

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Ющук Олександр Сергійович

УДК 238.218.60

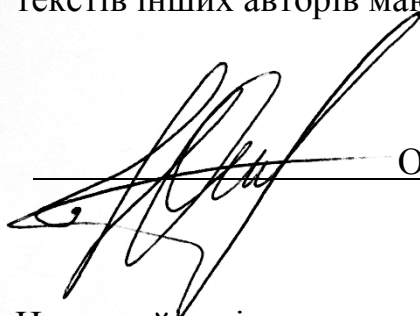
ДИСЕРТАЦІЯ
ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ БІОСИНТЕЗУ ТЕЙКОПЛАНІНУ В
ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS

03.00.22 – молекулярна генетика

09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



О.С. Ющук

Науковий керівник

Федоренко Віктор Олександрович, д.б.н., проф.

Львів - 2017

АНОТАЦІЯ

Ющук О.С. Генетичний контроль біосинтезу тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика» (09 - Біологія). – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2017.

У дисертації вивчено деякі аспекти генетичного контролю біосинтезу важливого глікопептидного антибіотика тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*, що включає в собі шлях-специфічну та глобальну регуляцію, забезпечення біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками, а також роль деяких структурних генів кластера біосинтезу тейкопланіну. Окрім цього, в дисертації вивчено життєвий цикл та морфологію продуцента тейкопланіну – *A. teichomyceticus*, а також механізми глобальної регуляції морфогенезу. На різних етапах роботи створену низку штамів-надпродуцентів тейкопланіну.

Зокрема, ми проаналізували активність ряду гетерологічних промоторів в *A. teichomyceticus* за допомогою GusA-репортерної системи. Найбільш активним виявився промотор *actII-R4p*, менш активними – промотори *aac(3)IVp*, *wblAp* та *cdaRp*. В дальшій роботі ми використали другий по силі промотор, *aac(3)IVp*, для надекспресії генів у *A. teichomyceticus*. Для перевірки його ефективності, ми ввели додаткову копію гена *frr_{AT}* (ген фактора рециклінгу рибосом) в *A. teichomyceticus* під контролем цього промотора. Така надекспресія привела до значного зростання продукції тейкопланіну.

Біосинтез тейкопланіну, як і інших глікопептидів, розпочинається із нерибосомального синтезу аглікону. Далі, до аглікону приєднуються залишки цукрів та бічний аліфатичний ланцюг. Для того, щоб дослідити функції генів, продукти яких задіяні в реакціях модифікації тейкопланінового аглікону, нами було створено ряд мутантів за генами глікозилтрансфераз *tei3** та *tei10**, та генами, продукти яких задіяні в приєднанні аліфатичного бічного ланцюга *tei13**, *tei30** та *tei11**. Базуючись

на даних аналізу похідних тейкопланіну, що продукують мутанти, ми припускаємо наступну послідовність реакцій декорування аглікону тейкопланіну. Глікозилтрансфераза *Tei10** спершу приєднує GlcNAc до тейкопланінового аглікону, утворюючи GlcNAc-AGT, що потім деацетилюється із задіянням деацетилази *Tei2**. До продукту попередньої реакції *Tei11** приєднує ацильну групу, даючи *N*-ацилглюкозамініл-AGT. Далі, *Tei1* приєднує залишок GlcNAc до 6 амінокислоти аглікону. Накінець, *Tei3** найімовірніше каталізує останню реакцію, продуктом якої є повноцінний тейкопланін, приєднуючи залишок манози до 7 амінокислотного залишку аглікону; однак, внаслідок очевидної субстратної неспецифічності *Tei3** важко встановити точне положення реакцій манозилування в послідовності реакцій декорування AGT.

Відомо, що експресія генів кластерів біосинтезу антибіотиків у актинобактерій регулюється на глобальному та шлях-специфічному рівнях. В кластері генів біосинтезу тейкопланіну є три гени шлях-специфічних регуляторів: *tei15**, *tei16** та *tei31**, що кодують StrR-, LuxR-, AfsR-подібні білки відповідно. Перші два регулятори вже досліджені та показані як ключові для біосинтезу тейкопланіну: нокаут генів *tei15** та *tei16** призводить до повного припинення біосинтезу тейкопланіну, а надекспресія цих генів має значний позитивний вплив на продукцію тейкопланіну. Про останній регулятор, *tei31**, невідомо нічого. Ми нокаутували та надекспресували ген *tei31**, проте не помітили жодних відмінностей у морфології та продукції тейкопланіну в рекомбінантних штамів. Враховуючи і те, що *tei31** не експресувався за умов продукції тейкопланіну, ми вважаємо його не задіяним в регуляції біосинтезу тейкопланіну. Також, у всіх інших послідовностях секвенованих та анотованих кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків нами не було виявлено ортологів *tei31**. Окрім цього, ми дослідили транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну та виявили 18 моногенних та поліцистронних транскрипційних одиниць. Аналізуючи експресію генів кластера біосинтезу тейкопланіну ми виявили, що транскрипція переважної більшості генів кластера біосинтезу тейкопланіну розпочинається вже на другу добу культивування, досягаючи своїх піків на третю-четверту доби. На п'яту добу експресія генів кластера

біосинтезу тейкопланіну помітно зменшується. Цікаво, що експресія *tei*-генів випереджає в часі появу тейкопланіну в культуральній рідині, яка, як відомо розпочинається на 3 добу та досягає свого піку на 5-6 доби культивування. Далі виявилось, що оперони генів резистентності, а саме *tei7-5 (vanHAX)* та *tei3-2 (vanRS)* експресуються конститутивно протягом всього дослідженого періоду часу. Більше того, експресія цих оперонів залишається незмінною в мутантах $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$. Не всі *tei*-гени експресувалися за умов продукування тейкопланіну. Як вже зазначалося, була відсутня експресія гена *tei31^**, що кодує ймовірний транскрипційний регулятор. Також не спостерігали експресії гена *tei27^** імовірної сидерофор-редуктази, яка, очевидно, не виконує жодної ролі в біосинтезі тейкопланіну; а також генів *tei25^** та *tei26^**, для яких нами було передбачено один оперон і які кодують ймовірну діоксигеназу та білок із невідомою функцією відповідно. Експресія інших транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну відрізнялася у штамів дикого типу та $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ мутантів. Варто відзначити, що у переважній більшості випадків експресія генів не зникала повністю у штамів із нокаутами шлях-специфічних регуляторів. Скоріше, рівень експресії опускався до базального. Таке спостерігали у випадку експресії генів *tei1*, *tei3^**, *tei4^**, *tei5^**, *tei8^**, *tei12^**, *tei14^**, *tei24^**, *tei29^**, *tei30^** і відповідних оперонів, до яких деякі з них входять.). Не спостерігали експресії генів *teiA* та *tei13^** у мутантів $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$. Найбільш цікавим виявився взаємозв'язок між експресією генів шлях-специфічних регуляторів. Так, в штамі із нокаутом *tei16^** не спостерігали експресію *tei15^**. Натомість, у штамі із нокаутом *tei15^**, експресія *tei16^** змінювалася порівняно з диким типом: вона не зникала повністю, але помітно зменшувалася на 92 год. Є очевидним, що експресія *tei15^** залежить від *Tei16^**.

Було встановлено роль *tei14^** та *tei24^** в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами попередниками: надекспресії цих генів вели до зростання продукції тейкопланіну. Результати досліджень *in silico* та *in vivo* показали, що DANPS та PDH, кодовані генами *tei14^** та *tei24^**, значно відрізняються від досліджених функціональних аналогів із кластера біосинтезу баліміцину. Так, *Tei14^** є DANPS І β підтипу, що характеризується унікальною тривимірною структурою. На противагу цьому, $DANPS_{secABAL}$ належить до І α підтипу та має іншу тривимірну

структуру. Відмінності було виявлено і між Tei24* та PDH_{secABAL}: у останнього був відсутнім АСТ-регуляторний домен, що ймовірно бере участь в ретроінгібуванні ферменту продуктом реакції.

Підступаючи до дослідження глобальних механізмів морфогенезу та вторинного метаболізму *A. teichomyceticus*, ми вивчили морфологію цього штаму за різних умов вирощування, а також дослідили та описали його повний життєвий цикл. Далі, на основі особливостей вживання ТТА кодону в геномі *A. teichomyceticus*, ми прийшли до висновку про відсутність AdpA-опосередкованої регуляції у *A. teichomyceticus*. Це підтверджують дані, отримані *in vivo* та *in vitro*, згідно з якими найближчі гомологи AdpA з *A. teichomyceticus* не здатні до комплементції Bld-фенотипу в *S. griseus* $\Delta adpA$ та не зв'язують операторну послідовність AdpA. Однак, надекспресія двох гомологів AdpA з *A. teichomyceticus* вела до збільшення продукції тейкопланіну. Досліджуючи два глобальні негативні регулятори BldD_{AT} та AbsB_{AT} ми показали, що вони блокують споруляцію *A. teichomyceticus* на етапі проростання спорангіофорів та на етапі формування спор відповідно. Дослідження ДНК-зв'язувальних властивостей BldD_{AT} показало, що цей білок зв'язує промоторно-операторну ділянку власного гена, а також промоторно-операторні ділянки потенційних морфогенів *sigH*_{AT} та *whiG*_{AT}. Загалом, BldD-опосередкована регуляція у *A. teichomyceticus* виявилася багато у чому подібною на таку в стрептоміцетів, хоча і біосинтез тейкопланіну є незалежним від BldD_{AT}.

Ключові слова: *Actinoplanes teichomyceticus*, глобальна регуляція, тейкопланін, глікопептидні антибіотики, шлях-специфічний регулятор, промотор, експресія, морфогенез.

Список публікацій здобувача:

1. Horbal, L., Kobylyanskyu, A., Yushchuk, O., Zaburannyi, N., Luzhetskyy, A., Ostash, B., Marinelli, F., Fedorenko, V. (2013). Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus* – producer of teicoplanin, drug of last defense. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 367-372.
2. Ostash, B., Yushchuk, O., Tistechok, S., Mutenko, H., Horbal, L., Muryn, A., Dacyuk, Y., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V. (2015). The adpA-like regulatory

- gene from *Actinoplanes teichomyceticus*: *in silico* analysis and heterologous expression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1297-1301.
3. Yushchuk, O., Horbal, L., Datsyuk, J., Stegmann, E., & Fedorenko, V. (2016). Peculiarities of *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726 morphology and life cycle. *Вісник львівського університету. Серія біологічна*, (71), 126-136.
 4. Ющук, О., Горбаль, Л., Дацюк, Ю., Осташ, Б., Штегманн, Е., Лужецький, А., & Федоренко, В. (2016). Глобальні механізми регуляції морфогенезу в спорангіальних актинобактерій. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, 192-96.
 5. Yushchuk, O., Ostash, B., Pham, T. H., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V., Truman, A. W., & Horbal, L. (2016). Characterization of the post-assembly line tailoring processes in teicoplanin biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 11(8), 2254-2264.
 6. Горбаль, Л., Ющук, О., Забуранний, Н., Кобилянський, А., Осташ, Б., Маріnellі, Ф., Лужецький, А., Федоренко, В. (2014). Генетичний інструментарій для конструювання штамів *Actinoplanes teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, 31-35.
 7. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2013, December 3-6). *bldD* cloned from *Actinoplanes teichomyceticus* blocks morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. In «*Biology: from a molecule up to the biosphere*» *Abstracts of the VIII International young scientists' conference*. Paper presented at VIII International young scientists' conference: "Biology: from a molecule up to the biosphere", Kharkiv (pp. 105-106). Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv national university. *Форма участі – очна*.
 8. Horbal, L., Kobylyankyy, A., Truman, A., Yushchuk, O., Marinelli F., Ostash, B., Luzhetskyy, A., & Fedorenko, V. (2014, April 8-11). The pathway specific regulatory genes as keys to teicoplanin overproduction in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference

of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (p. 7). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна.*

9. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2014, April 8-11). *In silico* reconstruction of putative *bld*- and *whi*-cascades analogues in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 100-101). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна.*
10. Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко В. (2016, 20 травня). Глобальні регулятори AbsB_{AT} та BldD_{AT} задіяні у регуляції морфогенезу *Actinoplanes teichomyceticus*. В *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, та біотехнології рослин і мікроорганізмів*. Тези представлені на XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», Київ (ст. 77-79). Київ: ТОВ «Алефа». *Форма участі – заочна.*
11. Yushchuk, O., Horbal, L., Stegmann, E., & Fedorenko, V. (2016, April 21). Manipulating the precursor supply to improve teicoplanin biosynthesis levels in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Topical issues of new drugs development, Vol. 1*. Paper presented at XXIII International scientific and practical conference of young scientists and students "Topical issues of new drugs development", Kharkiv (pp. 388-389). Kharkiv: NUPh. *Форма участі – очна.*
12. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2016, April 19-21). *ssgB* orthologue positively influences sporangia formation in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at XII International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 142-143). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна.*
13. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2016, May 26-27). Negative regulators AbsB_{AT} and BldD_{AT} orchestrate the expression of putative morphogenes in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Actualni problemu biochimiji ta biotehnologiji – 2016*. Paper presented at Conference-competition of young scientists "Current topics in bopchemistry and biotechnology", Kyiv (p. 68). Kyiv: SPD Popov D.V. *Форма участі – заочна.*

14. Власюк, І., Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко, В. (2017, 25-27 квітня). Гетерологічна експресія гена *rrf_{AT}* в клітинах стрептоміцетів. В *Молодь та поступ біології, збірник тез*. Тези представлені на XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь та поступ біології", Львів (ст. 101). Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка. *Форма участі – очна*.
15. Осташ, Б., Горбаль, Л., Ющук, О., Тістечок, С., Мурин, А., & Федоренко, В. (2014). Спосіб індукції синтезу нових антибіотиків у актинобактерій. Патент України на корисну модель № 94608. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.

ANNOTATION

Yushchuk O. Genetic control of teicoplanin biosynthesis in *Actinoplanes teichomyceticus*. – Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (Ph.D.) in Biology, speciality 03.00.22 – molecular genetics (09 - Biology). – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv. – SI “Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine”, Kyiv, 2017.

Several aspects of genetic control of teicoplanin biosynthesis in *Actinoplanes teichomyceticus* were studied in this thesis, including pathway-specific and global regulation, precursor supply and the role of some structural genes from teicoplanin biosynthetic gene cluster. We have also studied the peculiarities of the morphology and life cycle of teicoplanin producer *A. teichomyceticus*, as well as some mechanisms of global regulation of morphogenesis.

In particular, first we have analyzed the activity of some heterologous promoters in *A. teichomyceticus* using GusA-reporter system. These were *actII-R4p*, *aac(3)IVp*, *wblAp* and *cdaRp*. We revealed that *actII-R4p* was the most active promoter, followed by *aac(3)IVp*. The promoters *wblAp* and *cdaRp* were shown to be less active. In further work we used second active promotor – *aac(3)IVp* – for gene overexpression in *A. teichomyceticus*. As a proof of concept, we have cloned *frr_{AT}* gene (that encodes ribosome

recycling factor) under the control of *aac(3)IVp*. The *frr_{AT}* overexpression led to the improvement of teicoplanin production by the recombinant strain.

Like biosynthesis of other glycopeptides, formation of teicoplanin molecule starts with non-ribosomal synthesis of heptapeptide aglycon followed by the transfer of sugar moieties and aliphatic side chain. We took genetic approach (deletion mutant generation) to study genes for these “decoration” reactions and to establish the order of glycosylation and acylation steps. The strains with disrupted genes for glycosyltransferases *tei3** and *tei10** and those putatively involved in the addition of aliphatic side chain (*tei13**, *tei30** and *tei11**). HPLC-MS analysis of teicoplanin derivatives, produced by the generated mutants, allowed to suggest the putative sequence of teicoplanin aglycone (AGT) decoration reactions. First, glycosyltransferase *Tei10** attaches GlcNAc to the fourth amino acid of AGT, giving GlcNAc-AGT. The latter is then deacetylated with *Tei2**. This reaction is followed with the attachment of aliphatic side chain involving *Tei11** and the attachment of GlcNAc to sixth amino acid of AGT involving *Tei1*. Finally, *Tei3** attaches mannose residue to the seventh amino acid of AGT. However, our data show that *Tei3** exhibits some promiscuity towards the acceptor substrates. Thus it was impossible to determine the precise timing of the mannosylation. Obtained data could help generate novel glycopeptide compounds by means of combinatorial biosynthesis.

