravets, R. Suessmuth, G. Jäger, A. Bystrom, B. Ostash, and V. Fedorenko. 2018. “Post-transcriptional Modifications of tRNA Modulate Secondary Metabolism of *Streptomyces*.” Program and Abstracts Book for International conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”, Lviv, October 29–31.
93. Koshla, O., M. Lopatniuk, I. Rokytskyi, O. Yushchuk, Y. Dacyuk, V. Fedorenko, A. Luzhetskyy, and B. Ostash. 2017. “Properties of *Streptomyces albus* J1074 Mutant Deficient in tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> Gene *bldA*.” *Arch. Microbiol.* 199(8):1175–1183. doi:10.1007/s00203-017-1389-7.
94. Kwak, J., L. McCue, and K. Kendrick. 1996. “Identification of *bldA* Mutants of *Streptomyces griseus*.” *Gene* 171(1):75–78.
95. Laten, H., J. Gorman, and R. Bock. 1978. “Isopentenyladenosine Deficient tRNA from an Antisuppressor Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Nucleic Acids Res.* 5(11):4329–4342.
96. Lawlor, E., H. Baylis, and K. Chater. 1987. “Pleiotropic Morphological and Antibiotic Deficiencies Result from Mutations in a Gene Encoding a tRNA-

- like Product in *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *Genes Dev.* 1(10):1305–1310.
97. Leskiw, B., M. Bibb, and K. Chater. 1991. “The Use of a Rare Codon Specifically During Development?” *Mol. Microbiol.* 5(12):2861–2867.
98. Leskiw, B., E. Lawlor, J. Fernandez-Abalos, and K. Chater. 1991. “TTA Codons in Some Genes Prevent Their Expression in a Class of Developmental, Antibiotic-Negative, *Streptomyces* Mutants.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(6):2461–2465.
99. Leskiw, B., R. Mah, E. Lawlor, and K. Chater. 1993. “Accumulation of *bldA*-Specified tRNA Is Temporally Regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *J. Bacteriol.* 175(7):1995–2005.
100. Li, W., J. Wu, W. Tao, C. Zhao, Y. Wang, X. He, G. Chandra, X. Zhou, Z. Deng, K. Chater, and M. Tao. 2007. “A Genetic and Bioinformatic Analysis of *Streptomyces coelicolor* Genes Containing TTA Codons, Possible Targets for Regulation by a Developmentally Significant tRNA.” *FEMS Microbiol. Lett.* 266(1):20–28. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00494.x.
101. Lilleorg, S., K. Reier, A. Pulk, A. Liiv, T. Tammsalu, L. Peil, J. Cate, and J. Remme. 2018. “Bacterial Ribosome Heterogeneity: Changes in Ribosomal Protein Composition during Transition into Stationary Growth Phase.” *Biochimie* 156:169–180. doi:10.1016/j.biochi.2018.10.013.
102. Liu, G., K. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan. 2013. “Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(1):112–143. doi:10.1128/MMBR.00054-12.
103. Lowe, T., and S. Eddy. 1997. “tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence.” *Nucleic Acids Res.* 25(5):955–964.
104. Lowe, T., and P. Chan. 2016. “tRNAscan-SE On-Line: Integrating Search and Context for Analysis of Transfer RNA Genes.” *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W54–57. doi:10.1093/nar/gkw413.
105. Luzhetskyy, A., A. Mayer, J. Hoffmann, S. Pelzer, M. Holzenkämper,

- B. Schmitt, S.-E. Wohlert, A. Vente, and A. Bechthold. 2007. “Cloning and Heterologous Expression of the Aranciamycin Biosynthetic Gene Cluster Revealed a New Flexible Glycosyltransferase.” *ChemBioChem* 8(6):599–602. doi:10.1002/cbic.200600529.
106. Makitrynsky, R., B. Ostash, O. Tsypik, Y. Rebets, E. Doud, T. Meredith, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, S. Walker, and V. Fedorenko. 2013. “Pleiotropic Regulatory Genes *bldA*, *adpA* and *absB* Are Implicated in Production of Phosphoglycolipid Antibiotic Moenomycin.” *Open Biol.* 3(10):130121. doi:10.1098/rsob.130121.
107. Makitrynsky, R., Y. Rebets, B. Ostash, N. Zaburannyi, M. Rabyk, S. Walker, and V. Fedorenko. 2010. “Genetic Factors That Influence Moenomycin Production in *Streptomyces*.” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(6):559–566. doi:10.1007/s10295-010-0701-1.
108. Mathevon, C., F. Pierrel, J.-L. Oddou, R. Garcia-Serres, G. Blondin, J.-M. Latour, S. Ménage, S. Gambarelli, M. Fontecave, and M. Atta. 2007. “tRNA-Modifying MiaE Protein from *Salmonella typhimurium* Is a Nonheme Diiron Monooxygenase.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(33):13295–300. doi:10.1073/pnas.0704338104.
109. McCormick, J., and K. Flärdh. 2012. “Signals and Regulators That Govern *Streptomyces* Development.” *FEMS Microbiol. Rev.* 36(1):206–231. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x.
110. Merrick, M. 1976. “A Morphological and Genetic Mapping Study of Bald Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*.” *J. Gen. Microbiol.* 96(2):299–315. doi:10.1099/00221287-96-2-299.
111. Muramatsu, T., S. Yokoyama, N. Horie, A. Matsuda, T. Ueda, Z. Yamaizumi, Y. Kuchino, S. Nishimura, and T. Miyazawa. 1988. “A Novel Lysine-Substituted Nucleoside in the First Position of the Anticodon of Minor Isoleucine tRNA from *Escherichia coli*.” *J. Biol. Chem.* 263(19):9261–9267.
112. Myronovskyi, M., B. Rosenkränzer, and A. Luzhetskyy. 2014. “Iterative

- Marker Excision System.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(10):4557–4570. doi:10.1007/s00253-014-5523-z.
113. Myronovskyi, M., B. Tokovenko, E. Brötz, C. Rückert, J. Kalinowski, and A. Luzhetskyy. 2014. “Genome Rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 Lead to the Carotenoid Gene Cluster Activation.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(2):795–806. doi:10.1007/s00253-013-5440-6.
114. Myronovskyi, M., E. Welle, V. Fedorenko, and A. Luzhetskyy. 2011. “ $\beta$ -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Reporter in Actinomycetes.” *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15):5370–5383. doi:10.1128/AEM.00434-11.
115. Nguyen, K., J. Tenor, H. Stettler, L. Nguyen, L. Nguyen, and C. Thompson. 2003. “Colonial Differentiation in *Streptomyces coelicolor* Depends on Translation of a Specific Codon within the *adpA* Gene.” *J. Bacteriol.* 185(24):7291–7296.
116. Novoa, E., and L. Ribas de Pouplana. 2012. “Speeding with Control: Codon Usage, tRNAs, and Ribosomes.” *Trends Genet.* 28(11):574-581. doi:10.1016/j.tig.2012.07.006.
117. Numata, T. 2015. “Mechanisms of the tRNA Wobble Cytidine Modification Essential for AUA Codon Decoding in Prokaryotes.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(3):347–353. doi:10.1080/09168451.2014.975185.
118. Okamoto-Hosoya, Y., T. Hosaka, and K. Ochi. 2003. “An Aberrant Protein Synthesis Activity Is Linked with Antibiotic Overproduction in *rpsL* Mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *Microbiology* 149(11):3299–3309. doi:10.1099/mic.0.26490-0.
119. Olano, C., I. García, A. González, M. Rodríguez, D. Rozas, J. Rubio, M. Sánchez-Hidalgo, A. Braña, C. Méndez, and J. Salas. 2014. “Activation and Identification of Five Clusters for Secondary Metabolites in *Streptomyces Albus* J1074.” *Microb. Biotechnol.* 7(3):242–256. doi:10.1111/1751-7915.12116.
120. Ostash, B., O. Yushchuk, O. Koshla, Y. Rebets, I. Ostash, Y. Sehin,