All glycopeptide aglyca are rich in aromatic amino acids, such as tyrosine and its derivatives. Strong demand for tyrosine as a glycopeptide building block is reflected in the content of glycopeptide biosynthetic clusters (GBCs): all of them contain genes encoding additional copies of the key enzymes of tyrosine anabolism. In particular, GBC carry genes for 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DAHPS; catalyzes initial reaction of shikimate pathway converting erythrose 4-phosphate into 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate) and prephenate dehydrogenase (PDH; converts aroenate into tyrosine). Recent experiments on balhimycin-producing *Amycolatopsis balhimycina* have shown that cluster-encoded enzymes of tyrosine biosynthesis can be used as a valuable tool for glycopeptide biosynthesis improvement. We have decided to apply the same metabolic engineering approach to *A. teichomyceticus*. To this end, there has been carried out a construction of a set of teicoplanin overproducing strains by means of precursor supply

engineering, particularly by over-expressing of DAHPSs and PDH genes in *A. teichomyceticus*. Teicoplanin biosynthesis cluster contains two genes *tei14** and *tei24** that encode DAHPS and PDH, respectively. Although *Tei14** and *Tei24** are homologous to DAHP_{sec} and PDH_{sec} encoded in balhimycin biosynthetic cluster, deeper *in silico* analysis has revealed some major differences. *Tei14** belongs to I β subtype of DAHPS, and therefore has the structure different than DAHP_{sec} (I α DAHPS). *Tei24** is an orthologue of PDH_{sec} but possesses an additional domain. This is regulatory ACT-domain, probably involved in a negative feedback inhibition of PDH with the product of its reaction, tyrosine. Since different GBCs have at their disposal two types of DAHPSs, I α and I β , and PDHs with or without ACT-domain, we have decided to overexpress all corresponding genes in *A. teichomyceticus* and to study their effects on teicoplanin production. The strain with additional copies of the *tei14** gene produced 5 times more teicoplanin reaching the concentrations of 400 mg/l; the amounts of teicoplanin for *A. teichomyceticus dahp_{sec}⁺* were in range of 250 mg/l. The over-expression of *pdh_{sec}* had no impact on teicoplanin biosynthesis, resembling the situation observed in *A. balhimycina*. Surprisingly, *A. teichomyceticus tei24*⁺* strain exhibited obvious increase in teicoplanin production levels, yielding 3 times more teicoplanin than a wild type strain (up to 350 mg/l). We can conclude that GBCs have evolved different types of DAHPSs in response to high demand for tyrosine. Despite falling into completely different subtypes of DAHPSs, DAHP_{sec} and *Tei14** both positively influence glycopeptide production. The role of PDHs in the precursor supply of antibiotic biosynthesis appears to be less important; some PDHs (like PDH_{sec} from balhimycin gene cluster) have lost their regulatory ACT-domain and became nonfunctional. However, PDH with ACT-domain has positive effect on teicoplanin biosynthesis.

The expression of antibiotic biosynthetic gene clusters is known to be regulated on global and pathway-specific levels. Teicoplanin biosynthesis gene cluster possesses three genes encoding pathway-specific regulators. These are *tei15**, *tei16** and *tei31**, coding StrR-, LuxR- and AfsR-like proteins respectively. First two regulators were already experimentally studied and shown to be crucial for teicoplanin biosynthesis. However, the role of the third one in teicoplanin biosynthesis remained obscure. We have disrupted and overexpressed *tei31**. Obtained strains had no changes in teicoplanin production and

morphology comparing to the wild type. We have also discovered that *tei31** is not expressed under teicoplanin-producing conditions. We believe that *tei31** has no role in teicoplanin biosynthesis regulation; maybe it is not a part of teicoplanin biosynthesis gene cluster at all. Next we have studied transcriptional organization of teicoplanin biosynthesis gene cluster. *In silico* and *in vitro* analysis revealed 18 mono- and polygenic transcriptional units (considering *tei31** as a part of the cluster). Overall, the expression of these transcriptional units starts on the second day of cultivation in TM1 production medium, and peaked on 3-4 day of growth. Interestingly, the expression of *tei*-genes precedes teicoplanin production, that reaches its peak on 5-6th day of cultivation. We have found that glycopeptide resistance genes *tei7-5* (*vanHAX*) and *tei3-2* (*vanRS*) are constitutively expressed over the entire growth time. Expression of *tei7-5* and *tei3-2* remained unchanged in Δ *tei15** and Δ *tei16** mutants meaning that resistance genes are not subject to pathway-specific regulation. Not all *tei*-genes were found to be expressed under teicoplanin production conditions. The genes *tei25**, *tei26** and *tei27** were found to be silent; the same was true about aforementioned *tei31**. Expression of the other transcriptional units was different in Δ *tei15** and Δ *tei16** mutants and in the wild type. We observed no expression for *teiA* and *tei13** in Δ *tei15** and Δ *tei16** mutants. The level of expression of *tei1*, *tei3**, *tei4**, *tei5**, *tei8**, *tei12**, *tei14**, *tei24**, *tei29**, *tei30** was much lower in Δ *tei15** and Δ *tei16** mutants comparing to the wild type. Also, expression of *tei15** was absent in Δ *tei16** mutant. This probably means that *Tei16** is the pathway-specific regulator of the top rank in teicoplanin biosynthetic gene cluster.

A. teichomyceticus has unique pattern of development. The latter likely involves regulatory mechanisms different from those described for *Streptomyces*, which also fall into the phylum *Actinobacteria*. Investigation of these regulatory mechanisms will shed light on sporangia formation and may give the clues about improving secondary metabolite production levels in *Micromonosporaceae* species. To date only limited information that describes morphology and the life cycle of *A. teichomyceticus* is available. In this work we undertook a detailed study of certain traits of *A. teichomyceticus* morphology by means of scanning electron microscopy and using tools of bioinformatics and molecular genetics. We managed to observe and describe stages of the *A. teichomyceticus* life cycle while growing

on different solid media. Development of *A. teichomyceticus* on the solid media starts with the germination of spores and growth of the substrate mycelium. We observed that after two days of growth on the surface of substrate mycelium aerial mycelium appears. It is known that in streptomycetes the germination of aerial hyphae is facilitated by the surfactant SapB; *A. teichomyceticus* has genetic potential to synthesize the SapB-like surfactant as well. Respective genes are expressed under sporulation conditions and are silent under conditions that do not support sporulation. Aerial hyphae grow and sporangial primordia appear on their ends. Primordia develop into mature sporangia having more than 20 μm in diameter. Wetting of the mature sporangia results in spore release. Motility of the spores is most probably achieved with involvement of a FliC flagellin. Thus, we have been able to describe the complete lifecycle of *Micromonosporaceae* family representative *A. teichomyceticus* for the first time.

We have reconstructed, *in silico*, a putative global regulatory net of teicoplanin producer through the searches for *A. teichomyceticus* orthologues of studied regulators from *Streptomyces*. We have created and studied a set of recombinant strains overexpressing *ATEI_1117*, *ATEI_0967*, *bldD_{AT}*, *absB_{AT}*, *whiG_{AT}*, *ssgB_{AT}*. We have revealed that *A. teichomyceticus* apparently lacks the AdpA-mediated regulatory system, although *adpA* homologues *ATEI_1117* and *ATEI_0967* positively influence teicoplanin production. Next, overexpression of the negative regulators *bldD_{AT}* and *absB_{AT}* affected the morphological differentiation in *A. teichomyceticus* as well as the expression of other putative morphogens, but eventually had no impact on the teicoplanin biosynthesis. Our data show that *BldD_{AT}* is able to bind the promoter region of its own and the promoter regions of some other putative morphogenetic genes. We provide evidence that product of *ssgB_{AT}* gene functionally resembles its orthologues from *Streptomyces*. Finally, we have outlined basic global regulatory mechanisms that operate in *A. teichomyceticus* and discussed their properties.

Key words: *Actinoplanes teichomyceticus*, global regulation, teicoplanin, glucopeptides, pathway-specific regulator, morphogenesis.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. Загальна характеристика глікопептидних антибіотиків як класу природних сполук.....	24
1.1.1. Структура та класифікація глікопептидних антибіотиків.....	24
1.1.2. Особливості біосинтезу глікопептидних антибіотиків.....	28
1.1.3. Механізм дії глікопептидів та механізми стійкості бактерій до них.....	34
1.2. Особливості тейкопланіну як унікального ліпоглікопептиду.....	38
1.3. Шлях-специфічна регуляція біосинтезу глікопептидних антибіотиків.....	44
1.4. Глобальна регуляція вторинного метаболізму та морфогенезу у актинобактерій.....	48
1.4.1. AdpA-опосередкована регуляція у стрептоміцетів.....	49
1.4.2. BldD – ключовий негативний регулятор <i>bld</i> - та <i>whi</i> -каскадів стрептоміцетів.....	52
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	56
2.1. Штами бактерій та плазміди.....	56
2.2. Середовище та реактиви.....	56
2.3. Методи.....	58
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	68
3.1 Створення системи для надекспресії генів в <i>A. teichomyceticus</i>	69
3.1.1. Активність гетерологічних промоторів в <i>A. teichomyceticus</i>	70
3.1.2. Надекспресія гена <i>frr_{AT}</i> в <i>A. teichomyceticus</i> із використанням плазміди pSETPA _m	73
3.2. Роль генів <i>tei3*</i> , <i>tei10*</i> , <i>tei11*</i> , <i>tei13*</i> та <i>tei30*</i> у біосинтезі тейкопланіну.....	76
3.2.1. Роль генів глікозилтрансфераз <i>tei3*</i> та <i>tei10*</i> в біосинтезі тейкопланіну.....	76

3.2.2. Роль генів, що кодують ферменти, задіяні у приєднанні аліфатичного ланцюга в процесі біосинтезу тейкопланіну.....	79
3.3. Особливості шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну у <i>A. teichomyceticus</i>	86
3.3.1. Нокаут та надекспресія гена <i>tei31*</i>	86
3.3.2. Дослідження транскрипційної організації кластера біосинтезу тейкопланіну.....	91
3.3.3. Дослідження транскрипції генів кластера біосинтезу тейкопланіну в мутантах за генами <i>tei15*</i> та <i>tei16*</i>	95
3.4. Дослідження генів, продукти яких задіяні в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками.....	103
3.4.1. Філогенетичний аналіз префенатдегідрогеназ актинобактерій.....	105
3.4.2. Вплив надекспресії генів різних префенатдегідрогеназ на біосинтез тейкопланіну в <i>A. teichomyceticus</i>	110
3.4.3. Біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей дезокси-D-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтаз актинобактерій.....	113
3.4.4. Надекспресія генів, що кодують ДАНР-синтази I α та I β підтипів в <i>A. teichomyceticus</i>	117
3.4.5. Збільшення рівня синтезу тейкопланіну шляхом зміщення метаболічного балансу між біосинтезом тирозину та фенілаланіну.....	120
3.5. Особливості морфології та життєвого циклу <i>A. teichomyceticus</i>	126
3.5.1. Мікроморфологія <i>A. teichomyceticus</i> за умов вирощування на різних агаризованих середовищах.....	126
3.5.2. Особливості життєвого циклу <i>A. teichomyceticus</i>	128
3.6. Глобальна регуляція біосинтезу тейкопланіну та морфогенезу у <i>A. teichomyceticus</i>	140
3.6.1. Пошук генів, що кодують компоненти Bld- та Whi-каскадів у геномі <i>A. teichomyceticus</i>	141
3.6.2. Дослідження AdpA-опосередкованої регуляції в <i>A. teichomyceticus in vitro</i> та <i>in vivo</i>	149

3.6.3. Роль генів глобальних негативних регуляторів <i>bldD</i> та <i>absB</i> в регуляції морфогенезу та вторинного метаболізму <i>A. teichomyceticus</i>	161
3.6.4. Надекспресія <i>ssgB_{AT}</i> індукує формування спорангіїв за умов культивування, для яких споруляція не властива.....	176
ВИСНОВКИ.....	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	185
ДОДАТКИ.....	202

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

СЕМ – сканувальна електронна мікроскопія;

ПЛР – поліміразна ланцюгова реакція;

ВЕРХ-МС – високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометрією;

МС-МС – тандемна мас-спектрометрія;

млн./т. п. н. – мільйонів/тисяч пар нуклеотидів;

НРПС – нерибосомальні поліпептид синтази;

РСР – білковий переносник аміногруп;

Hpg – 4-гідроксифенілгліцин;

Dhpg – 3,5-дигідроксифенілгліцин;

Ht – β -гідрокситирозин;

DAHPS – 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфатсинтаза;

PDH – префенатдегідрогеназа;

PDT – префенатдегідратаза;

c-di-GMP – циклічний дигуанозинмонофосфат;

GlcNAc – N-ацетилглюкозамін;

MurNAc – N-ацетилмурамова кислота;

AGT/АГТ – агліконтейкопланіну;

а. з. – амінокислотних залишків;

tei-кластер – кластер генів біосинтезу тейкопланіну.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пошук нових антибіотиків, як і подальше дослідження вже відомих, а також вивчення біології їх продуцентів, є одними з головних завдань сучасної генетики та біотехнології. Багатим джерелом антибіотиків є актинобактерії. Вони продукують більш ніж 70% антибіотиків бактерійного походження і понад 15% антибіотиків, які синтезують представники усіх царств живої природи [9]. Клас *Actinobacteria* – це велика група грам-позитивних бактерій з Г-Ц багатими геномами [127]. Для них характерне велике різноманіття життєвих форм: від простих кокоїдних або паличкоподібних, до складних міцеліальних [95]. Вторинний метаболізм та складна морфологічна диференціація актинобактерій є спряженими процесами і, принаймні у стрептоміцетів, контролюються спільними регуляторними механізмами [93].

Впродовж багатьох років основними об'єктами досліджень та джерелом антибіотиків були представники родини *Streptomycetaceae*. Проте, останнім часом все більше нових антибіотичних сполук [126, 151, 160] походять із актинобактерій інших родів, зокрема, *Micromonosporaceae* та *Pseudonocardiaceae*, які значно відрізняються від стрептоміцетів.

Глікопептиди є одним із найважливіших класів антибіотиків, а переважна більшість цих сполук продукується «нестрептоміцетними» видами актинобактерій. Це препарати вибору для лікування гострих септицемій, спричинених грам-позитивними мультирезистентними бактеріями, зокрема метицилін-резистентними штамами *Staphylococcus aureus* або *Enterococcus faecalis*. Впродовж останніх десятиліть в клініці застосовуються такі глікопептиди як ванкоміцин та тейкопланін, які продукують штами *Amycolatopsis orientalis* ATCC19795 та *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121. Незважаючи на впровадження в клініку деяких нових глікопептидів (телаванцину, далбаванцину та орітаванцину) [92, 118, 119], тейкопланін та ванкоміцин і надалі залишаються основними медичними антибіотиками цього класу. Тейкопланін менш токсичний ніж ванкоміцин та характеризується кращою фармакокінетикою [162]. Як ліпоглікопептидна сполука він у 50-100 разів більш ліпофільний ніж ванкоміцин і володіє високою тканинною

проникністю та здатністю утворювати водорозчинні солі із великим періодом напіввиведення [26]. Незважаючи на це, широке використання тейкопланіну в клініці обмежене його високою ціною, що зумовлено, зокрема, відносно низьким рівнем продукції антибіотика штамом *A. teichomyceticus*. Досі надпродуценти тейкопланіну отримували використовуючи мутагенез і селекцію [61, 62]. Нещодавні дослідження [54] показали можливість використання певних генно-інженерних методів для створення штамів із підвищеним рівнем синтезу тейкопланіну. Проте, способи створення надпродуцентів тейкопланіну далеко не вичерпані і розвиток підходів до генетичних маніпуляцій з *A. teichomyceticus* [51] відкриває широке поле для нових спроб конструювання штамів-надпродуцентів тейкопланіну.