- T. Busche, J. Kalinowski, G. Muth, and V. Fedorenko. 2018. “Elucidation of the Genetic Mechanisms Contributing to Moenomycin Resistance in Actinobacteria.” *Фактори експериментальної еволюції організмів* 22:203–209.
121. Ostash, B., J. Campbell, A. Luzhetskyy, and S. Walker. 2013. “MoeH5: A Natural Glycorandomizer from the Moenomycin Biosynthetic Pathway.” *Mol. Microbiol.* 90(6):1324–1338. doi:10.1111/mmi.12437.
122. Ostash, B., A. Saghatelian, and S. Walker. 2007. “A Streamlined Metabolic Pathway for the Biosynthesis of Moenomycin A.” *Chem. Biol.* 14(3):257–267. doi:10.1016/j.chembiol.2007.01.008.
123. Paulander, W., S. Maisnier-Patin, and D. Andersson. 2009. “The Fitness Cost of Streptomycin Resistance Depends on *rpsL* Mutation, Carbon Source and RpoS (SigmaS).” *Genetics* 183(2):539–546, 1SI–2SI. doi:10.1534/genetics.109.106104.
124. Pereira, M., S. Francisco, A. Varanda, M. Santos, M. Santos, and A. Soares. 2018. “Impact of tRNA Modifications and tRNA-Modifying Enzymes on Proteostasis and Human Disease.” *Int. J. Mol. Sci.* 19(12):pii:E3738. doi:10.3390/ijms19123738.
125. Persson, B., and G. Björk. 1993. “Isolation of the Gene (*miaE*) Encoding the Hydroxylase Involved in the Synthesis of 2-Methylthio-Cis-Ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and Characterization of Mutants.” *J. Bacteriol.* 175(24):7776–7785.
126. Persson, B., O. Olafsson, H. Lundgren, L. Hederstedt, and G. Björk. 1998. “The ms2io6A37 Modification of tRNA in *Salmonella typhimurium* Regulates Growth on Citric Acid Cycle Intermediates.” *J. Bacteriol.* 180(12):3144–3151.
127. Pettersson, B. Fredrik, and L. Kirsebom. 2011. “tRNA Accumulation and Suppression of the *bldA* Phenotype during Development in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 79(6):1602–1614. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07543.x.

128. Pierrel, F., T. Douki, M. Fontecave, and M. Atta. 2004. "MiaB Protein Is a Bifunctional Radical-S-Adenosylmethionine Enzyme Involved in Thiolation and Methylation of tRNA." *J. Biol. Chem.* 279(46):47555–47563. doi:10.1074/jbc.M408562200.
129. Poehlsgaard, J., and S. Douthwaite. 2005. "The Bacterial Ribosome as a Target for Antibiotics." *Nat. Rev. Microbiol.* 3(11):870–881. doi:10.1038/nrmicro1265.
130. Post, L., and M. Nomura. 1980. "DNA Sequences from the *str* Operon of *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 255(10):4660–4666.
131. Pütz, J., C. Florentz, F. Bensele, and R. Giegé. 1994. "A Single Methyl Group Prevents the Mischarging of a tRNA." *Nat. Struct. Biol.* 1(9):580–582.
132. Rebets, Y., B. Ostash, M. Fukuhara, T. Nakamura, and V. Fedorenko. 2006. "Expression of the Regulatory Protein LndI for Landomycin E Production in *Streptomyces globisporus* 1912 Is Controlled by the Availability of tRNA for the Rare UUA Codon." *FEMS Microbiol. Lett.* 256(1):30–37. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00087.x.
133. Rokytskyy, I., O. Koshla, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2016. "Decoding Options and Accuracy of Translation of Developmentally Regulated UUA Codon in *Streptomyces*: Bioinformatic Analysis." *Springerplus* 5(1):982. doi:10.1186/s40064-016-2683-6.
134. Ruusala, T., D. Andersson, M. Ehrenberg, and C. Kurland. 1984. "Hyper-Accurate Ribosomes Inhibit Growth." *EMBO J.* 3(11):2575–2580.
135. Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
136. Schumacher, M., W. Zeng, K. Findlay, M. Buttner, R. Brennan, and N. Tschowri. 2017. "The *Streptomyces* Master Regulator BldD Binds c-di-GMP Sequentially to Create a Functional BldD2-(c-di-GMP)<sub>4</sub> Complex." *Nucleic Acids Res.* 45(11):6923–6933. doi:10.1093/nar/gkx287.
137. Schweizer, U., S. Bohleber, and N. Fradejas-Villar. 2017. "The Modified



- Base Isopentenyladenosine and Its Derivatives in tRNA.” *RNA Biol.* 14(9):1197–1208. doi:10.1080/15476286.2017.1294309.
138. Sehin, Y., O. Koshla, and B. Ostash. 2018. “Streptomycete Genes Controlling Post-transcriptional Modification of tRNA with XAA Anticodons.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
139. Sehin, Y., O. Koshla, Y. Dacyuk, R. Zhao, R. Ross, M. Myronovskyi, P. Limbach, A. Luzhetskyy, S. Walker, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Gene *ssfg\_01967 (miaB)* for tRNA Modification Influences Morphogenesis and Moenomycin Biosynthesis in *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672.” *Microbiology* 165(2):233–245. doi:10.1099/mic.0.000747.
140. Senges, C., A. Al-Dilaimi, D. Marchbank, D. Wibberg, A. Winkler, B. Haltli, M. Nowrousian, J. Kalinowski, R. Kerr, and J. Bandow. 2018. “The Secreted Metabolome of *Streptomyces chartreusis* and Implications for Bacterial Chemistry.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115(10):2490–2495. doi:10.1073/pnas.1715713115.
141. Sengupta, R., S. Vainauskas, C. Yarian, E. Sochacka, A. Malkiewicz, R. Guenther, K. Koshlap, and P. Agris. 2000. “Modified Constructs of the tRNA TΨC Domain to Probe Substrate Conformational Requirements of m(1)A(58) and m(5)U(54) tRNA Methyltransferases.” *Nucleic Acids Res.* 28(6):1374–1380.
142. Sharma, D., A. Cukras, E. Rogers, D. Southworth, and R. Green. 2007. “Mutational Analysis of S12 Protein and Implications for the Accuracy of Decoding by the Ribosome.” *J. Mol. Biol.* 374(4):1065–1076. doi:10.1016/j.jmb.2007.10.003.
143. Sheeler, N., S. MacMillan, and J. Nodwell. 2005. “Biochemical Activities of the *absA* Two-Component System of *Streptomyces coelicolor*.” *J. Bacteriol.* 187(2):687–696. doi:10.1128/JB.187.2.687-696.2005.
144. Shepherd, J., and M. Ibba. 2015. “Bacterial Transfer RNAs.” *FEMS*