Хоча кластер генів біосинтезу тейкопланіну секвеновано [81, 122], багато особливостей генетичного контролю його біосинтезу досі залишаються невідомими. Потребує дальших досліджень шлях-специфічна та глобальна регуляція біосинтезу тейкопланіну. Біосинтез тейкопланіну раніше досліджувався значною мірою у відриві від вивчення особливостей його продуцента – *A. teichomyceticus*, зокрема, його морфологічної диференціації, її генетичного контролю, а також зв'язків між морфогенезом і вторинним метаболізмом. Це створює перешкоди для раціональної селекції надпродуцентів тейкопланіну. Крім того, дані про глобальну регуляцію вторинного метаболізму та морфологічної диференціації в *A. teichomyceticus* можуть пролити світло на механізми цих процесів в інших нестрептоміцетних актинобактерій, насамперед у представників такої важливої у біотехнологічному відношенні родини як *Micromonosporaceae*.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчити механізми генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну в *A. teichomyceticus* NRRL B-16726. Для досягнення цієї мети поставлено такі завдання:

- 1) розробити систему надекспресії генів в *A. teichomyceticus* та вивчити активність низки гетерологічних промоторів в *A. teichomyceticus*;
- 2) вивчити роль генів, які контролюють процеси глікозилювання та ацетилювання аглікону тейкопланіну;
- 3) дослідити транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну;

- 4) вивчити особливості шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну у *A. teichomyceticus* продуктами генів *tei15**, *tei16** та *tei31**;
- 5) виявити та вивчити гени продуцентів глікопептидів, які задіяні в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками;
- 6) вивчити особливості морфології та життєвого циклу *A. teichomyceticus*;
- 7) виявити гени *A. teichomyceticus*, що кодують найближчі гомологи глобального регулятора вторинного метаболізму та морфогенезу *AdpA*, а також вивчити вплив їх надекспресії на морфологію та рівень біосинтезу тейкопланіну;
- 8) дослідити роль генів потенційних глобальних регуляторів *bldD_{AT}*, *absB_{AT}*, *whiG_{AT}* і *ssgB_{AT}*, у морфогенезі *A. teichomyceticus* і біосинтезі тейкопланіну.

Об'єкт дослідження – механізми генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну в *A. teichomyceticus*.

Предмет дослідження – регуляторні та структурні гени біосинтезу тейкопланіну.

Методи дослідження. В роботі були застосовані такі методи досліджень: мікробіологічні (вирощування штамів актиноміцетів та аналіз їхнього фенотипу, світлова мікроскопія, сканувальна електронна мікроскопія), біохімічні (виділення та очищення білків, дослідження їх ДНК-зв'язувальних властивостей *in vitro*; кількісний та якісний аналіз антибіотиків), генетичні (отримання і вивчення мутантів, генетична трансформація клітин *Escherichia coli*, кон'югаційні схрещування між *E. coli* і актиноміцетами), генно-інженерні (виділення і рестрикційний аналіз хромосомної і плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних молекул ДНК, горизонтальний гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування ДНК, Redirect рекомбініринг, виділення сумарної РНК, напівкількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією), біоінформатичні (аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, філогенетичний аналіз).

Особистий внесок здобувача. Під час виконання дисертаційної роботи автором самостійно підготовано огляд літератури та виконано особисто, або за безпосередньої участі, весь обсяг експериментальних досліджень. Автором самостійно клоновано усі регуляторні та структурні гени, описані у роботі, створено рекомбінантні плазміди,

сконструйовано штами стрептоміцетів із зміненою експресією генів. ВЕРХ-МС аналіз похідних тейкопланіну виконано у співпраці із доктором Е. Труманом (Джон Іннес Центр, Великобританія). Мікроскопічний аналіз штамів *A. teichomyceticus* та стрептоміцетів виконано спільно із к.ф.-м.н. Ю.Р. Дацюком (ЛНУ ім. І. Франка). Планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником д.б.н., проф. В.О. Федоренком, а також к.б.н. Л.О. Горбаль, д.б.н. Б.О. Осташем (ЛНУ ім. І. Франка), доктором І. Штегманн, проф. В. Волебеном (Тюбінгенський університет, Німеччина) та проф. Ф. Марінеллі (Університет Інзубрії, Італія), з якими автор має спільні публікації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в науково-дослідній лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів біологічно активних речовин (НДЛ-42) кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Роботу виконано в межах держбюджетних тем Бг-203Н «Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка» (№ держреєстрації 0103U008433, договір №Н/309-2003 від 20.04.2015, 01.01.2015-01.12.2015) та БГ-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно-активних речовин стрептоміцетами» (№ держреєстрації 0116U008070, 01.08.2016-31.07.2018); а також гранту ПНБТ-010115 «Молекулярна і клітинна біологія та біотехнологія», наданого компанією «Materials Phases Data Systems» (Швейцарія). Частина досліджень виконано під час наукового стажування в Міжфакультетському інституті мікробіології та інфекційної медицини Тюбінгенського університету (Німеччина, 2014–2015 рр.) за індивідуальним грантом DAAD (#57048249), а також під час наукового стажування на факультеті біотехнології та наук про життя університету Інзубрії (Італія, 2014 р.) за індивідуальним грантом від Consorzio Interuniversitario per le biotecnologie.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше *in vivo* досліджено функції генів *tei3**, *tei10**, *tei11**, *tei13** та *tei30**, продукти яких задіяні у реакціях глікозилування та ацилювання тейкопланінового аглікону. З'ясовано роль генів *A. teichomyceticus*, що кодують ферменти біосинтезу попередника тейкопланіну –

тирозину. Встановлено, що в кластері генів біосинтезу тейкопланіну є принаймні 17 моногенних та поліцистронних транскрипційних одиниць. Доведено, що регулятори *Tei15** та *Tei16** безпосередньо контролюють експресію генів кластера біосинтезу тейкопланіну, при чому *Tei16** позитивно регулює експресію *tei15**. Повністю описано всі етапи життєвого циклу *A. teichomyceticus*. Вперше здійснено біоінформатичну реконструкцію мережі глобальних регуляторів у *A. teichomyceticus*. На основі дослідження найближчих гомологів *AdpA* з *A. teichomyceticus* отримано докази того, що наявний у всіх стрептоміцетів *AdpA*-опосередкований регуляторний механізм відсутній у *A. teichomyceticus*. Вперше доведено, що до регуляції процесів морфогенезу нестрептоміцетної актинобактерії *A. teichomyceticus* залучені такі глобальні регулятори як *BldD*, *AbsB*, *WhiG*, *SsgB*.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані в роботі, можуть бути використані для дальшого покращення промислових штамів *A. teichomyceticus*, зокрема, шляхом створення рекомбінантних штамів із клонованими структурними і регуляторними генами біосинтезу тейкопланіну. Доведено, що надекспресія генів *rrf_{AT}*, *adpA_{AT80}*, *adpA_{AT3}*, *pdt_{AT}*, *tei14** і *tei24** веде до підвищення рівня біосинтезу тейкопланіну. Систему експресії генів основі плазмиди *pSETPA_m* можна використати для інших видів і штамів *Actinoplanes*. Виявлені і вивчені у роботі гени, продукти яких задіяні в процесах модифікації аглікону тейкопланіну, можна використати для комбінаторного біосинтезу нових глікопептидних антибіотиків. Сконструйована у роботі реплікативна олігокопійна плазміда *pKC1139Sc19*, що несе ген *adpA_{AT19}* з *A. teichomyceticus*, використана для індукування біосинтезу нових біологічно-активних сполук штамми стрептоміцетів, виділеними з ґрунту, на що отримано патент України на корисну модель.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень представлені на VIII Міжнародній конференції “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, Україна, 2009 та 2013); X та XII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ біології” (Львів, Україна, 2014 та 2016); XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ, 2016); XXIII Міжнародній науково-практичній конференції

молодих учених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2016); Міжнародній конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2016» (Київ, 2016); XI Міжнародній конференції “Фактори експериментальної еволюції організмів” (Одеса, 2016); на звітних наукових конференціях Львівського національного університету імені Івана Франка (2013-2016); звітній науковій конференції міжфакультетського Інституту мікробіології та інфекційної медицини Тюбінгенського університету (Фройденштадт, 2015). За матеріалами дисертації опубліковано шість статей, з них п’ять у фахових наукових виданнях, вісім тез доповідей на конференціях та один патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел (177 найменувань) та додатків. Роботу викладено на 229 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 66 рисунками та 12 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Філа *Actinobacteria* є однією із найбільших серед 18 в домені *Bacteria* [127]. Вона представлена грам-позитивними бактеріями із високим процентом Г-Ц пар в геномі (від 51% в *Corynebacterium genus sp.* до більш ніж 70% у *Streptomyces et Frankia generis sp.*); із різноманітною морфологією, від клітин кокоїдної і паличкоподібної форми (*Micrococcus genus sp.*, *Arthrobacter genus sp.*) до форм із фрагментованими гіфами (*Nocardia genus sp.*) та перманентним високодиференційованого міцелієм (*Streptomyces genus sp.*). Не менш різноманітними є і життєві стратегії актинобактерій: філа включає в себе облігатних патогенів, коменсалів і азотфіксуючих симбіонтів рослин, а також симбіонтів, які населяють кишково-шлунковий тракт тварин, вільноживучих мікробів, що представлені в ґрунтових, водних і наземних біотопах [95].

Міцеліальні форми актинобактерій, що належать до родин *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, мають великі геноми розміром від 6,8 [170] до 8-9 млн. п. н. [8]. У геномах закодовано багатокomпонентні регуляторні мережі, що забезпечують регуляцію морфологічної диференціації. Геноми представників цих родин насичені кластерами біосинтезу вторинних метаболітів, що включають пігменти, одоранти та антибіотики. Експресія цих кластерів регулюється як глобальними регуляторами, що також задіяні в регуляції морфологічної диференціації, так і шлях-специфічними регуляторами, що кодовані в межах самих кластерів і регулюють певний метаболічний шлях. Середньостатистичний геном представника роду *Streptomyces*, що має розмір, близький до 9 млн. п. н., містить до 30 кластерів біосинтезу вторинних метаболітів. Із них експресуються лише 10–20% [8]. Антибіотики, біосинтез яких кодується як функціональними, так і криптичними кластерами, неймовірно різноманітні, і активні проти грам-позитивних та грам-негативних патогенів. Серед них є також сполуки із фунгіцидними, інсектицидними, протираковими та іншими активностями [9].

Те, що актинобактерії є таким багатим джерелом антибіотиків, дуже важливо у світлі поширення мультирезистентних штамів патогенних бактерій. Одним із найважливіших класів антибіотиків є глікопептиди – препарати вибору для лікування гострих септицемій, спричинених грам-позитивними мультирезистентними бактеріями, особливо метицилін-резистентними штамами *Staphylococcus aureus* або *Enterococcus faecalis*. Глікопептиди інгібують синтез клітинної стінки бактерій, зв'язуючись із L-Ліз-D-Ала-D-Ала фрагментом пептидоглікану, що перешкоджає формуванню його нормальної структури [98]. Такі глікопептиди, як тейкопланін і ванкоміцин давно використовуються в клініці і довели свою ефективність.

1.1. Загальна характеристика глікопептидних антибіотиків як класу природних сполук

Глікопептиди є представниками великого класу природних сполук, що продукуються виключно представниками *Actinobacteria*. Ці сполуки мають складну хімічну природу і є різноманітними. Найчастіше штам-продуцент синтезує лише одну сполуку, рідше – суміші споріднених молекул (як у випадку тейкопланіну, про що детально буде йтися згодом). Серед глікопептидних антибіотиків зустрічаються сполуки як із протибактерійними, так і з протираковими властивостями, проте останні не становлять помітного інтересу через низьку ефективність та велику токсичність.

1.1.1. Структура та класифікація глікопептидних антибіотиків

До 1984 року було відомо лише декілька глікопептидних антибіотиків, зокрема ванкоміцин, комплекс споріднених сполук, що отримав назву тейкопланіну, рістоцетин та авопарцин. Та вже дуже скоро, на фоні зростаючої потреби в глікопептидах, клас почав наповнюватися новими представниками і зараз відомо вже понад тисячу природних і напівсинтетичних глікопептидних антибіотиків. Тим не менше, інформація про більшість цих сполук представлена лише дослідженнями їх хімічної структури. Серед добре досліджених антибіотиків, гени біосинтезу яких секвеновано та анотовано, можна назвати тільки тейкопланін [81], ванкоміцин [103,

155], баліміцин [116], рістоцетин [126, 128, 141], хлороеремоміцин [146], A40926 [123], A47934 [106]. Нещодавно було також секвеновано кластер генів біосинтезу нового глікопептиду – UK-68597 [160] (табл 1.1). У клініці використовується ще менше сполук: лише ванкоміцин та тейкопланін, доповнені нещодавно напівсинтетичними глікопептидами орїтаванцином [92], телаванцином [119] та дальбаванцином [118]. З іншого боку, в базах даних нуклеотидних послідовностей можна знайти анотовані кластери генів, що потенційно можуть кодувати біосинтез глікопептидів із невідомими структурами (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.

Деякі кластери біосинтезу глікопептидних антибіотиків

Кластер	Ідентифікатор послідовності кластера чи генома відповідного продуцента в базі даних нуклеотидних послідовностей GenBank	Сполука	Організм
1	2	3	4
<i>tei</i>	AJ632270	тейкопланін	<i>A. teichomyceticus</i> NRRL-B16726
UK-68,597	KF192710	UK-68,597	<i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 53533
<i>bal</i>	Y16952	баліміцин	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> DSM 5908
<i>vps</i>	HE589771	ванкоміцин	<i>Amycolatopsis orientalis</i> ATCC19795
<i>ris_lu</i>	KJ364518	рістоміцин (рістоцетин) A	<i>Amycolatopsis lurida</i> NRRL2430
<i>ris_ja</i>	CP008953	рістоміцин (рістоцетин) A	<i>Amycolatopsis japonica</i> MG417-CF17
<i>cep</i>	AJ223998-9	Хлороеремомі-цин	<i>A. orientalis</i> A82846
VEG	EU874252	невідома	B128 ізолянт
<i>dbv</i>	AJ561198	A40926	<i>Nonomuraea</i> sp. ATCC 39727
<i>sta</i>	STU82965	A47934	<i>Streptomyces toyocaensis</i> NRRL 15009
CA37	HM486074	невідома	метагеном

1	2	3	4
CA915	HM486076	невідома	метагеном
esnapd_15	KF264554	невідома	esnapd_15 ґрунтовий ізолянт

Структури глікопептидних антибіотиків є доволі спорідненими. Основою молекул всіх глікопептидних антибіотиків є синтезований нерибосомально гептапептидний аглікон, в якому далі формуються макроциклічні структури.

Для кращого опису структури агліконів прийнято нумерувати амінокислоти та позначати латинськими літерами ароматичні кільця амінокислот (як це показано на рис. 1.1 для баліміцину та рістоцетину). Далі, макроцикли умовно позначаються буквами ароматичних кілець, що входять до їх складу (*AB* або *C-O-D*, *F-O-G*, щоби показати кисень, який бере участь у формуванні дифенілових етерів). Базуючись на особливостях структури аглікону глікопептиди поділяють на п'ять типів (рис. 1.1, [97]). До першого типу належать такі антибіотики як ванкоміцин, баліміцин, хлороеремоміцин. Аглікони типу I складаються із двох аліфатичних та п'яти ароматичних амінокислот; для них характерна наявність трьох макроциклів (*AB*, *C-O-D*, *D-O-E*). Усі амінокислоти агліконів глікопептидів II типу ароматичні, макроцикли утворені аналогічно до агліконів типу I. До II типу належать актиноїдин, авопарцин, галакардин тощо. Глікопептиди III типу, такі як рістоцетин, а також антибіотики A47934 та UK-68597, мають додатковий *F-O-G*-макроцикл в агліконі, аналогічному до типу II. Тейкопланін та A40926 належать до типу IV. Їхні аглікони подібний до агліконів типу III, проте для антибіотиків цього типу характерні бічні аліфатичні ланцюги. Помітно відмінною є структура глікопептидів V типу, до складу агліконів яких входить триптофан. Відомо небагато глікопептидів V типу, це, зокрема, противірусні кістаміцини та протираковий комплестатин [97].

Аглікони глікопептидів I-IV типів можуть бути декорованими залишками різноманітних моносахаридів, а також галогенованими, сульфурильованими, метильованими, тощо [97]. Аглікони глікопептидів V типу можуть бути хлорованими, проте декорування залишками цукрів у них не зустрічається.

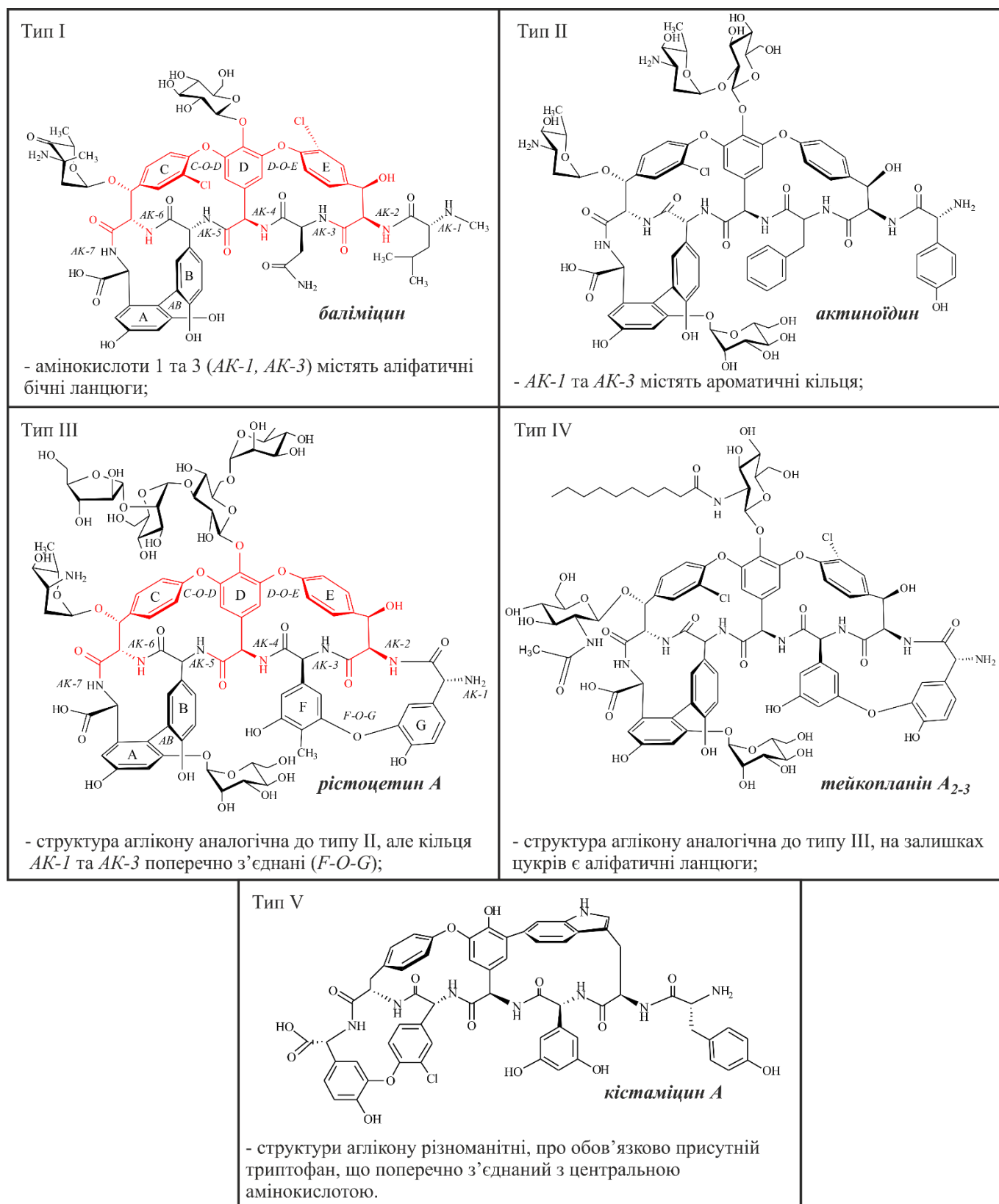


Рис. 1.1. Класифікація глікопептидних антибіотиків. На прикладах баліміцину та рістоцетину показано нумерацію амінокислот (AK) аглікону (AK-1-7, парні AK-2, 4, 6 виділено червоним) та ароматичних кілець (A-G). Позначено також макроцикли між AK-7-5 (AB), AK-6-4 (C-O-D), AK-4-2 (D-O-E), AK-3-1 (F-O-G).

Хоча глікопептиди і класифікують на V типів, існують певні передумови [31] до поділу всіх глікопептидів на класи згідно з філогенетичною спорідненістю кластерів генів їх біосинтезу, враховуючи ймовірні випадки конвергентної еволюції різних кластерів генів біосинтезу глікопептидів [31]. Однак, філогенетична класифікація кластерів генів біосинтезу глікопептидів потребує подальшого дослідження; зокрема, необхідне насичення баз даних нуклеотидних послідовностей новими кластерами генів біосинтезу глікопептидів.

Всі відомі на сьогодні продуценти глікопептидних антибіотиків належать до порядку *Actinomycetales*. Мають, найбільше продуцентів описано серед представників родин *Pseudonocardiaceae*, зокрема роду *Amycolatopsis*, та *Micromonosporaceae*, роду *Actinoplanes*. Подекуди продуценти глікопептидів зустрічаються і серед представників родів *Nocardia* і *Pseudonocardia*. Цікаво, що лише декілька глікопептидних антибіотиків продукуються стрептоміцетами, які на сьогодні є найбагатшим джерелом інших типів антибіотиків [97].

1.1.2. Особливості біосинтезу глікопептидних антибіотиків

Біосинтез глікопептидних антибіотиків включає в себе нерибосомальний синтез пептидного аглікону, до складу якого входять як протейногенні, так і непротейногенні амінокислоти. В подальшому окремі амінокислоти аглікону можуть глікозилуватися, сульфурилуватися, метилуватися чи галогенуватися. Особливості декорування агліконів глікопептидних антибіотиків впливають на їх фармакокінетичні властивості, а також на біологічну ефективність. Розглянемо детальніше основні етапи біосинтезу глікопептидів.

Нерибосомальний синтез олігопептидного кору глікопептидів. Біосинтез глікопептидних антибіотиків розпочинається із нерибосомального синтезу гептапептидного аглікону. Нерибосомальні поліпептид синтази (НРПС) – це клас багатомодульних ферментних комплексів, здатних до синтезу олігопептидів. Один модуль відповідає одній амінокислоті, яку буде включено в олігопептид. Тому послідовність олігопептиду визначається послідовністю модулів, що входять до складу НРПС [90]. Кожен модуль в свою чергу складається з доменів, серед яких

необхідно виділити: домен конденсації (K), що здатний каталізувати формування пептидного зв'язку між двома амінокислотами; домен аденілювання (A), відповідальний за розпізнавання та активацію субстрату; домен тіюлювання (T), що транспортує активовану амінокислоту від А-домену до К-домену; домен тіоестеризації (Te), що забезпечує термінацію нерибосомального синтезу та від'єднує новосинтезований олігопептид від НРПС. Важливими є також домени епімеризації (E), що при потребі переводять амінокислоту в D-форму. Ініціюючий модуль НРПС зазвичай складається із А- та Т-доменів, елонгуючі модулі містять А-, Т- та К-домени, а до складу термінуючого модуля входить Те-домен.

Серед конфігурацій генів НРПС, що задіяні у синтезі глікопептидних антибіотиків, можна виділити дві. Перша конфігурація 3/3/1 – три гени, що кодують три НРПС, перші дві з яких мають по три модулі, що відповідають за включенні трьох амінокислот, а остання – один модуль. Такою є НРПС, задіяна в біосинтезі ванкоміцину, що кодується генами *vpsA*, *vpsB*, *vpsC* (рис.1.2, а) [103]. Друга конфігурація 2/1/3/1 – перші три модулі кодуються двома різними генами (НРПС тейкопланіну – *teiA*, *teiB*, *teiC*, *teiD* [81]). Тим не менше, в кластерах генів, анотованих лише біоінформатично, можна зустріти також 1/1/1/3/1 формат кодування НРПС (НМ486076.1).

Біосинтез непротеїногенних амінокислот, що входять до складу аглікону глікопептидних антибіотиків. НРПС, задіяні в синтезі глікопептидних антибіотиків, здатні включати до складу олігопептиду як протеїногенні (тирозин, лейцин, аспарагін, аланін та глутамін), так і непротеїногенні амінокислоти 4-гідроксифенілгліцин (Hrg), 3,5-дигідроксифенілгліцин (Dhrg), β -гідрокситирозин (Ht). До складу всіх кластерів генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків входять консервативні набори ортологів, що кодують ферменти синтезу непротеїногенних амінокислот. Вони були досліджені на моделях біосинтезу баліміцину та ванкоміцину [105, 107]. У синтезі 3,5-дигідроксифенілгліцину з малоніл-КоА задіяні ферменти DrgA, B, C і D (дегідроксифенілацетат-синтаза, еноіл-КоА-гідратаза, гідроксиацилдегідрогеназа та еноіл-КоА-ізомераза відповідно) та HrgT (дигідроксифенілгліцинтрансаміназа) [105].

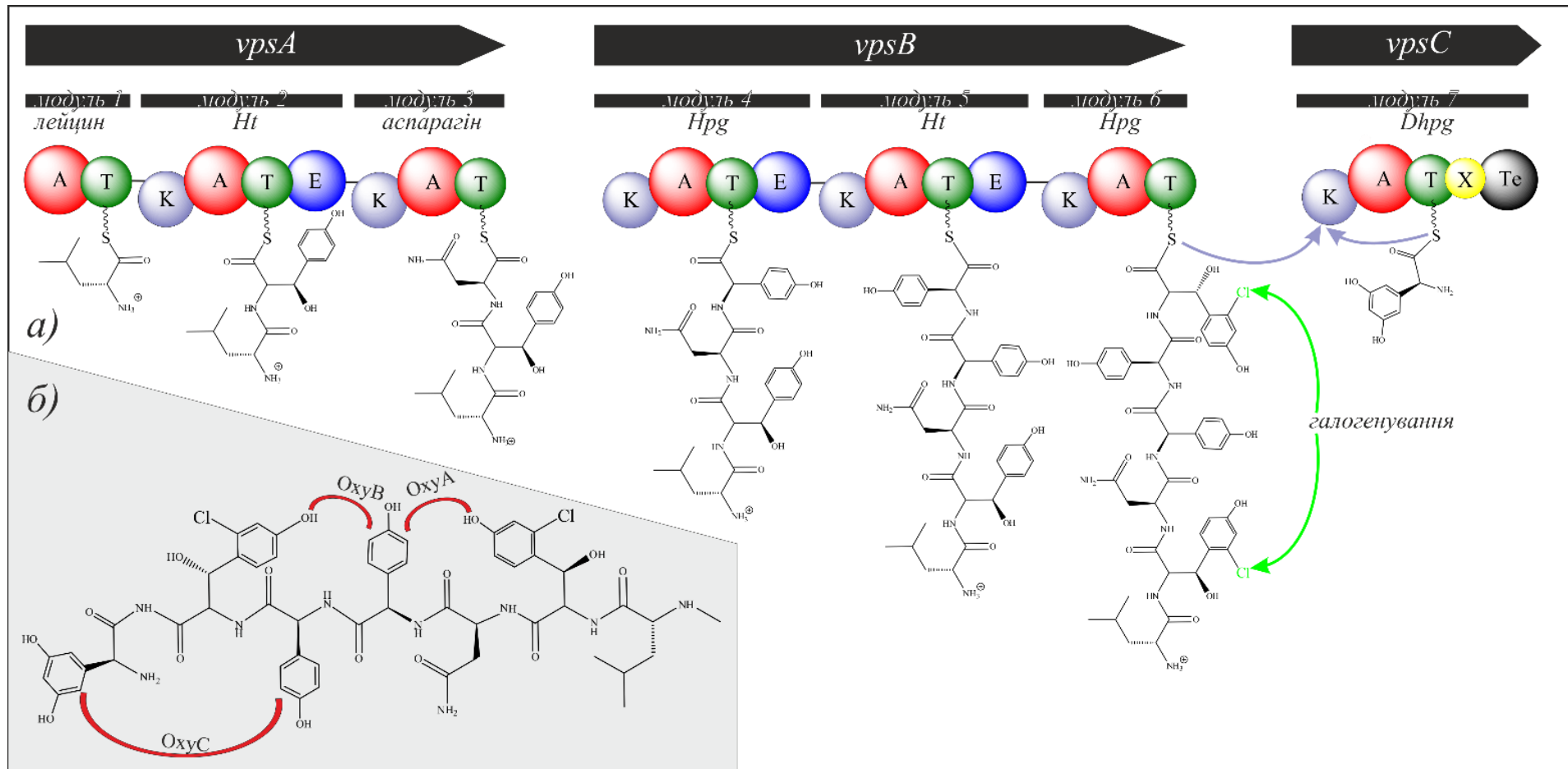


Рис. 1.2. Схема організації НРПС біосинтезу ванкоміцину та етапів біосинтезу його аглікону, що включають хлорування (а) та формування макроциклів (б), де: *vpsA-vpsC* – гени НРПС кластера біосинтезу ванкоміцину; А – домен аденілювання; Т – домен тіюлювання; К – домен конденсації; Е – домен епімеризації; Те – домен тіоестеризації; *Ht* – β -гідрокситирозин; *Hpg* – 4-гідроксифенілгліцин; *Dhpg* – 3,5-дигідроксифенілгліцин; ОхуА, ОхуВ, ОхуС – оксигенази, задіяні у макроциклізації лінійного аглікону ванкоміцину.

Синтез 4-гідроксифенілгліцину послідовно каталізують ферменти гідроксифенілпіруватдіоксигеназа HmaS, фенілгліколятоксидаза Hmo та дигідроксифенілгліцин-трансаміназа HpgT. β -гідрокситирозин синтезується за допомогою набору ферментів у складі НРПС BpsA, P450-монооксигенази OxyD та гідролази Vhr (кодуються генами з кластерів біосинтезу ванкоміцину і баліміцину) або є продуктом пізнішого гідроксилування тирозину, вже включеного в склад аглікону, за допомогою β -гідроксилаз (кодуються кластером генів біосинтезу A40926) [107].

Забезпечення біосинтезу глікопептидів попередниками. Більшість амінокислот, що входять до складу глікопептидів є похідними тирозину (Hpg, Ht); також, тирозин сам по собі є компонентом агліконів глікопептидів. Накінець, тирозин виступає донором аміногруп для Dhpg [105]. Це означає, що синтез глікопептидів значною мірою залежить від наявності вільного пулу тирозину в клітині. Потреба у високій концентрації внутрішньоклітинного тирозину задовільняється тим, що до складу всіх кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків входять гени, які кодують ключові ферменти біосинтезу тирозину. Це ортологи або гомологи генів *dahr* та *pdh* із кластера біосинтезу баліміцину. Ген *dahr* кодує 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфатсинтазу (DANPS), що каталізує першу реакцію шляху біосинтезу тирозину, утворюючи 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат із фосфоенолпірувату та D-еритрозо-4-фосфату. В свою чергу, *pdh* кодує префенат-дегідрогеназу, що каталізує завершальну реакцію шляху біосинтезу тирозину, перетворюючи префенат (і/або арогенат) у тирозин. Нещодавні дослідження показали, що *dahr* і справді відіграє ключову роль в забезпеченні біосинтезу баліміцину тирозином [137]. У той же час, функції *pdh* в кластері біосинтезу баліміцину та його ортологів із інших біосинтетичних кластерів глікопептидів залишаються нез'ясованими.

Макроциклізація аглікону глікопептидів. Після нерибосомального синтезу гептапептиду відбувається наступний важливий етап біосинтезу глікопептидних антибіотиків – формування поперечних зв'язків між бічними кільцями ароматичних амінокислот аглікону. Кількість поперечних зв'язків в глікопептидах корелює із

кількістю P450-монооксигеназ, що кодуються їх біосинтетичними кластерами. До складу кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків першого та другого типу входять гени, що кодують три оксигенази ОхуА, ОхуВ та ОхуС по числу макроциклів. Натомість, кластери біосинтезу глікопептидів третього та четвертого типів кодують додаткову монооксигеназу – ОхуЕ, що каталізує формування четвертого макроциклу. Для синтезу баліміцину в *Am. balhimycina* було показано, що оксигенази каталізують формування поперечних зв'язків послідовно: ОхуВ→ОхуА→ОхуС. ОхуА та ОхуВ каталізують утворення дифенілових етерів між АК-6-4 та АК-4-2 (С-О-Д та D-О-Е рис.1.2, б) відповідно, а ОхуС формує ковалентний зв'язок між АК-5 та АК-7 (АВ) [129]. Функцію ОхуЕ було досліджено на прикладі біосинтезу А47934. Там ця оксигеназа формує дифеніловий етер між АК-1 та АК-3 (F-О-G), функціонуючи після ОхуВ та перед ОхуА [44]. Інформацію про функції оксигеназ в біосинтезі баліміцину та А47934 можна цілком достовірно екстраполювати і на біосинтез інших глікопептидів, зокрема й тейкопланіну.