- Microbiol. Rev.* 39(3):280–300. doi:10.1093/femsre/fuv004.
145. Shigi, N. 2014. “Biosynthesis and Functions of Sulfur Modifications in tRNA.” *Front. Genet.* 5:67. doi:10.3389/fgene.2014.00067.
146. Shima, J., A. Hesketh, S. Okamoto, S. Kawamoto, and K. Ochi. 1996. “Induction of Actinorhodin Production by *rpsL* (Encoding Ribosomal Protein S12) Mutations That Confer Streptomycin Resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *J. Bacteriol.* 178(24):7276–7284.
147. Sun, J., A. Hesketh, and M. Bibb. 2001. “Functional Analysis of *relA* and *rshA*, Two *relA/spoT* Homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *J. Bacteriol.* 183(11):3488–3498. doi:10.1128/JB.183.11.3488-3498.2001.
148. Suzuki, T., and K. Miyauchi. 2010. “Discovery and Characterization of tRNA<sup>Ile</sup> Lysidine Synthetase (TilS).” *FEBS Lett.* 584(2):272–277. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.085.
149. Takano, E., M. Tao, F. Long, M. Bibb, L. Wang, W. Li, M. Buttner, M. Bibb, Z. Deng, and K. Chater. 2003. “A Rare Leucine Codon in *adpA* Is Implicated in the Morphological Defect of *bldA* Mutants of *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 50(2):475–486.
150. Takano, E. 2006. “ $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* Signalling Molecules Regulating Antibiotic Production and Differentiation.” *Curr. Opin. Microbiol.* 9(3):287–94. doi:10.1016/j.mib.2006.04.003.
151. Tamehiro, N., T. Hosaka, J. Xu, H. Hu, N. Otake, and K. Ochi. 2003. “Innovative Approach for Improvement of an Antibiotic-Overproducing Industrial Strain of *Streptomyces albus*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11):6412–6417.
152. Tanaka, Y., M. Komatsu, S. Okamoto, S. Tokuyama, A. Kaji, H. Ikeda, and K. Ochi. 2009. “Antibiotic Overproduction by *rpsL* and *rsmG* Mutants of Various *Actinomycetes*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 75(14):4919–4922. doi:10.1128/AEM.00681-09.
153. Tenson, T., and A. Mankin. 2006. “Antibiotics and the Ribosome.” *Mol.*

- Microbiol.* 59(6):1664–1677. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05063.x.
154. Trepanier, N., D. Alexander, S. Jensen, and B. Leskiw. 2002. “The Positive Activator of Cephamycin C and Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus* Is Mistranslated in a *bldA* Mutant.” *Microbiology* 148(3):643–656. doi:10.1099/00221287-148-3-643.
155. Tu, Q., J. Herrmann, S. Hu, R. Raju, X. Bian, Y. Zhang, and R. Müller. 2016. “Genetic Engineering and Heterologous Expression of the Disorazol Biosynthetic Gene Cluster via Red/ET Recombineering.” *Sci. Rep.* 6:21066. doi:10.1038/srep21066.
156. Uguru, G., K. Stephens, J. Stead, J. Towle, S. Baumberg, and K. McDowall. 2005. “Transcriptional Activation of the Pathway-Specific Regulator of the Actinorhodin Biosynthetic Genes in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 58(1):131–150. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04817.x.
157. Urem, M., M. Świątek-Połatyńska, S. Rigali, and G. van Wezel. 2016. “Intertwining Nutrient-Sensory Networks and the Control of Antibiotic Production in *Streptomyces*.” *Mol. Microbiol.* 102(2):183–195. doi:10.1111/mmi.13464.
158. Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. Fitzgerald, K. Chater, and D. van Sinderen. 2007. “Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3):495–548. doi:10.1128/MMBR.00005-07.
159. Vold, B., J. Lazar, and A. Gray. 1979. “Characterization of a Deficiency of N6-(Delta 2-Isopentenyl)-2-Methylthioadenosine in the *Escherichia coli* Mutant *trpX* by Use of Antibodies to N6-(Delta 2-Isopentenyl)Adenosine.” *J. Biol. Chem.* 254(15):7362–7367.
160. Waksman, S., and A. Henrici. 1943. “The Nomenclature and Classification of the *Actinomycetes*.” *J. Bacteriol.* 46(4):337–341.
161. Wang, G., T. Inaoka, S. Okamoto, and K. Ochi. 2009. “A Novel Insertion Mutation in *Streptomyces coelicolor* Ribosomal S12 Protein Results in

- Paromomycin Resistance and Antibiotic Overproduction.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(3):1019–1026. doi:10.1128/AAC.00388-08.
162. Wang, R., Y. Mast, J. Wang, W. Zhang, G. Zhao, W. Wohlleben, Y. Lu, and W. Jiang. 2013. “Identification of Two-Component System AfsQ1/Q2 Regulon and Its Cross-Regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 87(1):30–48. doi:10.1111/mmi.12080.
163. Wendt-Pienkowski, E., Y. Huang, J. Zhang, B. Li, H. Jiang, H. Kwon, C. Hutchinson, and B. Shen. 2005. “Cloning, Sequencing, Analysis, and Heterologous Expression of the Fredericamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces griseus*.” *J. Am. Chem. Soc.* 127(47):16442–16452. doi:10.1021/ja054376u.
164. White, J., and M. Bibb. 1997. “*bldA* Dependence of Undecylprodigiosin Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Involves a Pathway-Specific Regulatory Cascade.” *J. Bacteriol.* 179(3):627–633.
165. Whitman, W., M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki, and A. Parte, eds. 2012. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria*. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag New York. doi:10.1007/978-0-387-68233-4.
166. Wietzorrek, A., and M. Bibb. 1997. “A Novel Family of Proteins That Regulates Antibiotic Production in Streptomycetes Appears to Contain an OmpR-like DNA-Binding Fold.” *Mol. Microbiol.* 25(6):1181–1184.
167. Willemse, J., A. Mommaas, and G. van Wezel. 2012. “Constitutive Expression of *ftsZ* Overrides the *whi* Developmental Genes to Initiate Sporulation of *Streptomyces coelicolor*.” *Antonie Van Leeuwenhoek* 101(3):619–632. doi:10.1007/s10482-011-9678-7.
168. Wolanski, M., D. Jakimowicz, and J. Zakrzewska-Czerwinska. 2012. “AdpA, Key Regulator for Morphological Differentiation Regulates Bacterial Chromosome Replication.” *Open Biol.* 2(7):120097–120097. doi:10.1098/rsob.120097.

169. Wolański, M., R. Donczew, A. Kois-Ostrowska, P. Masiewicz, D. Jakimowicz, and J. Zakrzewska-Czerwińska. 2011. “The Level of AdpA Directly Affects Expression of Developmental Genes in *Streptomyces coelicolor*.” *J. Bacteriol.* 193(22):6358–6365. doi:10.1128/JB.05734-11.
170. Xu, W., J. Huang, R. Lin, J. Shi, and S. Cohen. 2010. “Regulation of Morphological Differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) Cleavage of mRNA Encoding the AdpA Transcription Factor.” *Mol. Microbiol.* 75(3):781–791. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07023.x.
171. Yacoubi, B. El, B. Lyons, Y. Cruz, R. Reddy, B. Nordin, F. Agnelli, J. R. Williamson, P. Schimmel, M. A. Swairjo, and V. de Crecy-Lagard. 2009. “The Universal YrdC/Sua5 Family Is Required for the Formation of Threonylcarbamoyladenine in tRNA.” *Nucleic Acids Res.* 37(9):2894–2909. doi:10.1093/nar/gkp152.
172. Yacoubi, B. El, M. Bailly, and V. de Crécy-Lagard. 2012. “Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs.” *Annu. Rev. Genet.* 46(1):69–95. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155641.
173. Yu, Z., H. Zhu, F. Dang, W. Zhang, Z. Qin, S. Yang, H. Tan, Y. Lu, and W. Jiang. 2012. “Differential Regulation of Antibiotic Biosynthesis by DraR-K, a Novel Two-Component System in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* 85(3):535–556. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08126.x.
174. Yushchuk, O., I. Ostash, I. Vlasiuk, T. Gren, A. Luzhetskyy, J. Kalinowski, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2018. “Heterologous AdpA Transcription Factors Enhance Landomycin Production in *Streptomyces cyanogenus* S136 under a Broad Range of Growth Conditions.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(19):8419–8428. doi:10.1007/s00253-018-9249-1.
175. Zaburanyi, N., M. Rabyk, B. Ostash, V. Fedorenko, and A. Luzhetskyy. 2014. “Insights into Naturally Minimised *Streptomyces albus* J1074 Genome.” *BMC Genomics* 15(1):97. doi:10.1186/1471-2164-15-97.
176. Zhang, W., B. Collinet, L. Perrochia, D. Durand, and H. van Tilbeurgh.