Глікозилювання агліконів глікопептидних антибіотиків. Як впливає із назви цього класу антибіотиків, їх пептидний кор глікозилюється. Для різних антибіотиків властиві різні варіанти глікозилювання. Єдиним відомим на сьогодні винятком є А47934, синтезований *S. toyocaensis*: ця сполука у завершеному вигляді є фактично агліконом і не піддається дальшому глікозилюванню [106]. У кластері відсутні відповідні гени, що кодують глікозилтрансферази. У глікопептидах найчастіше зустрічається глюкоза, приєднана до четвертого амінокислотного залишку аглікону, рідше глікозилюваний шостий амінокислотний залишок. У різних антибіотиках приєднаними до цього залишку можуть бути різні цукри: епі-ванкозамін (у хлороеремоміцині), дегідрованкозамін (баліміцині), N-ацетил-глюкозамін (тейкопланіні) [97]. У випадку тейкопланіну та А40926 манозильованою є і сьомий амінокислотний залишок аглікону [97]. Кожна реакція глікозилювання каталізується ферментом, що володіє високою специфічністю і зазвичай розпізнає як субстрат амінокислоту, яку глікозилює, а також декілька сусідніх. У випадку приєднання екзотичних цукрів, наприклад похідних ванкозаміну, гени, що кодують необхідні ферменти, також містяться в біосинтетичному кластері [81].

Ацилювання глікопептидів. Серед природних глікопептидів є два ліпоглікопептидних антибіотики – тейкопланін та A40926. Ацилювання значно підвищує протимікробні властивості цих сполук порівняно з ванкоміцином, бо ліпідні ланцюги дають змогу ліпоглікопептидам заякорюватися у клітинній мембрані бактерій. Такий позитивний вплив на протимікробну активність завдяки наявності ліпідного ланцюга було реконструйовано штучно в напівсинтетичному препараті телаванцині [119]. Ацетилтрансферази, що кодується генами біосинтетичного кластера, здатні приєднувати ацильні групи до глікозильованого Hpg-4 тейкопланіну та A40926. Ці ферменти володіють низькою субстратною специфічністю. Функція однієї такої ацилтрансферази була підтверджена експериментами із рекомбінантним білком *in vitro* для тейкопланіну [81].

Хлорування аглікону глікопептидів. Майже всі глікопептиди мають у складі свого аглікону декілька хлорованих амінокислот. Необхідність хлорування на даний момент не очевидна, хоча існують деякі припущення, що хлорування покращує димеризацію глікопептидів і, як наслідок, збільшує їхні антимікробні властивості. В кластерах біосинтезу глікопептидів є два типи флавін-залежних галогеназ, які здійснюють галогенування амінокислотних залишків вже після їх включення до складу аглікону [162]. Перший тип зазвичай галогенує Ht-6 та Tyr/Ht-2 (у тейкопланіні або ванкоміцині); другий тип додає атоми хлору до Hpg-1, Dhpg-3 та Hpg-5 (у UK-68597) [162]. Деякі кластери, зокрема кластери біосинтезу рістоміцину (KJ364518, CP008953), не містять у своєму складі генів галогеназ.

Як бачимо, кластери біосинтезу глікопептидних антибіотиків надзвичайно різноманітні та здатні забезпечувати цілий ряд модифікацій доволі стандартного аглікону. Така різноманітність генетичного потенціалу разом із відносно високим рівнем вивченості механізмів біосинтезу глікопептидів відкриває широкий простір для комбінаторного біосинтезу нових похідних. Функції багатьох ферментів синтезу та модифікації глікопептидів були з'ясовані у реакціях *in vitro*, рідше – *in vivo*. Зокрема, *in vitro* продемонстровано функції деяких глікозилтрансфераз та ацилтрансферази, задіяних у біосинтезі тейкопланіну [81]. Тим не менше, розуміння механізму біосинтезу тейкопланіну досі залишається неповним і потребує досліджень

in vivo. Такі дослідження зможуть пролити світло на послідовність реакцій біосинтезу тейкопланіну та інших глікопептидів.

1.1.3. Механізм дії глікопептидів та механізми стійкості бактерій до них

Усі глікопептидні антибіотики здатні зв'язуватися із клітинною стінкою грам-позитивних бактерій. Зв'язування відбувається із фрагментами L-Ліз-D-Ала-D-Ала пептидогліканових мономерів. Ванкоміцин, наприклад, формує п'ять визначених водневих зв'язків з L-Ліз-D-Ала-D-Ала (рис.1.3, *a*) [5]. Така нековалентна взаємодія призводить до унеможливлення процесів формування пентагліцинових поперечних містків, що зсуває динамічну рівновагу між збиранням/розбиранням клітинної стінки в сторону розбирання. Це, в свою чергу, веде до лізису та смерті клітини.

Зв'язування L-Ліз-D-Ала-D-Ала є основним проявом антибактеріальних властивостей глікопептидних антибіотиків. Тим не менше, деякі глікопептиди володіють ще й додатковими властивостями, які значно збільшують їх активність. Серед таких властивостей можна назвати здатність окремих глікопептидів до димеризації в розчинах і до заякорювання в клітинній мембрані за наявності ліпофільних ланцюгів. Так, рістоцетин А, ванкоміцин, а також деякі інші глікопептиди в розчині формують димерні комплекси, утримувані водневими зв'язками [85]. Такі димери вже володіють двома сайтами зв'язування L-Ліз-D-Ала-D-Ала, що збільшує їх антибіотичну активність. Тейкопланін, на противагу, не здатний до формування димерів. Проте, антибактерійна активність тейкопланіну все-одно залишається більшою, ніж у ванкоміцину чи рістоцетину А. Це пояснюється наявністю у тейкопланіну аліфатичного ланцюга, який заякорює антибіотик в ліпідному бішарі клітинної мембрани патогенів, локалізуючи його безпосередньо біля мішені – клітинної стінки [88].

Механізми стійкості до глікопептидних антибіотиків можна поділити на природні та набуті. Природна стійкість до глікопептидів властива штамам актинобактерій, що їх продукують, а також деяким іншим грам-позитивним бактеріям.

Усі грам-негативні бактерії, очевидно, також природно стійкі до глікопептидів. Набута стійкість до глікопептидів характерна для патогенів, проти яких глікопептиди використовуються в клінічній практиці.

У більшості випадків генетичні механізми стійкості до глікопептидів є однаковими як у випадку природної, так і набутої резистентності. Кластери генів стійкості до глікопептидів складається із двох оперонів: корових генів стійкості (*vanHAX*) та генів двохкомпонентної системи регуляторів (*vanRS*) [25, 91].

Гени двохкомпонентної системи кодують трансмембранну сенсорну гістидинкіназу VanS, що фосфорилує регулятор VanR у відповідь на появу в середовищі відповідного сигналу. Зокрема, встановлено, що для *Streptomyces coelicolor in vivo*, таким сигналом є комплекс ванкоміцину із пентапептидом клітинної стінки [76]. Фосфорильований VanR зв'язується із промоторно-опареторною ділянкою оперона *vanHAX*, запускаючи його експресію. Тим не менше, у *Am. balhimycina* та деяких інших продуцентів глікопептидів оперон *vanHAX* експресується конститутивно за відсутності VanRS [73]. Функціональні корові гени *vanHAX* кодують D-Лас дегідрогеназу VanH, що забезпечує пул необхідного субстрату для VanA, D-Ала-D-Лак-лігазу VanA та дипептидазу VanX, що розщеплює D-Ала-D-Ала, але не здатна розпізнавати модифіковані депсипептиди [91]. Таким чином, експресія *vanHAX*-оперона призводить до заміни D-Ала-D-Ала в більшості пентапептидів пептидогліканових мономерів на D-Ала-D-Лак (рис.1.3, *а*). У свою чергу афінність глікопептидів до D-Ала-D-Лак драматично (до трьох порядків) зменшується (рис.1.3, *б*).

У патогенних ентерококів окрім VanA можуть зустрічатися і інші D-Ала-D-Лак-лігази (VanB, D) [25, 147]. У цих бактерій може також функціонувати альтернативна система заміни D-Ала-D-Ала на D-Ала-D-Сер, яка включає D-Ала-D-Сер-лігази VanC, E, G та серинову рацемазу VanT за аналогією із VanA та VanH. Принципово інший механізм резистентності виявлено у *Nonomuraea sp.* ATCC 39727 –продуцента попередника дальбаванцину (антибіотика A40926). У цієї бактерії стійкість до глікопептидів забезпечується одним єдиним геном – D-Ала-D-Ала-дипептидазою VanY [12]. Як наслідок, в пептидогліканових мономерах клітинної стінки *Nonomuraea*

sp. ATCC 39727 превалюють тетрапептиди, до яких глікопептиди також мають вкрай низьку афінність.

Ймовірно, існують й інші, досі невідомі механізми стійкості до глікопептидів. Можливо, стійкість продуцентів необхідно трактувати як кумулятивну, що забезпечується сукупністю різних механізмів [73].

Ванкоміцин було затверджено до клінічного використання в 1958 році. Тоді ж почали використовувати високоефективні синтетичні бета-лактами, такі як метицилін та цефалотин, яким довгий час надавали перевагу перед ванкоміцином. Інтенсивне клінічне використання ванкоміцину почалось лише в 1970х-80х роках, і невдовзі призвело до появи резистентних патогенів: перші ванкоміцин-резистентні ентерококи виявлено в 1988. Сьогодні описано більше п'яти груп резистентних ентерококів, стійкість яких детермінується присутністю ряду кластерів *van*-генів, названих *vanA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *L*, *M*. Кластери резистентності у патогенів відповідають назвам D-Ала-D-Лак- або D-Ала-D-Сер-лігаз, що входять до їх складу. Із них найбільш поширеними є перші два [91].

Кластери *vanA* та *vanB* були вперше знайдені в *E. faecalis* та *E. faecium*. Тим не менше, деякі дані свідчать про те, що вищезгадані кластери здатні передаватися до інших родів патогенних бактерій горизонтально: так, *vanB* було знайдено в ізолятах *Streptococcus bovis*. Більше того, експериментально доведено спроможність *vanA* та *vanB* експресуватися в клітинах *S. aureus*. Тим не менше, досі не було знайдено природні мультирезистентні штами *S. aureus*, що містять кластери *vanA* та *vanB*. Кластер *vanA* забезпечує стійкість до високих концентрацій ванкоміцину (МІК, ≥ 64 мкг/мл) і до на порядок нижчих концентрацій тейкопланіну. Експресія генів цього кластера стійкості індукується присутністю в середовищі глікопептидних антибіотиків. На противагу, кластер *vanB* забезпечує стійкість лише до ванкоміцину, і його експресія не індукується за присутності тейкопланіну [91].

Менш поширеними кластерами резистентності є *vanD* та *vanE*. Перший з них виявлено в декотрих ізолятах *E. faecium*. Цей кластер забезпечує стійкість до помірних концентрацій ванкоміцину (МІК, 64–128 мг/мл) та значно нижчих концентрацій тейкопланіну (МІК, 4 мг/мл). Кластер *vanE*, описаний для *E. faecalis*, забезпечує

стійкість до низьких концентрацій ванкоміцину і не надає штамам, що його несуть, стійкості до тейкопланіну. Окремо стоїть набута стійкість до глікопептидів, що забезпечується кластером *vanC*. Ентерококи, що несуть цей кластер (зокрема *E. gallinarum* та *E. casseliflavus*) є ванкоміцин-залежними, оскільки не здатні рости за відсутності глікопептидів [91].

Підсумовуючи сказане про набуту стійкість до глікопептидів, необхідно ще раз наголосити, що вона поширилася в основному лише серед ентерококів. Тим не менше, в *S. aureus* описано так званий «проміжний» фенотип стійкості до ванкоміцину. Такий фенотип характеризується незначним збільшенням МІК і є адаптацією бактерій до постійного селективного тиску при пролонгованому використанні ванкоміцину [147].

1.2. Особливості тейкопланіну як унікального ліпоглікопептиду

Комплекс споріднених сполук, відомий під назвою тейкопланіну, продукується представником родини *Micromonosporaceae* – актиноміцетом *A. teichomyceticus*. Інші природні продуценти тейкопланіну невідомі. На сьогодні досліджено низку аспектів біосинтезу тейкопланіну та біології його продуцента, включно з оптимальними умовами ферментації та секвеновано кластер генів біосинтезу тейкопланіну [81].

Хімічна структура тейкопланіну та фармакологічні властивості. Тейкопланін було відкрито та екстраговано з культуральної рідини *A. teichomyceticus* в 1978 році [120]. Невдовзі була описана і хімічна структура комплексу тейкопланіну [24]. Всі сполуки комплексу тейкопланіну володіють майже ідентичними фармацевтичними властивостями і це створює доволі унікальну ситуацію, коли у клініці використовується суміш із багатьох компонентів. Тейкопланін використовується у клінічній практиці Європи та Японії з 1988 та 1998 років відповідно. Європейська фармакопея, щоправда, строго регламентує процентні співвідношення тейкопланінів в фармацевтичному препараті. Також, тейкопланін входить до Української фармакопеї та фармакопеї Великої Британії.

Із беззаперечних переваг тейкопланіну перед ванкоміцином можна назвати його більшу ефективність проти грам-позитивних патогенів; довший період напіввиведення (40 год порівняно з 4-5 год ванкоміцину), меншу токсичність.

Перелічені переваги забезпечуються особливостями хімічної структури тейкопланіну: глікозилювання зумовлює «непомітність» тейкопланіну для більшості сенсорних гістидин-кіназ із *van*-кластерів; наявність аліфатичного бічного ланцюга спричиняє закорювання тейкопланіну в клітинній мембрані, а також надає сполучі більшій ліпофільності, що забезпечує кращу тканинну проникність і довгий період напіввиведення [26].

Будучи ліпоглікопептидним антибіотиком, тейкопланін складається з пептидного аглікону, декорованого залишками цукрів та жирних кислот. Аглікон синтезується нерибосомально із використанням непротеїногенних амінокислот: Hrg (перша, четверта та п'ята амінокислоти); тирозину (друга); Dhrg (третя та сьома); β -гідрокситирозину (шоста). На залишках тирозину та гідрокситирозину містяться атоми хлору. Перехресні зв'язки утворюються між 1-3, 2-4, 4-6 та 5-7 амінокислотними залишками, надаючи ригідності пептидній структурі. Три залишки цукрів приєднані до арильних груп амінокислот: α -D-маноза приєднана до сьомого амінокислотного залишку; N-ацетилглюкозамін приєднаний до шостого амінокислотного залишку та β -D-глюкозамін приєднаний до четвертого амінокислотного залишку.

Залишок β -D-глюкозаміну несе на собі аліфатичний бічний радикал, представлений залишками C_{9-12} жирних кислот, що відрізняються в різних компонентів тейкопланінового комплексу довжиною та галуженням [24]. Прийнято вважати, що ці аліфатичні ланцюги походять із шляхів β -окислення жирних кислот мембранного пулу *A. teichomyceticus* [136].

За структурою цих аліфатичних бічних ланцюгів розрізняють тейкопланіни A_{2-1} – A_{2-5} та тейкопланіни від RS-1 до RS-4 (рис.1.4, а). Найбільш значущими для клінічного ефекту є саме тейкопланіни A_2 . За різних умов культивування *A. teichomyceticus* вони становлять від 89 до 95% усього тейкопланінового комплексу. Якщо в літературі зустрічається підрахунок концентрації тейкопланіну на певний об'єм ферментаційного середовища, то це сума концентрацій всіх п'яти A_2 тейкопланінів [136]. На хроматограмах екстрактів культуральної рідини *A. teichomyceticus* чітко розрізняються тейкопланіни A_{2-1} – A_{2-5} , що відрізняються часом виходу та з'являються послідовно (рис. 1.4, б).

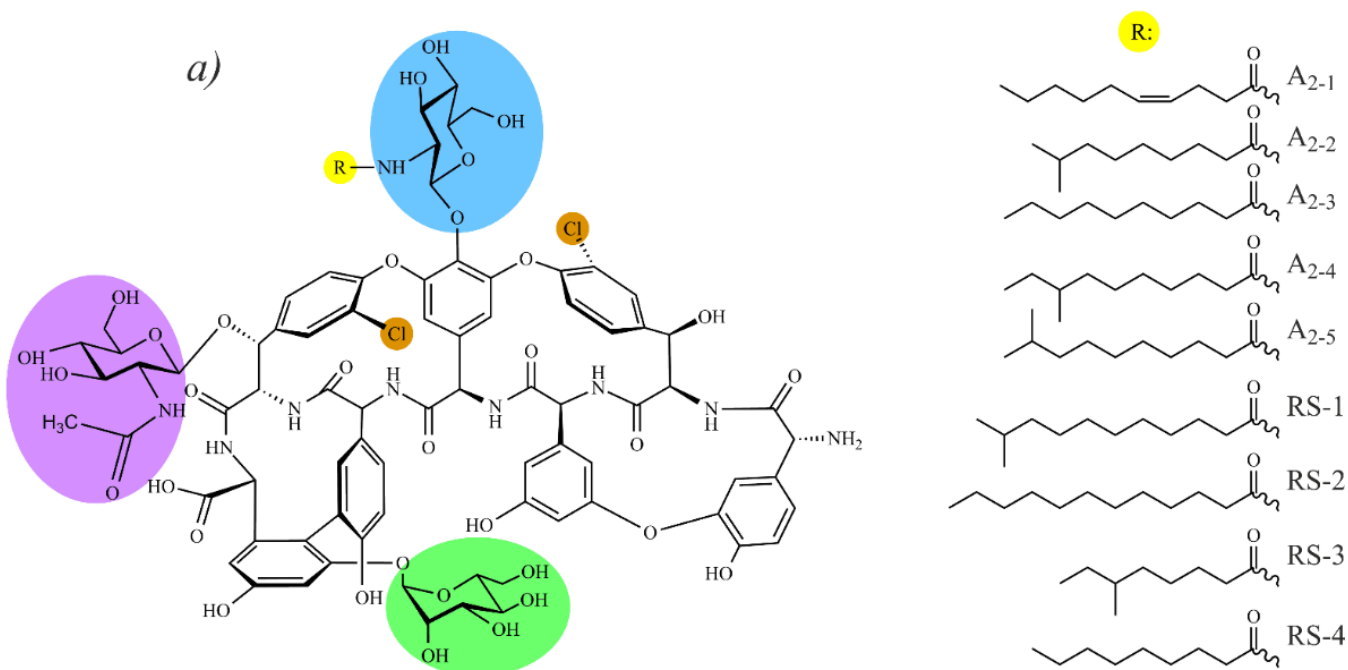


Рис. 1.4. Хімічна структура тейкопланіну (а) та вигляд хроматограми комплексу сполук тейкопланіну (б) (за [136]). Бузковим, блакитним та зеленим кольорами позначено залишки N-ацетил-глюкозаміну, D-глюкози та D-манози відповідно. Помаранчевим показано атоми хлору, а жовтим – місце приєднання бічних аліфатичних ланцюгів.

Найбільшу частку зазвичай складає тейкопланін A_{2-2} . Сполуки RS-1-4 зазвичай непомітні, або маскуються основними піками. На хроматограмах фармацевтичного препарату тейкопланіну – таргоциду – зустрічається ще один додатковий пік: тейкопланін A_{3-1} . Ця сполука є продуктом гідролізу тейкопланінів A_2 , що втратила β -D-глюкозамін із аліфатичним групами в процесі очищення і приготування фармацевтичного препарату. В екстрактах культуральної рідини вона не зустрічається [136].

Генетична організація кластера біосинтезу тейкопланіну. Кластер біосинтезу тейкопланіну секвеновано незалежно двома групами науковців. Система анотації кластера біосинтезу тейкопланіну виглядає більш раціональною в сіквенсі, опублікованому *Li et al.*, тому надалі ми будемо базуватися саме на цій анотації. Послідовності кластера біосинтезу тейкопланіну можна знайти під номерами AJ632270.1 [81] та AJ605139.1 [122] в базі даних GenBank.

Довжина секвенованої ділянки хромосоми *A. teichomyceticus*, що містить кластер біосинтезу тейкопланіну, становить 89976 п.н. Всього на цій ділянці анотовано 49 відкритих рамок зчитування (рис. 1.5). Їх пронумеровано в порядку від *tei11* до *tei1* (відкриті рамки зчитування зліва від генів НРПС), далі йдуть гени НРПС: *teiA* – *D*. Відкриті рамки зчитування справа від генів НРПС нумеровані як *tei1** – *tei34**. Границями кластера біосинтезу тейкопланіну прийнято вважати *tei8* та *tei31**, причетність інших відкритих рамок зчитування до біосинтезу тейкопланіну малоймовірна. Отже, до кластера біосинтезу тейкопланіну входить щонайменше 44 гена [81]. Щоправда, сьогодні важко щось сказати про організацію транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну, хоча із природи міжгенних ділянок стає очевидно, що до його складу входять як поліцистронні, так і моногенні транскрипційні одиниці.

Функції більшості генів, що входять до складу кластера біосинтезу тейкопланіну, можуть бути передбачені за їх ортологією до досліджених генів з інших кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Зокрема, у біосинтезі непротеїногенних амінокислот задіяні продукти генів *tei28**, *tei29**, *tei23** (біосинтез Hpg), *tei17*-20** (Dhpg), *tei12** (Ht). Гени *tei14** та *tei24** можуть відігравати роль у забезпеченні біосинтезу тейкопланіну тирозином [81].

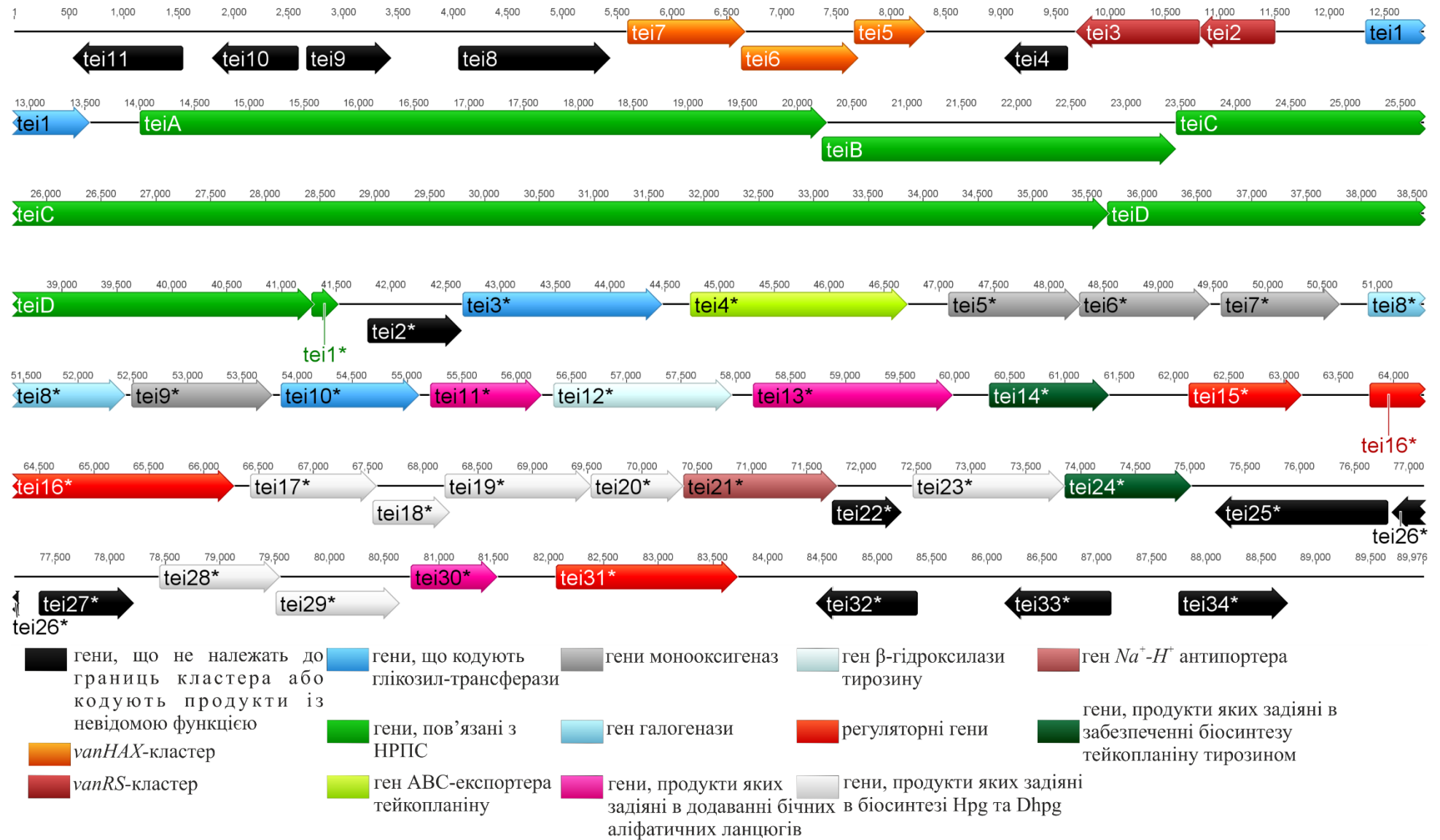


Рис. 1.5. Організація кластера генів біосинтезу тейкопланіну *A. teichomyceticus*. Однаковими кольорами показано групи генів, що мають споріднені функції.

Легко реконструюється і генетичний апарат, що кодує ферменти, необхідні для циклізації лінійного гептапептиду, це: *tei5**, *7**, *9**, *6**, які кодують ортологів ОхуА, ОхуВ, ОхуС та ОхуЕ відповідно. Кластер біосинтезу тейкопланіну містить лише один ген, що кодує галогеназу – *tei8**. В свою чергу, генів, продукти яких ймовірно задіяні в процесах глікозилювання та ацилювання тейкопланінового аглікону є доволі багато. Це *tei1*, *10**, *3** (кодують глікозилази), *tei11**, *13**, *30** (їх продукти можуть бути задіяними в приєднанні бічних аліфатичних радикалів). Стійкість забезпечується генами, що відповідають *vanHAX-* (*tei7-5*) та *vanRS-* (*tei3-2*) кластерам, а експорт тейкопланіну – АВС-транспортером, що кодується геном *tei4**. Як вже зазначалося раніше, в кластері присутні три гени, що кодують шлях-специфічні регулятори: *tei15**, *tei16** та *tei31**.

Отже, на основі аналізу кластера біосинтезу тейкопланіну можна стверджувати, що він принципово не відрізняється від інших кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Не дивлячись на те, що гени кластера кодують різноманітні ферменти модифікації аглікону, сульфурилази серед них відсутні. Хоча функції більшості генів кластера можна передбачити *in silico*, їхні дослідження *in vivo* майже не проводилися. Врешті, багато генів кластера кодують білки з невідомими функціями, ортологи яких відсутні в інших кластерах біосинтезу глікопептидних антибіотиків.

Особливості ферментативного синтезу тейкопланіну. Вже досить давно було описано повний штучний синтез тейкопланіну, що виявився складнішим, аніж біосинтез інших глікопептидів (наприклад, ванкоміцину). Цей складний багатоступінчастий процес вимагає затрат, неспівмірних із кінцевим виходом готового продукту [91] та є нестабільним. Єдиним способом промислового отримання тейкопланіну залишається біосинтез природним продуцентом *A. teichomyceticus*.

На сьогодні відомо п'ять основних живильних середовищ, що використовувалися для продукції тейкопланіну. Перші чотири були описані різними групами на різних історичних етапах дослідження синтезу тейкопланіну *A. teichomyceticus* [24, 54]. Рівень продукції тейкопланіну штамом дикого типу на

цих середовищах коливався в діапазоні 0 – 25 мг/л. Знайдено найоптимальніші джерела карбону (глюкоза у комбінації із мальтозним екстрактом) та нітрогену (соєве борошно із додаванням дріжджового екстракту) в середовищі, яке можна використовувати для продукції тейкопланіну в промислових умовах. Додавання певних концентрацій карбонату кальцію також мало позитивний вплив на рівень біосинтезу тейкопланіну штамми дикого типу. На сьогодні середовище ТМ1 є найоптимальнішим для продукції тейкопланіну. У цьому середовищі рівень продукції тейкопланіну досягав 100 мг/л при культивуванні в колбах та більше 200 мг/л при культивуванні в ферментерах малого об'єму. Додавання в ТМ1 різних жирних кислот у вигляді їх метилових естерів чи олій дало можливість модулювати співвідношення між різними компонентами Т-А₂-комплексу. Додавання до середовища L-валіну збільшувало рівень синтезу тейкопланіну до 140%. Біосинтез тейкопланіну в середовищі ТМ1 починається на 60 год росту культури та досягає піку на 140 год. Після 160 год культивування продукція тейкопланіну падає і настає частковий лізис культури [136].

1.3. Шлях-специфічна регуляція біосинтезу глікопептидних антибіотиків

У вивчених кластерах генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків завжди наявний ген, що кодує StrR-подібний шлях-специфічний регулятор. У низці кластерів крім цього гена є також ген, що кодує шлях-специфічний регулятор родини LuxR. Унікальним випадком є кластер біосинтезу тейкопланіну, який кодує ще один регуляторний білок, який містить Xre-подібний ДНК-зв'язувальний домен. На відміну від StrR- та LuxR-подібних регуляторів, роль такого Xre-подібного регулятора в біосинтезі глікопептидних антибіотиків залишається невідомою.

Регуляція біосинтезу глікопептидів StrR-подібними регуляторами. У кластерах біосинтезу ванкоміцину і подібних до нього антибіотиків таких, як баліміцин, хлороеремоміцин, рістоміцин, містяться ортологічні StrR-подібні транскрипційні активатори. Подібність їх амінокислотних послідовностей

свідчить про спільне походження та однакові функції. Оскільки на даний час методи генно-інженерних маніпуляцій із продуцентом ванкоміцину *Am. orientalis* не опрацьовані, функції цих StrR-подібних регуляторів було досліджено на моделі такого регулятора із кластера генів біосинтезу баліміцину *Am. balhimycina* – bbr (**b**alhimycin **b**iosynthesis **r**egulator) [116].

Відомо, що StrR-подібні регулятори часто виступають шлях-специфічними регуляторами кластерів біосинтезу антибіотиків (як це, наприклад, є у випадку прототипу групи – регулятора StrR біосинтезу стрептоміцину у *Streptomyces griseus* [110]). Тому було висловлено припущення про те, що й bbr може бути шлях-специфічним регулятором біосинтезу баліміцину. Це припущення підтвердилося, оскільки bbr специфічно зв'язувався із деякими промоторно-операторними ділянками кластера генів біосинтезу баліміцину, зокрема із промоторно-операторною ділянкою власного гена. Біоінформатичний аналіз досліджених промоторно-операторних ділянок генів кластера дав змогу встановити консенсусну паліндромну послідовність, необхідну для зв'язування bbr – GTCCAR(N)₁₇TTGGAC [116].

StrR-подібний регулятор Dbv4, ген якого в *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 знаходиться в кластері біосинтезу попередника дальбаванцину – антибіотика A40926, досліджено аналогічно до bbr. Він здатний зв'язуватися з деякими промоторно-операторними ділянками як генів біосинтезу A40926, так і баліміцину. Більше того, виявлено ймовірний механізм глобальної регуляції синтезу самого Dbv4: експресія *dbv4* активувалася за умов фосфатного голодування [2].

Таким чином, ортологічні Dbv4 та bbr здатні перехресно зв'язувати промоторно-операторні ділянки генів обох кластерів. Це можна пояснити тим, що обидва білки володіють більш ніж 80% ідентичністю амінокислотних послідовностей. Здатність bbr до перехресної регуляції інших кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків ще й підтверджена недавніми дослідженнями, в яких гетерологічна надекспресія гена *bbr* спричиняла зростання продукції рістоміцину А в *Amycolatopsis japonicum*. І в цьому випадку

амінокислотна послідовність StrR-подібного регулятора біосинтезу рістоміцину A майже ідентична до послідовності bbr [126].