2015. “The ATP-Mediated Formation of the YgjD–YeaZ–YjeE Complex Is Required for the Biosynthesis of tRNA t6A in *Escherichia coli*.” *Nucleic Acids Res.* 43(3):1804–1817. doi:10.1093/nar/gku1397.
177. Zimmermann, L., A. Stephens, S.-Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. Lupas, and V. Alva. 2018. “A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core.” *J. Mol. Biol.* 430(15):2237–2243. doi:10.1016/j.jmb.2017.12.007.
178. Борис, О., та О. Кошла. 2017. “Антибіотична активність штамів *Streptomyces albus* SAM2, меродиплоїдних за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.
179. Борис, О., О. Кошла, та Б. Остап. 2018. “Синтез антибіотиків штамми *Streptomyces albus*, що містять *rpsL* мутації отримані за допомогою спонтанного мутагенезу та генетичної інженерії.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.
180. Кошла, О., та Б. Остап. 2017. Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074. Патент України на корисну модель № 120622, подано Травень 29, 2017 та опубліковано Листопад 10, 2017.
181. Кравець, В., та О. Кошла. 2017. “Деякі властивості мутантних штамів *Streptomyces albus* SAM2 за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1
182. Кравець, В., О. Кошла, та Б. Остап. 2018. “Деякі властивості *miaA*- та *miaB*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.
183. Кравець В., Б. Остап, та О. Кошла. 2019. “Властивості *mia*-мутантів

- Streptomyces albus* SAM2.” Збірник тез доповідей XV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 9–11.
184. Рокицький, І., та О. Кошла. 2016. “Декодування та точність трансляції лейцинового кодону ТГА у стрептоміцетів: аналіз *in silico*.” Збірник тез доповідей XII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 19–21.
185. ———. 2017. “Методи дослідження вживання кодонів в геномах *Streptomyces*.” Збірник тез доповідей XIII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 25–27.
186. Федоренко, В., Б. Остап, М. Гончар, та Ю. Ребець. 2007. *Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів*. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка.

## Додаток А

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ

## Наукові статті

1. Rokytskyu, I., **O. Koshla**, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2016. “Decoding Options and Accuracy of Translation of Developmentally Regulated UUA Codon in *Streptomyces*: Bioinformatic Analysis.” *SpringerPlus* 5(1):982. doi:10.1186/s40064-016-2683-6. eCollection 2016.
2. **Koshla, O.**, M. Lopatniuk, I. Rokytskyu, O. Yushchuk, Y. Dacyuk, V. Fedorenko, A. Luzhetskyu, and B. Ostash. 2017. “Properties of *Streptomyces albus* J1074 Mutant Deficient in tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> Gene *bldA*.” *Arch. Microbiol.* 199(8):1175-1183. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7.
3. **Koshla, O.**, and B. Ostash. 2018. “A Genetic Assay System to Study Mistranslation of Leucyl Codon UUA in *Streptomyces*.” *Вісник Львівського університету. Серія біологічна* 77:70–75. doi:10.30970/vlubs.2018.77.08.
4. Ostash, B., O. Yushchuk, **O. Koshla**, Y. Rebets, I. Ostash, Y. Sehin, T. Busche, J. Kalinowski, G. Muth, and V. Fedorenko. 2018. “Elucidation of the Genetic Mechanisms Contributing to Moenomycin Resistance in *Actinobacteria*.” *Фактори експериментальної еволюції організмів* 22:203–209.
5. Sehin, Y., **O. Koshla**, Y. Dacyuk, R. Zhao, R. Ross, M. Myronovskiy, P. Limbach, A. Luzhetskyu, S. Walker, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Gene *ssfg\_01967* (*miaB*) for tRNA Modification Influences Morphogenesis and Moenomycin Biosynthesis in *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672.” *Microbiology* 165(2):233–245. doi:10.1099/mic.0.000747.
6. **Koshla, O.**, I. Rokytskyu, I. Ostash, T. Busche, J. Kalinowski, E. Mösker, R. Süßmuth, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Secondary Metabolome and Transcriptome of *Streptomyces albus* J1074 in Liquid Medium SG2.” *Cytology and Genetics* 53(1):1–7.



7. **Koshla, O.**, O. Yushchuk, I. Ostash, Y. Dacyuk, M. Myronovskyi, G. Jäger, R. Süssmuth, A. Luzhetskyy, A. Byström, L. Kirsebom, and B. Ostash. 2019. “Gene *miaA* for Post-transcriptional Modification of tRNA<sub>XXXA</sub> is Important for Morphological and Metabolic Differentiation in *Streptomyces*.” *Mol. Microbiol.* 112(1):249-265. doi:10.1111/mmi.14266.

### Патент України на корисну модель

**Кошла, О.**, та Б. Осташ. 2017. Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074. Патент України на корисну модель № 120622, подано Травень 29, 2017 та опубліковано Листопад 10, 2017.

### Тези конференцій

1. Рокицький, І., та **О. Кошла**. 2016. “Декодування та точність трансляції лейцинового кодону ТТА у стрептоміцетів: аналіз *in silico*.” Збірник тез доповідей XII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 19–21.

2. Kharaton, Y., **O. Koshla**, M. Lopatniuk, Y. Sehin, O. Kuzemko, Kh. Yuskiv, I. Ostash, A. Luzhetskyy, K. Ochi, and B. Ostash. 2016. “Generation and Study of *Streptomyces albus* J1074 and *S. cyanogenus* S136 *rpsL* Merodiploid Strains.” Abstracts of XII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 19–21.

3. Рокицький, І., та **О. Кошла**. 2017. “Методи дослідження вживання кодонів в геномах *Streptomyces*.” Збірник тез доповідей XIII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 25–27.

4. **Koshla, O.**, O. Borys, and B. Ostash. 2017. “Heterologous Aranciamycin Production by *rpsL* Merodiploids of *Streptomyces albus* J1074.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.

5. **Koshla, O.**, V. Kravets, Kh. Yuskiv, and B. Ostash. 2017. “Some Properties of *Streptomyces albus* J1074 Strains Carrying *rpsL* Missense Mutation K88E.” Abstracts of XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 25–27.
6. **Koshla, O.**, I. Rokytskyu, J. Sehin, L. Kirsebom, A. Luzhetskyu, and B. Ostash. 2017. “Switch of the Switch? Posttranscriptional tRNA Modifications as Regulators in *Streptomyces* Biology.” Abstracts of EMBO conference Bacterial networks (BacNet17), Sant Feliu de Guixols, Spain, September 9-14.
7. Борис, О., та **О. Кошла**. 2017. “Антибіотична активність штамів *Streptomyces albus* SAM2, меродиплоїдних за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.
8. Кравець, В., та **О. Кошла**. 2017. “Деякі властивості мутантних штамів *Streptomyces albus* SAM2 за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.
9. **Koshla, O.**, Y. Sehin, and B. Ostash. 2018. “The Role of *miaA* and *miaB* Genes in *Streptomyces albus* SAM2 Metabolism.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
10. Sehin, Y., **O. Koshla**, and B. Ostash. 2018. “Streptomycete Genes Controlling Post-transcriptional Modification of tRNA with XAA Anticodons.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
11. Борис, О., **О. Кошла**, та Б. Осташ. 2018. “Синтез антибіотиків штамми *Streptomyces albus*, що містять *rpsL* мутації отримані за допомогою спонтанного мутагенезу та генетичної інженерії.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.

12. Кравець, В., **О. Кошла**, та Б. Осташ. 2018. “Деякі властивості *miaA*- та *miaB*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2.” Збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.
13. **Koshla, O.**, O. Yushchuk, I. Ostash, V. Kravets, R. Suessmuth, G. Jäger, A. Bystrom, B. Ostash, and V. Fedorenko. 2018. “Post-transcriptional Modifications of tRNA Modulate Secondary Metabolism of *Streptomyces*.” Program and Abstracts Book for International conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”, Lviv, October 29–31.
14. Кравець, В., Б. Осташ, та **О. Кошла**. 2019. “Властивості *mia*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2”. Збірник тез доповідей XV Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 9–11.

## Додаток Б

## Штами бактерій, використані в роботі

Штам	Характеристика	Джерело*
1	2	3
<i>Escherichia coli</i>		
GB2005	Для конструювання та селекції рекомбінантних плазмід; F <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda rpsL$ <i>nupG</i> <i>fhu::IS2</i> <i>recET</i> (Ton <sup>R</sup> )	(Fu et al. 2008; Tu et al. 2016)
WM6026	Донор в кон'югаційних схрещуваннях, підтримує <i>pir</i> -залежні реплікони, ауксотроф за діамінопімеліною кислотою; <i>lacI<sup>f</sup></i> <i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta araBAD567$ $\Delta rhaBAD568$ <i>rph-1</i> <i>attλ::pAE12</i> ( $\Delta oriR6K-cat::Frt5$ ) $\Delta endA::Frt$ <i>uidA</i> ( $\Delta mluI$ ):: <i>pir</i> <i>attHK::pJK1006</i> $\Delta(oriR6K-cat::Frt5$ <i>trfA::Frt</i> )	(Blodgett, Zhang, and Metcalf 2005)
BW25113 (pIJ790)	Штам для $\alpha$ -Red залежної рекомбінації; $\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-4)$ <i>lacIp-4000(lacI<sup>f</sup>)</i> $\lambda-rpoS369(Am)$ <i>rph-1</i> $\Delta(rhaD-rhaB)568$ <i>hsdR514</i> $\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101<sup>ts</sup></i>	(Gust et al. 2003)
<i>Streptomyces albus</i>		
SAM2	Похідний J1074 із делецією псевдо-attB сайту бактеріофага PhiC31	(Bilyk and Luzhetskyu 2014)
K88E	Похідний SAM2, несе ген <i>rpsL</i> із точковою мутацією K88E (заміна 88-го лізинового кодону на кодон глютамінової кислоти)	Проф. Лужецький А. М.
K88E_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL<sup>K88E</sup></i>	Ця робота

1	2	3
L90K_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>L90K</sup> (заміна 90-го лейцинового кодону на лізиновий)	Ця робота
R94G_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>R94G</sup> (заміна 94-го аргінінового кодону на гліциновий)	-//-
P91S_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>P91S</sup> (заміна 91-го пролінового кодону на сериновий)	-//-
R86P_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>R86P</sup> (заміна 86-го аргінінового кодону на проліновий)	-//-
K88R_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>K88R</sup> (заміна 88-го лізинового кодону на кодон аргініну)	-//-
KEPS_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>KEPS</sup> (поєднання K88E та P91S)	-//-
GI-92_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>GI-92</sup> (вставка 92-го гліцинового кодону)	-//-
KEGI_ex	Похідний SAM2, меродиплоїдний штам із внесеним алелем гена <i>rpsL</i> <sup>KEGI</sup> (поєднання K88E та GI-92)	-//-
$\Delta bldA$ (OK3)	Похідний SAM2, делеція гену <i>bldA</i> ( <i>XNR_1995</i> , <i>XNR_RS09895</i> )	-//-
$\Delta bldA+bldA$	Комплементований $\Delta bldA$ , інтегрована рTOSbldA; Am <sup>R</sup>	-//-
SAM2 рTOS	Похідний SAM2, несе порожній інтегративний вектор рTOS; Am <sup>R</sup>	-//-
SAM2 рKC1139	Похідний SAM2, несе порожній олігокопійний вектор рKC1139; Am <sup>R</sup>	-//-
SAM2 рTOSbldA	Похідний SAM2 із додатковою копією гена <i>bldA</i> з інтегративної плазмиди рTOSbldA; Am <sup>R</sup>	-//-

1	2	3
SAM2 pKCbldA	Похідний SAM2, надекспресія гена <i>bldA</i> з олігокопійної плазмиди pKCbldA; Am <sup>R</sup>	Ця робота
$\Delta miaA$	Похідний SAM2, делеція гену <i>XNR_1074 (miaA)</i>	-//-
$\Delta miaB$	Похідний SAM2, делеція гену <i>XNR_1078 (miaB)</i>	-//-
SAM2 pTES	SAM2 із інтегрованим вектором pTES; Am <sup>R</sup>	-//-
$\Delta miaA$ pTES	$\Delta miaA$ із інтегрованим вектором pTES; Am <sup>R</sup>	-//-
$\Delta miaA+1074$	Комплементований $\Delta miaA$ , інтегрована pTES1074; Am <sup>R</sup>	-//-
$\Delta miaB$ pTES	$\Delta miaB$ із інтегрованим вектором pTES; Am <sup>R</sup>	-//-
$\Delta miaB+1078$	Комплементований $\Delta miaB$ , інтегрована pTES1078; Am <sup>R</sup>	-//-
SAM2+1074	SAM2 із додатковою копією <i>XNR_1074</i> , інтегрована pTES1074; Am <sup>R</sup>	-//-
SAM2+1078	SAM2 із додатковою копією <i>XNR_1078</i> , інтегрована pTES1078; Am <sup>R</sup>	-//-
$\Delta miaB/1636::hyg$	Похідний SAM2; ген <i>XNR_1636</i> заміщений на касету стійкості до гігроміцину; Hyg <sup>R</sup>	Сегін Ю.В.
$\Delta miaA/bldA::aac$ (3)IV	Похідний $\Delta miaA$ ; ген <i>bldA</i> заміщений на касету стійкості до апраміцину; Am <sup>R</sup>	К.б.н. Ющук О. С.
$\Delta miaB/bldA::aac$ (3)IV	Похідний $\Delta miaB$ ; ген <i>bldA</i> заміщений на касету стійкості до апраміцину; Am <sup>R</sup>	-//-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC19637	Тест-культура для виявлення протибактерійної антибіотичної активності; моеноміцин-чутлива культура	АТСС
<i>Candida famata</i> VKM Y-9	Тест-культура для виявлення протигрибкової антибіотичної активності	VKM

\*посилання (якщо вказані) на основний список використаної літератури.