У кластері генів біосинтезу тейкопланіну *A. teichomyceticus* ортолог bbr кодується геном *tei15**. Зважаючи на промислову важливість тейкопланіну, дослідження цього гена були насамперед спрямовані на отримання надпродуцентів тейкопланіну. І справді, штами, в яких ген *tei15** було надекспресовано, характеризувалися значним зростанням синтезу тейкопланіну [54]. Перенесення в клітини *A. teichomyceticus* олігокопійної автономної плазмиди рКС1139, яка містила ген *tei15**, збільшувало продукцію тейкопланіну у 30-40 разів. Для порівняння, надекспресія Dbv4 в *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 приводила лише до двократного зростання кількості антибіотика A40926. Нокаут гена *tei15** призводив до повного припинення біосинтезу тейкопланіну і будь-яких його попередників [51]. Доведено, що білок Tei15* здатний *in vitro* зв'язувати промоторно-операторні ділянки генів *teiA*, *tei2**, *tei16**, *tei17**, *tei27**, *tei31**, що кодують відповідно перший модуль НРПС, білок невідомої функції, регулятор LuxR-родини, DpgA, ще один білок невідомої функції та Xre-подібний регулятор [51]. Порівняння промоторно-операторних ділянок, зв'язаних регулятором Tei15*, дало змогу встановити ймовірні сайти його зв'язування. Вони виявилися дещо відмінними від описаних для bbr та не такими консервативними. *In silico* передбачено можливість зв'язування Tei15* із промоторно-операторними ділянками ще шістьох генів з кластера біосинтезу тейкопланіну. Отже з усіх, описаних на сьогодні StrR-подібних регуляторів біосинтезу глікопептидів, Tei15* ймовірно контролює найбільший регулон [51].

Наведені дані свідчать про можливість регуляції білком Tei15* гена *tei16** (що кодує LuxR-подібний регулятор). Відомо, що LuxR-подібні білки часто діють як шлях-специфічні регулятори біосинтезу антибіотиків і підпорядковуються глобальним регуляторам більш високого рівня. З іншого боку, ці білки можуть функціонувати і як плейотропні регулятори, контролюючи паралельно декілька регуляторів нижчого рівня і, відповідно, декілька клітинних процесів. Натомість, StrR-подібні білки завжди виступають шлях-специфічними регуляторами

найнижчого рівня. Досі не описано випадків, коли б StrR-подібний білок мав у своєму регулоні гени якихось інших регуляторів. Однак, результати дослідження ДНК-зв'язувальних властивостей Tei15* *in vitro* свідчать, що він є єдиним описаним на сьогодні StrR-подібним регулятором, який містить у своєму регулоні ген іншого транскрипційного регулятора.

Регуляція біосинтезу глікопептидів LuxR-подібними регуляторами. Як вже зазначалося, в кластері біосинтезу тейкопланіну та деяких інших споріднених кластерах біосинтезу глікопептидів присутні гени регуляторів LuxR-родини. Такий ген *dbv3* є і в кластері біосинтезу A40926 (*dbv*-кластері).

Dbv3 є другим шлях-специфічним регулятором кластера біосинтезу попередника дальбаванцину, антибіотика A40926. Нокаут Dbv3 призводив до майже повного пригнічення синтезу A40926. Більше того, дані транскрипційного аналізу вказують, що експресія гена, який кодує StrR-подібний регулятор Dbv4, цілком залежна від присутності Dbv3. Рівень експресії деяких інших генів *dbv*-кластера також значно знижувався у мутантах з делецією гена *dbv3* ($\Delta dbv3$). Отже, в регуляторній ієрархії Dbv3 знаходиться на вищому рівні, ніж Dbv4. Білок Dbv3 регулює інші гени кластера біосинтезу A40926 безпосередньо, чи опосередковано через Dbv4. Регуляторні механізми, в яких бере участь Dbv3, залишаються невідомими. Жодних ймовірних сайтів зв'язування в промоторно-операторних ділянках генів, експресія яких знижується в мутанті $\Delta dbv3$, не знайдено [84].

Деякі властивості Tei16* і Dbv3 подібні. Tei16* є другим позитивним регулятором біосинтезу тейкопланіну. Надекспресія гена *tei16** давала значне (до двадцяти разів) зростання рівня біосинтезу тейкопланіну порівняно з диким типом. Нокаут *tei16**, подібно до нокауту *dbv3*, призводив до повного припинення біосинтезу тейкопланіну. Однак не доведено, що цей білок здатний зв'язуватися *in vitro*, з промоторно-операторними ділянками генів біосинтезу тейкопланіну. Найбільш ймовірно, що Tei16*, як і інші LuxR-подібні регулятори, потребує присутності в середовищі певної лігандної молекули, в комплексі з якою він зв'язується з ДНК [51].

Отже, шлях-специфічні механізми регуляції біосинтезу глікопептидних антибіотиків не відрізняються особливою різноманітністю. Ключову роль відіграє більш чи менш консервативний StrR-подібний регулятор, який активує експресію структурних генів, розпізнаючи їхні консервативні промоторно-операторні ділянки. У регуляції біосинтезу тейкопланіну та A40926 дія StrR-регуляторів доповнюється впливом LuxR-подібних регуляторів. Деталі механізмів LuxR-залежної регуляції залишаються невивченими. Відомі два ключових активатора біосинтезу тейкопланіну: Tei16* та Tei15*. Надекспресія відповідних генів зумовлює значне зростання продукції тейкопланіну, а їх нокаут елімінують біосинтез. Тим не менше, механізми взаємодії цих двох регуляторів та деталі регуляції всіх транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну залишаються незрозумілими. Невідомою є й функція Tei31* – третього імовірного регулятора, що закодований в кластері генів біосинтезу тейкопланіну.

1.4. Глобальна регуляція вторинного метаболізму та морфогенезу у актинобактерій

Актинобактерії багатьох родин мають складні життєві цикли з чергуванням фази вегетативного міцелію та фази формування спор. Це, зокрема, найкраще досліджена родина *Streptomycetaceae*, родини *Frankiaceae*, *Nocardiaceae* та *Pseudonocardiaceae*. У стрептоміцетів після проростання спори відбувається активний розвиток вегетативного міцелію, що відповідає логарифмічній фазі росту одноклітинних бактерій. Після вичерпання джерел живлення активний ріст вегетативного міцелію припиняється і утворюється повітряний міцелій. Це співпадає із стаціонарною фазою росту одноклітинних бактерій. Паралельно йде гідроліз компонентів субстратного міцелію для забезпечення поживними речовинами розвитку повітряного міцелію. По мірі дозрівання гіфи повітряного міцелію спіралізуються, здійснюється їх компартменталізація, що веде до формування одонуклеоїдних спор, розділених септами. Ланцюжки дозрілих спор легко розпадаються, що супроводжується розповсюдженням спор [72].

Життєвий цикл деяких інших актинобактерій є ще складнішим та включає формування спорангіїв, де і відбувається формування спор, часто рухомих. До таких належать представники родин *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* та ін. Сьогодні достеменно невідомо, як формуються спори всередині таких спорангіїв [47, 48].

Формування спор спряжене із запуском реакцій вторинного метаболізму: синтезом пігментів, антибіотиків та інших біологічно-активних сполук. Зокрема, це можна пояснити тим, що диференціація повітряного міцелію супроводжується гідролізом вегетативного міцелію. В складних ґрунтових мікробіоценозах такий автогідроліз може призвести до того, що інші популяції бактерій спробують використати вивільнені поживні речовини. Але синтез вторинних метаболітів із антибактеріальною активністю здатний знищити таких конкурентів [94].

Очевидно, що весь цей багатостадійний процес підлягає дуже точному і комплексному генетичному регулюванню. У *S. coelicolor* існує два основних класи генів морфологічної диференціації: *bld*-гени, продукти яких необхідні для проростання гіфів повітряного міцелію, і *whi*-гени, задіяні у дозріванні спор. Ці гени згруповані в сигнальні каскади. Виявлено також багато генів, продукти яких необхідні для нормального дозрівання спор і формування повітряного міцелію, але не входять до цих каскадів [93].

1.4.1. AdpA-опосередкована регуляція у стрептоміцетів

Ключовим позитивним регулятором, що запускає морфологічну диференціацію та синтез антибіотиків у стрептоміцетів, є транскрипційний регулятор AraC/XylS-родини AdpA. Це унікальний регуляторний білок, що контролює один з найбільших регулонів серед Грам-позитивних бактерій. AdpA здатний зв'язуватися *in vitro* з понад 1200 сайтами на хромосомі *S. griseus* [45]. Більше того, транскриптомні аналізи показали, що експресія майже 1000 генів залежить від AdpA [153]. Експресію 400 з них AdpA регулює безпосередньо [153]. До регулону AdpA в *S. griseus* входять гени, що відповідають за синтез

секретованих протеаз, різних катаболітних ферментів, позитивні регулятори формування повітряного міцелію, шлях-специфічні регулятори біосинтезу антибіотика стрептоміцину та пігменту гріксазону. Мутанти стрептоміцетів за геном *adpA* не здатні формувати повітряний міцелій та спори і не синтезують стрептоміцин [100], або інші антибіотики [86]. Такий фенотип отримав назву “Bld” (від англ. *bold* – лисий). Тому перший генетичний локус, пізніше ідентифікований як ген *adpA*, було названо *bldH*. Він є компонентом *bld*-каскаду разом із іншими генами, мутації в яких призводили до Bld-фенотипу. Основною мішенню AdpA в *bld*-каскаді є *bldN*, що кодує σ -фактор σ^{BldN} [10]. Мішенню для AdpA є також *ramR*, що кодує позитивний шлях-специфічний регулятор *ramCSAB*-оперону [99]. Продукт цього оперону – гідрофобін SapB – важливий для нормального проростання гіфів повітряного міцелію. Молекули SapB включаються в клітинні стінки гіфів повітряного міцелію, формуючи гідрофобний шар. Це, в свою чергу, дає можливість гіфам проривати поверхневий натяг водяної плівки, що покриває поверхню субстратного міцелію.

Окремо необхідно розглянути AdpA-опосередковану регуляцію біосинтезу антибіотиків. Найчастіше AdpA контролює біосинтез вторинних метаболітів опосередковано, як це з'ясовано при вивченні кластерів генів біосинтезу стрептоміцину та актинородину. В цих випадках AdpA запускає експресію генів шлях-специфічних позитивних регуляторів біосинтезу стрептоміцину StrR та актинородину ActII-ORF4 [101]. Проте, зустрічаються випадки, коли AdpA регулює біосинтез антибіотиків безпосередньо. Так, зокрема, AdpA регулює кластер генів біосинтезу моеноміцину в *Streptomyces ghanaensis*, що не містить генів шлях-специфічних регуляторів [89].

Експресія гена *adpA* також підлягає регулюванню на транскрипційному, постраскрипційному та трансляційном різних. Найкраще регуляцію AdpA досліджено на модельних об'єктах *S. griseus* та *S. coelicolor*. Хоча у різних стрептоміцетів її деталі дещо відрізняються, її основний принцип, мабуть, однаковий для всіх представників роду *Streptomyces*.

Ген *adpA* починає експресуватися після закінчення логарифмічної фази розвитку культури. Коли досягається певна щільність субстратного міцелію в стрептоміцетній колонії, а легкодоступні джерела живлення вичерпуються, клітини починають синтезувати і виділяти фактори кворум-сенсингу (автоіндуктори). Це сполуки γ -бутиролактонної природи [131]. Класичним стрептоміцетним γ -бутиролактоном є А-фактор (2-ізокапрілоіл-3R-гідроксиметил- γ -бутиролактон), описаний для *S. griseus*, головним ферментом біосинтезу якого є AfsA. Ця сполука життєво-важлива для нормального розвитку культури і задіяна в регуляції декількох процесів. Для неї характерні надзвичайно малі ефективні концентрації (10^{-9} М). Ці особливості дають підставу називати А-фактор бактерійним гормоном. У *S. griseus* А-фактор зв'язується із рецептором AgrA (рис. 1.6) [100]. Чутливість AgrA є дуже високою. Цей рецептор не здатний зв'язувати інші γ -бутиролактони навіть ті, що за структурою дуже подібні до А-фактора. AgrA містить два домени, з'єднані гнучким лінкером. N-термінальний домен зв'язує А-фактор, а С-термінальний володіє ДНК-зв'язувальними властивостями [55]. Під час фази логарифмічного росту культури AgrA зв'язується з промоторно-операторною ділянкою *adpA* у вигляді гомодимеру, повністю репресуючи експресію цього гена. Коли А-фактор з'являється в середовищі, він утворює комплекс із N-термінальним доменом AgrA [55]. Це змінює конформацію білка і приводить до дисоціації AgrA з промоторно-операторної ділянки *adpA*, що уможливорює його транскрипцію [100]. Жодних інших мішеней для AgrA у *S. griseus* не виявлено. На посттрансляційному рівні *adpA*-мРНК є субстратом для РНК-ази типу III AbsB (рис. 1.6). AdpA, в свою чергу, можливо виступає репресором транскрипції *absB* (скоріше за все, опосередковано) [158].

Трансляція *adpA*-мРНК залежить від експресії *bldA*, що кодує тРНК, здатну «прочитати» лейциновий кодон UUA. Кодон ТТА рідко зустрічається в ГЦ-багатих геномах стрептоміцетів і відсутній в життєво-важливих генах. Проте, всі стрептоміцетні ортологи *adpA* містять один кодон ТТА, а іноді навіть і два [49, 132]. В свою чергу, промоторно-операторна ділянка гена *bldA* містить сайти

зв'язування для AdpA [49]. AdpA позитивно регулює транскрипцію *bldA*. Отже, в момент, коли знімається блокада транскрипції *adpA* регулятором AgrA, в клітині починає накопичуватися *adpA*-мРНК. Проте, трансляція цих мРНК неможлива без лейцинової тРНК^{UUA}. Можна припустити, що мінімальний пул лейцинових тРНК буде присутній навіть в клітинах із репресією *bldA*. Цього, мабуть, достатньо для трансляції перших *adpA*-мРНК, що приводить до появи молекул AdpA в цитоплазмі, які у свою чергу активують транскрипцію нових *bldA* і такий позитивний зворотній зв'язок веде до появи великих пулів як *bldA*-тРНК, так і AdpA.

Багаторівнева регуляція унеможливорює передчасну експресію AdpA, що, враховуючи розмір його регулона, могло би призвести до порушення нормального розвитку культури.

1.4.2. BldD – ключовий негативний регулятор *bld*- та *whi*-каскадів стрептоміцетів

В регуляції вторинного метаболізму та морфогенезу стрептоміцетів BldD функціонує як глобальний негативний регулятор. Регулон BldD є помітно меншим, ніж у AdpA, проте його розміри також вражають. В *S. coelicolor* було показано експериментально, що експресія понад 167 транскрипційних одиниць напряду залежить від BldD; серед них 42 гени кодують транскрипційні регулятори. Вплив BldD на гени, задіяні в біосинтезі вторинних метаболітів є погано вивченим і скоріше за все опосередковується іншими регуляторами [29].

Окремим випадком є регуляція біосинтезу еритроміцину в *Saccharopolyspora erythraea*, де BldD є позитивним регулятором, що безпосередньо запускає експресію генів кластера [19].

Роль BldD в контролі процесів морфогенезу є краще дослідженою. Експресія більше ніж двадцяти морфогенів залежить від BldD. Мабуть, основними мішенями BldD можна назвати σ -фактори, що входять як до *bld*-каскаду (σ^{BldN}) так і до *whi*-каскаду (σ^{WhiG} , σ^{SigH}). Було показано, що σ^{BldN} задіяний в експресії гена *bldM* (що кодує позитивний регулятор проростання повітряного

міцелію (мутанти за генами *bldM* та *bldN* проявляють болд-фенотип) і, можливо, бере участь в регуляції експресії генів, що відповідають за синтез гідрофобів групи чаплінів (рис. 1.6) [29].