## Додаток В

## Плазміди і косміди, використані в роботі

Конструкт	Характеристика	Джерело*
1	2	3
pS12_K88E	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію K88E, клонований по сайтах XbaI/KpnI	Д.б.н. Остап Б. О.
pS12_P91S	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію P91S, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_R94G	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію R94G, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_R86P	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію R86P, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_L90K	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію L90K, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_K88R	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе точкову мутацію K88R, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_GI-92	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе вставку гліцинового кодону в позиції 92, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_KEPS	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе поєднання мутацій K88E та P91S, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
pS12_KEGI	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить алель гена <i>rpsL</i> , що несе поєднання мутацій K88E та GI-92, клонований по сайтах XbaI/KpnI	-//-
1N12_bldA-IMES	Sm <sup>R</sup> , Am <sup>R</sup> ; похідна штучної бактерійної хромосоми на основі pSMART (BAC_1N12) із геном <i>bldA</i> , замішеним на IMES-фланковану касету <i>aac(3)IV-oriT</i>	Лопатнюк М. М.
pUWLDre	Ap <sup>R</sup> , Tsr <sup>R</sup> ; стрептоміцетний вектор для експресії сайт-специфічної рекомбінази Dre, що впізнає <i>roxP</i> сайти	(Herrmann et al. 2012)

1	2	3
pUWLint31	Ap <sup>R</sup> , Tsr <sup>R</sup> ; стрептоміцетний вектор для експресії інтегрази фага PhiC31 ( <i>int</i> ген)	(Myronovskiy, Rosenkränzer, and Luzhetskyy 2014)
pTOSbldA	Am <sup>R</sup> ; похідна pTOS, містить ген <i>bldA</i> разом із можливим промотором, розміром 768 п.н., клонований по сайтах HindIII/XbaI	Д. б. н. Остап Б.О.
pKC1139	Am <sup>R</sup> ; реплікативний олігокопійний вектор, що містить термочутливий реплікон pSG5	(Kieser et al. 2000)
pKCbldA	Am <sup>R</sup> ; похідна pKC1139; клоновано HindIII/XbaI фрагмент з pTOSbldA розміром 768 п.н.	Ця робота
pOJ436ara	Am <sup>R</sup> ; похідна косміди pOJ436; містить кластер генів біосинтезу аранціаміцину з <i>S. echinatus</i>	(Luzhetskyy et al. 2007)
moeno38-6	Km <sup>R</sup> , Am <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> ; основана на SuperCos1, несе <i>moe</i> кластер 1 (окрім <i>moeR5moeS5</i> ), <i>intφC31-oriTRK2-hyg</i> касету, $\Delta$ <i>moeH5</i>	(Ostash et al. 2013)
pTES	Am <sup>R</sup> ; похідна pSET152; містить <i>attP</i> , фланкований сайтами <i>loxP</i> , та промотор <i>ermEp</i> , фланкований <i>tfd</i> термінаторами	(Herrmann et al. 2012)
patt-shyg	Am <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> ; плазміда із синтетичним геном <i>hyg</i> R6Kγ, фланкована сайтами B-CC та P-GG для PhiC31 інтегрази	(Myronovskiy, Rosenkränzer, and Luzhetskyy 2014)
pKC1132	Am <sup>R</sup> ; похідна pOJ260 із делецією фрагменту KpnI-SpeI; суїцидальний вектор для <i>Streptomyces</i>	(Bierman et al. 1992)
pKC1074	Am <sup>R</sup> ; похідна pKC1132, містить фрагмент з геном <i>XNR_1074</i> (розміром 4,7 тпн із геному SAM2), клонований по сайтах XbaI/EcoRI	Ця робота
pKC1078	Am <sup>R</sup> ; похідна pKC1132, містить фрагмент з геном <i>XNR_1078</i> (розміром 5,4 тпн із геному SAM2), клонований по сайтах XbaI/EcoRI	-/-
pKC1074::hyg	Am <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> ; похідна pKC1074 із заміщенням ORF гена <i>XNR_1074</i> на <i>hyg</i> касету з <i>patt-shyg</i>	-/-



1	2	3
pKC1078::hyg	Am <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> ; похідна pKC1074 із заміщенням ORF гена <i>XNR_1078</i> на <i>hyg</i> касету з <i>patt-shyg</i>	Ця робота
pTES1074	Am <sup>R</sup> ; похідна pTES з геном <i>XNR_1074</i> , клонованим по сайтах XbaI/EcoRI	-//-
pTES1078	Am <sup>R</sup> ; похідна pTES з геном <i>XNR_1078</i> , клонованим по сайтах XbaI/EcoRI	-//-
p1636::hyg	Am <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> ; похідна pKC1132, що містить фрагмент геному SAM2 із заміщенням ORF гена <i>XNR_1078</i> на <i>hyg</i> касету з <i>patt-shyg</i>	Сегін Ю.В.
pRV3	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGСумRP21, містить ТТА-вмісний (8-ий кодон) ген <i>SCO3479 (lacZ)</i> під контролем кумат-індуцибельного промотора <i>cmt-P21</i>	Рокицький І. В.
pSAGA	Am <sup>R</sup> ; похідна pSETpAm, містить ген <i>gusA</i> з pGUS, клонований по сайтах EcoRI/EcoRV, під контролем промотора <i>aac(3)IV</i>	К.б.н. Юшук О. С.
pSAGAtta	Am <sup>R</sup> ; похідна pSETpAm, містить ген <i>gusA</i> із заміщенням другого кодону CTG на ТТА, клонований по сайтах EcoRI/EcoRV, під контролем промотора <i>aac(3)IV</i>	-//-
pGM4181	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGUS, містить ген <i>XNR_4181 (adpA)</i> під контролем <i>moeE5</i> промотора	-//-
pGM4181tta-	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGUS, містить синтетичний ТТА <sup>-</sup> -ген <i>XNR_4181 (adpA)</i> під контролем <i>moeE5</i>	-//-
padpAscript	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGUS, містить злиття <i>adpAghp-gusA</i>	(Makitrynskyu et al. 2013)
padpAtransl	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGUSHL4aadA, містить <i>adpAghp-adpAgh-gusA</i> злиття через HL4 лінкер	-//-
padpAcontrol	Am <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; похідна pGUSHL4aadA, містить безпромоторне <i>adpAgh-gusA</i> злиття через HL4 лінкер	-//-

\*посилання (якщо вказані) на основний список використаної літератури.

**Додаток Г**  
**Праймери, використані в роботі**

<b>Праймер</b>	<b>Послідовність 5'-3'</b>	<b>Використання</b>
SA_bldA_XbaI_up	AAATCTAGAGCATTCGGTC ATTCTCGGTCC	Підтвердження нокауту <i>bldA</i>
SA_bldA_EcoRI_rp	AAAGAATTCCTCACGCGACC CGGAGGCTG	
1074_XbaI_up	AAATCTAGATTAGGCTCCGG GCATGCTTG	Ампліфікація 4,7 тпн фрагменту з геном <i>XNR_1074</i>
1074_EcoRI_rp	AAAGAATTCGATGCGGTGGC GGGACG	
1078_XbaI_up	AAATCTAGACGCCACCACCC ACGACATC	Ампліфікація 5,4 тпн фрагменту з геном <i>XNR_1078</i>
1078_EcoRI_rp	AAAGAATTCGGCGTTGACGA CCTCGCC	
1074_XbaI_upcl	AAATCTAGACCCCTCGGCAC CCCTCG	Клонування гена <i>XNR_1074</i>
1074_EcoRI_rpcl	AAAGAATTCGTCCCGATGCC ATCACGTG	
1078_XbaI_upcl	AAATCTAGACCATGCGGGTG ATCCTGCC	Клонування гена <i>XNR_1078</i>
1078_EcoRI_rpcl	AAAGAATTCAAGCATGCCCG GAGCCTAAC	
1074_uprd	GCCGCGCCCCCGCCCGCCGT TTGCGAGACTGGGACGGTGT TCCGGGGATCCGTCGACCC	Ампліфікація <i>hyg</i> - касети для заміщення <i>XNR_1074</i>
1074_rprd	CGATGACGGGTGGAGCGTCC CGATGCCATCACGTGATCAT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	
1078_uprd	GACGGAGCGCTCCGCCCCAG CCCTTACTCTGGACGGATGT TCCGGGGATCCGTCGACCC	Ампліфікація <i>hyg</i> - касети для заміщення <i>XNR_1078</i>
1078_rprd	CGGGCGGCGCGTGGCCCGGT CCGGGGGCGTCTCCGGTCAT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	
pattshyg_hyg_rp	GTCCGGCAGCCAGTCTTCCA G	Виявлення присутності <i>hyg</i> - касети
xnr1636_XbaIup	AAATCTAGAGGCCGTTTCGCT AGGAGACTG	Ампліфікація гена <i>XNR_1636</i>
xnr1636_EcoRIrp	AAAGAATTCTCAGGAGGCCA GGCCCAGC	

## Додаток Д

### Склад поживних середовищ

**ISP3 (г/л):** вівсяне толокно – 30; агар – 18; водопровідна вода – до 1 л; рН 7-8 (довести з 10 М NaOH).

**SFM (г/л):** соєве борошно – 20; манітол – 20; агар – 20; водопровідна вода – до 1 л; рН 7-8 (довести з 10 М NaOH).

**TM1 (г/л):** глюкоза – 20; декстрин – 80; соєве борошно – 10; рапсове толокно – 20; дріжджовий екстракт – 5; пептон – 5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5; NaCl – 1,2;  $CaCO_3$  – 5.

**MM (г/л):** L-аспарагін – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,01; глюкоза (чи інший цукор), додати після автоклавування – 10.

**SMMS (г/л):** казамінові кислоти (Difco) – 2; TES буфер – 5,73; агар – 15. Додати після автоклавування:  $NaH_2PO_4 + K_2HPO_4$  (50 мМ) – 10 мл,  $MgSO_4$  (1М) – 5 мл, глюкоза (50%) – 18 мл, розчин солей (0,1 г/л кожної:  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , NaCl) – 1 мл.

**GYM (г/л):** глюкоза – 4; дріжджовий екстракт – 4; мальтозний екстракт – 10; казамінові кислоти – 1; NaCl – 2; розчин солей (на 1 л, г:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 10,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,3,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  – 0,2,  $CaCl_2$  – 1,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,6) – 10 мл; рН 7,3 (довести з NaOH).

**R5 (г/л):** сахароза – 103;  $K_2SO_4$  – 0,25;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  – 10,12; глюкоза – 10; казамінові кислоти (Difco) – 0,1; розчин солей (на 1 л, г:  $ZnCl_2$  – 0,04,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 0,2,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0,01,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 0,01,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  – 0,01,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  – 0,01) – 2 мл; дріжджовий екстракт – 5; TES буфер – 5,73. Додати після автоклавування:  $KH_2PO_4$  (0,5%) – 10 мл,  $CaCl_2$  (5М) – 4 мл, L-пролін (20%) – 15 мл, NaOH (1 н) – 7 мл.

**TM1 (г/л):** глюкоза – 20; декстрин – 80; соєве борошно – 10; рапсове толокно – 20; дріжджовий екстракт – 5; пептон – 5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5; NaCl – 1,2;  $CaCO_3$  – 5.

**С-ще Чапека (г/л):** розчинний крохмаль – 20;  $\text{NaNO}_3$  – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MnSO}_4$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4$  – 0,001; агар – 15.

**С-ще Беннета (г/л):** глюкоза – 10; пептон – 1; дріжджовий екстракт – 1; триптон – 2; агар – 20.

**ISP5 (г/л):** L-аспарагін – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; агар – 20.

**SG1 (г/л):** глюкоза – 20; дріжджовий екстракт – 5; сойтон – 10;  $\text{CaCO}_3$  – 2; pH 7,5.

**SG2 (г/л):** як SG1, але без  $\text{CaCO}_3$ .

**TSB (г/л):** триптон – 17; гідролізат сої – 10;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,5; глюкоза – 2,5. Або концентрат TSB – 30.

**LB (г/л):** пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5;  $\text{NaCl}$  – 5; pH 7,2.

**Модифіковане мінімальне середовище для *B. cereus* (BCA, г/л):**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 7; натрію цитрат чотириводний – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1; глюкоза – 2; бакто пептон – 0,3; агар – 16.

У всіх випадках, окрім ISP3 та SFM, використовували дистильовану воду.

Якщо не вказано, агаризовані середовища готували, додаючи агар до кінцевої концентрації 15 г/л.

## Додаток Е

## Гени, що кодують тРНК стрептоміцетів

Амінокислота	Кодон, 5'-3'	Антикодон тРНК, 5'-3'	Гени тРНК				
			A(3)2*  63** SCO_#	J1074  66 XNR_	ATCC 10712 66 SVEN_	TK24  61 SLI_	ATCC 14672 67 SSFG_
1	2	3	4	5	6	7	8
Ala/A	GCU	AGC	-	-	-	-	-
	GCC	GGC	<i>t14, t15</i>	<i>RS21600,</i> <i>RS21615</i>	<i>RS11575,</i> <i>RS11600,</i> <i>RS23725</i>	<i>10014,</i> <i>10015</i>	<i>RS23155,</i> <i>RS23165</i>
	GCA	UGC	<i>t32</i>	<i>RS14980</i>	<i>RS18010</i>	<i>10033</i>	<i>RS17340,</i>
	GCG	CGC	<i>t26</i>	<i>RS10540</i>	<i>RS14945</i>	<i>10026</i>	<i>RS33025,</i> <i>RS20210</i>
Val/V	GUU	AAC	-	-	-	-	-
	GUC	GAC	<i>vala,</i> <i>valb,</i> <i>valg</i>	<i>RS26290,</i> <i>RS26295,</i> <i>RS26300</i>	<i>RS05590,</i> <i>RS05595,</i> <i>RS05600</i>	<i>10007</i>	<i>RS28215,</i> <i>RS28210,</i> <i>RS28220</i>
	GUA	UAC	<i>t10</i>	<i>RS22510</i>	<i>RS10665</i>	<i>10010</i>	<i>RS24205</i>
	GUG	CAC	<i>t01, t02</i>	<i>RS26355,</i> <i>RS26365</i>	<i>RS05525,</i> <i>RS05535</i>	<i>10003,</i> <i>10004</i>	<i>RS28310,</i> <i>RS28275,</i>
Thr/T	ACU	AGU	-	-	-	-	-
	ACA	UGU	<i>t47</i>	<i>RS12660</i>	<i>RS19730</i>	<i>10051</i>	<i>RS19050</i>
	ACC	GGU	<i>t49, t61</i>	<i>RS05540,</i> <i>RS18300</i>	<i>RS21470,</i> <i>RS26780</i>	<i>10053,</i> <i>10065</i>	<i>RS14320,</i>
	ACG	CGU	<i>t28</i>	<i>RS13365</i>	<i>RS16325</i>	<i>10029</i>	<i>RS15630</i>
Pro/P	CCU	AGG	-	-	-	-	-
	CCC	GGG	<i>t63,</i> <i>t64, t65</i>	<i>RS01030,</i> <i>RS01195</i>	<i>RS32080,</i> <i>RS32435</i>	<i>10067,</i> <i>10068,</i> <i>10069</i>	<i>RS03965,</i> <i>RS04060,</i>
	CCA	UGG	<i>t16</i>	<i>RS21415</i>	<i>RS11840</i>	<i>10016</i>	<i>RS22915</i>
	CCG	CGG	<i>t29</i>	<i>RS13575</i>	<i>RS16585</i>	<i>10030</i>	<i>RS15825</i>
Ser/S	UCU	AGA	-	-	-	-	-
	UCC	GGA	<i>t38</i>	<i>RS14180</i>	<i>RS18905</i>	<i>10039</i>	<i>RS18130</i>
	UCA	UGA	<i>t34</i>	<i>RS14415</i>	<i>RS18535</i>	<i>10035</i>	<i>RS17845</i>
	UCG	CGA	<i>t37</i>	<i>RS14300</i>	<i>RS18730</i>	<i>10038</i>	<i>RS18035</i>
	AGU	ACU	-	-	-	-	-
	AGC	GCU	<i>t35</i>	<i>RS14380</i>	<i>RS18605</i>	<i>10036</i>	<i>RS17910</i>

1	2	3	4	5	6	7	8
Phe/F	UUU	AAA	-	-	-	-	-
	UUC	GAA	<i>t42</i>	<i>RS14045</i>	<i>RS19075</i>	<i>10043</i>	<i>RS18285</i>
Leu/L	UUA	UAA	<i>bldA</i>	<i>RS09895</i>	<i>RS14290</i>	<i>10025</i>	<i>RS20685</i>
	UUG	CAA	<i>t09</i>	<i>RS24115</i>	<i>RS08060</i>	<i>10009</i>	<i>RS25860</i>
	CUU	AAG	-	-	-	-	-
	CUC	GAG	<i>t08, t62</i>	<i>RS01875,</i> <i>RS25525</i>	<i>RS02475,</i> <i>RS31620,</i> <i>RS06220</i>	<i>10008,</i> <i>10066</i>	<i>RS05545,</i> <i>RS27585</i>
	CUA	UAG	<i>t23</i>	<i>RS08810</i>	<i>RS13075</i>	<i>10022</i>	<i>RS21585</i>
	CUG	CAG	<i>t31</i>	<i>RS15090</i>	<i>RS17920</i>	<i>10032</i>	<i>RS17260</i>
Ile/I	AUU	AAU	-	-	-	-	-
	AUC	GAU	<i>t33</i>	<i>RS14945</i>	<i>RS18030</i>	<i>10034</i>	<i>RS17370</i>
	AUA	UAU	-	-	-	-	-
Met/ M	AUG	CAU	<i>t11,</i> <i>t46,</i> <i>t50,</i> <i>t52, t53</i>	<i>RS07920,</i> <i>RS07930,</i> <i>RS12430,</i> <i>RS13970,</i> <i>RS18305,</i> <i>RS22130</i>	<i>RS11055,</i> <i>RS19140,</i> <i>RS21475,</i> <i>RS24115</i>	<i>10011,</i> <i>10047,</i> <i>10054,</i> <i>10056,</i> <i>10057</i>	<i>RS11885,</i> <i>RS14315,</i> <i>RS11875,</i> <i>RS18340,</i> <i>RS23665</i>
Tyr/Y	UAU	AUA	-	-	-	-	-
	UAC	GUA	<i>t48</i>	<i>RS18280</i>	<i>RS21455</i>	<i>10052</i>	<i>RS14340</i>
His/H	CAU	AUG	-	-	-	-	-
	CAC	GUG	<i>t19</i>	<i>RS20680</i>	<i>RS12710</i>	<i>10019</i>	<i>RS00915</i>
Gln/Q	CAA	UUG	-	<i>RS10215</i>	<i>RS14570</i>	-	<i>RS20490</i>
	CAG	CUG	<i>t56, t59</i>	<i>RS06255,</i> <i>RS06270</i>	<i>RS26000,</i> <i>RS26015</i>	<i>10059,</i> <i>10062</i>	<i>RS10360,</i> <i>RS10345</i>
Asn/N	AAU	AUU	-	-	-	-	-
	AAC	GUU	<i>t12, t13</i>	<i>RS22135,</i> <i>RS22140</i>	<i>RS11060,</i> <i>RS11065</i>	<i>10012,</i> <i>10013</i>	<i>RS23655,</i> <i>RS23660</i>
Lys/L	AAA	UUU	<i>t45</i>	<i>RS14005</i>	<i>RS19115</i>	<i>10046</i>	-
	AAG	CUU	<i>t20,</i> <i>t21, t22</i>	<i>RS08530,</i> <i>RS08625,</i> <i>RS08645</i>	<i>RS12815,</i> <i>RS12845,</i> <i>RS12880</i>	<i>10020,</i> <i>10021,</i> <i>10023</i>	<i>RS21980,</i> <i>RS21890,</i> <i>RS21910</i>
Asp/D	GAU	AUC	-	-	-	-	-
	GAC	GUC	<i>t41, t43</i>	<i>RS14040,</i> <i>RS14055</i>	<i>RS19050,</i> <i>RS19080</i>	<i>10042,</i> <i>10044</i>	<i>RS18290,</i> <i>RS18275</i>
Glu/E	GAA	UUC	<i>t44</i>	<i>RS14035</i>	<i>RS19085</i>	<i>10045</i>	<i>RS18295</i>
	GAG	CUC	<i>t57,</i> <i>t58, t60</i>	<i>RS06250,</i> <i>RS06260,</i> <i>RS06265</i>	<i>RS26005,</i> <i>RS26010,</i> <i>RS26020</i>	<i>10060,</i> <i>10061,</i> <i>10063</i>	<i>RS10340,</i> <i>RS10355,</i> <i>RS10350</i>

1	2	3	4	5	6	7	8
Cys/C	UGU	ACA	-	-	-	-	-
	UGC	GCA	<i>cysT</i>	<i>RS09085</i> , <i>RS26305</i>	<i>RS13280</i> , <i>RS05585</i>	<i>10006</i>	<i>RS28225</i> , <i>RS21415</i>
Trp/W	UGG	CCA	<i>t51</i>	<i>RS18345</i>	<i>RS21530</i>	<i>10055</i>	<i>RS14265</i>
Arg/R	CGU	ACG	<i>t36</i>	<i>RS14375</i>	<i>RS18610</i>	<i>10037</i>	<i>RS17915</i>
	CGC	GCG	-	-	-	-	-
	CGA	UCG	-	-	-	-	-
	CGG	CCG	<i>t55</i>	<i>RS07355</i>	<i>RS24820</i>	<i>10058</i>	<i>RS11240</i>
	AGA	UCU	<i>t18</i>	<i>RS21075</i>	<i>RS12180</i>	<i>10018</i>	<i>RS22445</i>
	AGG	CCU	<i>t27</i>	<i>RS10805</i>	<i>RS15185</i>	<i>10027</i>	<i>RS20070</i>
Gly/G	GGU	ACC	-	-	-	-	-
	GGC	GCC	<i>t39</i> ,	<i>RS14125</i> ,	<i>RS05580</i> ,	<i>10005</i> ,	<i>RS18190</i> ,
			<i>t40</i> ,	<i>RS14150</i> ,	<i>RS18935</i> ,	<i>10040</i> ,	<i>RS18165</i> ,
			<i>glyUa</i>	<i>RS26310</i>	<i>RS18960</i>	<i>10041</i>	<i>RS28230</i>
	GGA	UCC	<i>t17</i>	<i>RS21410</i> ,	<i>RS11845</i> ,	<i>10017</i>	<i>RS02000</i> ,
			<i>RS14120</i>	<i>RS18965</i>		<i>RS18195</i> ,	
						<i>RS34410</i> ,	
						<i>RS22910</i>	
	GGG	CCC	<i>t30</i>	<i>RS15525</i>	<i>RS17010</i>	<i>10031</i>	<i>RS06925</i> ,
							<i>RS16450</i>

Примітки: \*позначення штамів: A(3)2 – *S. coelicolor* A(3)2; J1074 – *S. albus* J1074; ATCC10712 – *S. venezuelae* ATCC10712; TK24 – *S. lividans* TK24; ATCC14672 – *S. ghanaensis* ATCC14672. \*\*загальна кількість генів тРНК.

#префікс ідентифікатора гена (напр., *SCO\_t14*, *XNR\_RS21600*).