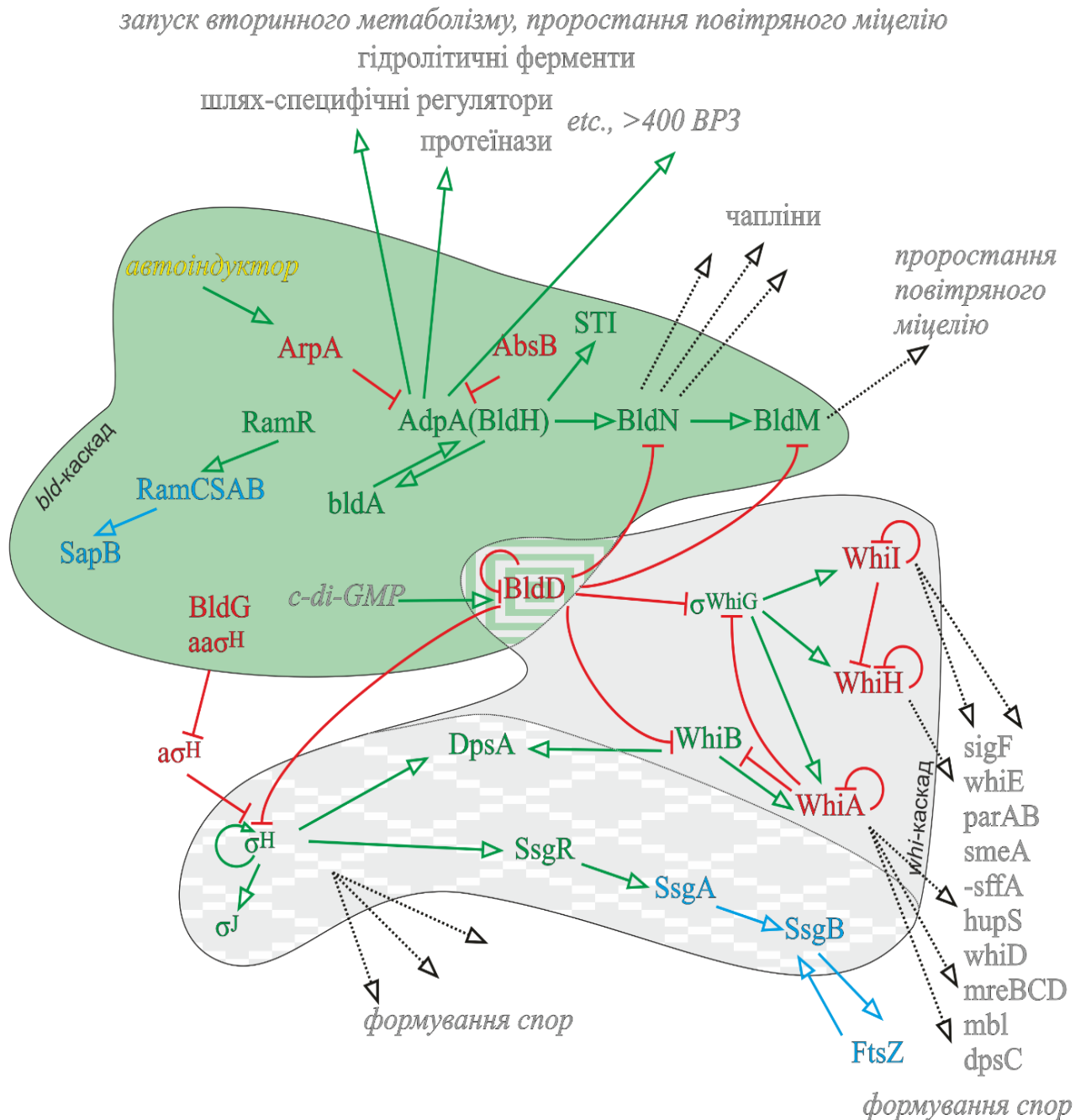


Рис. 1.6 Узагальнена схема основних регуляторних каскадів морфогенезу та вторинного метаболізму у стрептоміцетів, як описано в тексті. Зеленим кольором показано позитивні регулятори, червоним – негативні, синім – структурні білки. Салатовий фон відповідає *bld*-каскаду, сірий – *whi*-каскаду.

В свою чергу, σ^{WhiG} є ортологом σ -факторів рухливості (σ^{FliA}), які забезпечують експресію генів, продукти яких необхідні для біосинтезу джгутиків у інших грам-позитивних бактерій (наприклад у бацил) [135]. Промоторні ділянки всіх генів, що пов'язані з рухливістю містять консервативні послідовності, які розпізнаються σ -факторами рухливості. Вони надзвичайно консервативні у всіх грам-позитивних бактерій: показано, що σ^{WhiG} може комплементувати $\Delta\sigma^{\text{FliA}}$ мутантів *Bacillus subtilis*. Відповідно, стрептоміцетні σ^{WhiG} також здатні розпізнавати ці « пов'язані із рухливістю промотори» (motility associated promoters, MAP). Проте, у стрептоміцетів, що не утворюють рухливих форм, MAP розміщені перед морфогенами: σ^{WhiG} напряду запускає експресію каскаду із ряду *whi*-генів, серед яких є як позитивні так і негативні регулятори один одного [69, 135].

Кінцевою метою *whi*-каскаду є формування нормальних спор, що включає процеси формування септ, інкрустованих полікетидними пігментами клітинних стінок, нормальну сегрегацію геномів. Мутації, що відбуваються в генах *whi*-каскаду призводять до прояву так званого «уайт» фенотипу (*whi*, від англійського white – білий). Цей фенотип характеризується білим кольором повітряного міцелію, а на мікроскопічному рівні відсутністю або порушеннями септування повітряного міцелію. Різниця в кольорі між сірим повітряним міцелієм *S. griseus* та *S. coelicolor* дикого типу та білим у *whi*-мутантів пояснюється відсутністю синтезу сірих полікетидних пігментів, якими є інкрустовані клітинні стінки дозрілих спор [93].

Інша мішень BldD – σ^{SigH} – не є частиною класичного *whi*-каскаду, хоча *de facto* також задіяна в регуляції формування нормальних спор [69]. У стрептоміцетів σ^{SigH} контролює експресію паралогів *ssgA* та *ssgB* (рис. 1.6). Продукти цих генів найімовірніше функціонують у комплексі з FtsZ, ініціюючи збирання Z-кільця при формуванні септ, тобто задіяні у споруляції [75].

BldD є транскрипційним регулятором XRE-родини. Цей білок складається з двох доменів, що володіють різними функціями. N-термінальний домен BldD є класичним ДНК-зв'язувальним доменом «петля-поворот-петля», що дуже

нагадує архетипічний домен, описаний для λ -репресора [74]. Натомість, С-термінальний домен BldD має структуру типу «крилата спіраль» [74]. Для таких доменів характерним є скоріше утворення білок-білкових взаємодій, ніж зв'язування ДНК. Тому спершу було припущено, що цей домен задіяний у зв'язуванні якогось регуляторного білка, який в свою чергу і регулює BldD. Проте, нещодавні дослідження показали, що С-термінальний домен все-таки не зв'язується жодним ефекторним білком. У *Streptomyces venezuelae* С-термінальний домен забезпечує димеризацію BldD, при чому для утворення білок-білкового інтерфейсу необхідна присутність тетрамерної 3', 5' циклічної дігуанілінової кислоти (с-di-GMP). Відповідно, коли пул с-di-GMP в клітинах стрептоміцетів зменшується (а це стається після закінчення логарифмічної фази росту), димери BldD дисоціюють з промоторних ділянок генів, що задіяні в регуляції проростання та диференціації повітряного міцелію [143].

Як не парадоксально, але всі глобальні регуляторні механізми морфогенезу та вторинного метаболізму у актиноміцетів до сьогодні досліджувалися лише на стрептоміцетах (окрім випадку з *Sacch. erythraea*). Жодних даних про регуляторні механізми нестрептоміцетів немає. Особливості життєвих циклів нестрептоміцетних актиноміцетів взагалі не досліджені. Вивчення глобальних регуляторних механізмів, наприклад, спорангієувтворюючих актинобактерій (до яких належить і *A. teichomyceticus*) є надзвичайно перспективним, оскільки серед них є багато продуцентів клінічно-важливих антибіотиків і інших біологічно-активних сполук. Інформація про глобальну регуляцію вторинного метаболізму у цих організмів дасть змогу розробити нові підходи до створення штамів-надпродуцентів. Також, порівняння таких із відомими для стрептоміцетів дозволить пролити світло на процеси еволюції багатоклітинності у актинобактерій.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Штами бактерій та плазміди

Штами *E. coli* та актиноміцетів, використані в роботі, зведені в табл. Б.1 (див. додаток Б.1).

Особливості векторів та плазмід, що були використані або сконструйовані в ході роботи, подані в табл. Б.2 (див. додаток Б.2).

2.2. Середовища та реактиви

2.2.1. Середовища та умови культивування. Для рутинного вирощування штамів *A. teichomyceticus* використовувалися середовища ISP2, ISP3, CM (соєво-манітоловий агар).

Схрещування *E. coli* – *Actinoplanes* проводили на середовищі CM із додаванням $MgCl_2$ в концентрації 40 мМоль; схрещування *E. coli* – *Streptomyces* проводили на середовищі ISP3 із додаванням $MgCl_2$ в концентрації 10 мМоль.

Для виділення хромосомної ДНК міцелій стрептоміцетів вирощували в рідкому середовищі TSB, *A. teichomyceticus* – рідкому середовищі E25.

Для дослідження морфології штамів *Streptomyces* та *A. teichomyceticus* вирощували на таких агаризованих середовищах: хітиновому, Чапека, Бенета, YMPG, MYM, MM, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7.

Для кількісного аналізу тейкопланіну, що продукується різними штамми *A. teichomyceticus*, використовували рідке середовище TM1. Для підрощування прекультур та створення банків вегетативних клітин використовували рідке середовище E25.

Для вимірювання продукції актинородину використовували рідке середовище YMPG.

Склад всіх середовищ, використаних в роботі з актиноміцетами подано в додатку В.

Для вирощування штамів *E. coli* використовували рідке середовище LB [40] (г/л): триптон – 10 (Sigma-Aldrich); екстракт дріжджів – 5 (Sigma-Aldrich); NaCl (Oxoid) – 5. LB-агар готували шляхом додавання 10 г агару (Conda) до 1 л рідкого середовища LB. Культури актиноміцетів вирощували при температурі 28-30°C, культури *E. coli* – 37°C.

2.2.2. Реактиви. Компоненти всіх поживних середовищ описано в додатку В. Для протопластування клітин актинобактерій при виділенні сумарної ДНК чи РНК використовували лізоцим (Sigma-Aldrich).

У роботі використовували антибіотики: хлорамфенікол (Артеріум), канаміцину сульфат (Артеріум), ампіциліну натрієву сіль (Sigma-Aldrich, Артеріум), гігromіцин В (Roth), апраміцину сульфат (Sigma-Aldrich), налідиксову кислоту (Sigma-Aldrich), фосфоміцин (Sigma-Aldrich), тейкопланін (Sigma-Aldrich), таргоцид (Sanofi-Aventis). Хлорамфенікол розчиняли у етанолі або метанолі, інші антибіотики – в дистильованій воді.

Для blue-white селекції рекомбінантних штамів *E. coli* використовували X-Gal (Thermofisher Scientific).

Для індукції IPTG-індуцибельних промоторів використовували IPTG (Thermofisher Scientific); для індукції рамнозо- та арабінозо-індуцибельних промоторів використовували арабінозу та рамнозу (Promega).

В експериментах з виділення та аналізу плазмідної та хромосомної ДНК, виділенні сумарної РНК, білків, а також аналізі продукції антибіотиків використовували: Тріс (Promega), ЕДТА (Реахим), NaCl (Oxoid), CH₃COOH (Sigma-Aldrich), ДСН (Sigma-Aldrich), CH₃COOK (Реахим, Merck), етанол (Sigma-Aldrich), ізопропанол (Sigma-Aldrich), β-меркаптоетанол (Sigma-Aldrich), суміш фенолу-хлороформу-ізоамілового спирту (Roth), агарозу (Bioline, Fisher Bioreagents), форміат амонію (Biochem), ацетонітрил (Sigma-Aldrich), акриламід/бісакриламід (Roth), персульфат амонію (Sigma-Aldrich), гліцерол (Sigma-Aldrich), Кумасі діамантовий синій (Abcam), бромфеноловий синій (Reanal), мальтозу (Promega), імідазол (Sigma-Aldrich), дитіотреїтол (Sigma-

Aldrich), тритон X-100 (Sigma-Aldrich), p-нітрофеніл- β -D-глюкуронід (Thermofisher Scientific).

2.2.3. Ферменти та буфери. Всі ферменти, згадані в роботі застосовували згідно рекомендацій виробника із використанням відповідних комерційних буферів.

2.3. Методи

2.3.1 Трансформація та електропорація *E. coli* плазмідною ДНК. Для трансформації використовували хімічно- або електро-компетентні клітини *E. coli*. Трансформацію та надання клітинам компетентності здійснювали за стандартними методиками [40, 175].

2.3.2. Кон'югація *E. coli* – *Streptomyces*, *E. coli* – *Actinoplanes*. Міжродову кон'югацію у випадку *E. coli* – *Streptomyces* здійснювали за модифікованою методикою Мазодієра [72]. Як штам донор використовували неметилуючий штам *E. coli* ET12567 pUZ8002. Для кон'югації нічну культуру *E. coli* ET12567 pUZ8002 із відповідною плазмідною (космідною) підрощували до середини логарифмічної фази росту. Спори штаму реципієнта піддавалися тепловому шоку при 50°C протягом 10 хв. Потім змішували 10^8 клітин донора із 10^7 спор реципієнту, суміші висівали на чашки з середовищем СМ. Інкубували 12-20 год та заливали розчином антибіотика, стійкість до якого визначається маркерним геном плазміди, і налідиксової кислоти. Чашки інкубували 3-6 діб, після чого підраховували та аналізували екскон'югантів.

Для кон'югації *E. coli* – *Actinoplanes* використовували модифікований протокол, описаний в [43]. Так як спори *Actinoplanes* є рухомими і містяться у спорангіях, змиви газонів інкубували протягом однієї години на шейкері при температурі 30°C. За виходом спор спостерігали із використанням світлового мікроскопу. Спори не піддавали теомічному шоку. Кон'югація здійснювалася після того, як більшість спор виходила із спорангіїв.

2.3.3. Виділення сумарної та плазмідної ДНК. Сумарну ДНК із актиноміцетів виділяли за стандартним протоколом без використання фенол-

хлороформної екстракції, проте із висолюванням білків ацетатом натрію [72, 175]. Плазмідну ДНК із клітин *E. coli* виділяли за методикою лужного лізису [40, 175], або із використанням комерційних наборів від Qiagen чи ThermoFisher Scientific згідно із рекомендаціями виробника.

2.3.4. Виділення сумарної РНК. Для виділення сумарної РНК із клітин актиноміцетів використовували модифікований метод Кірбі [72]. Всі процедури, пов'язані із виділенням або подальшою роботою із РНК, проводилися максимально ретельно в стерильних, вільних від РНК-аз умовах, із використанням двічі автоклавованих матеріалів. Для руйнування клітин використовували вортексування із скляними кулями з використанням гомогенізатора Precellys 24 (Bertin Instruments). У препараті виділених сумарних РНК ДНК руйнувалось за допомогою DNase I, RNase-free (ThermoFisher Scientific) згідно із рекомендаціями виробника. Якість отриманого препарату сумарної РНК перевіряли за допомогою горизонтального агарозного гель-електрофорезу: якщо препарат сумарної РНК не деградований, на ньому можна чітко розрізнити смуги, що відповідають 23S, 16S та 5S РНК (рис.2.1).

Альтернативно, сумарну РНК виділяли за допомогою набору Rneasy Mini Kit Qiagen згідно із протоколом, поставленим виробником.

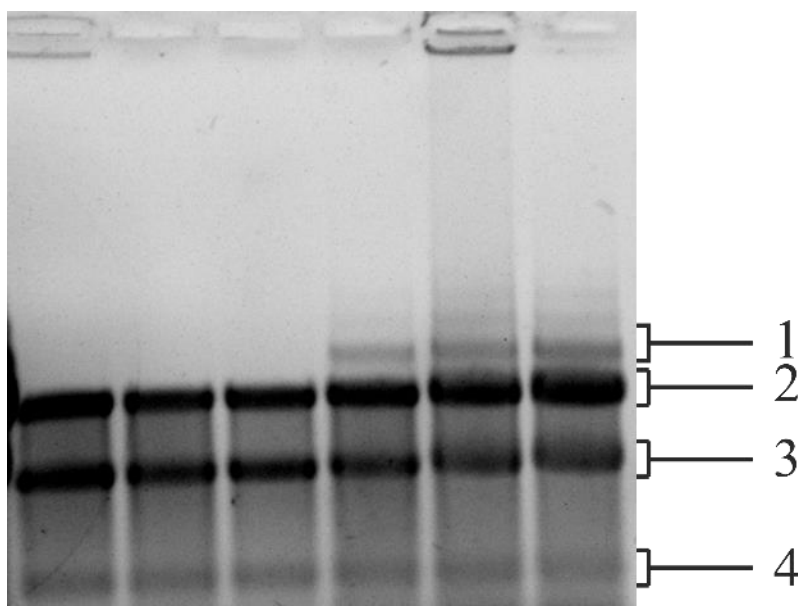


Рис. 2.1 Зразок препарату сумарної РНК, виділеної з міцелію *A. teichomyceticus*, можна відрізнити смуги 5S та тРНК (4), 16S РНК (3), 23S РНК (2) та смуги попередників рРНК (1).

2.3.5. Вимірювання концентрації ДНК та РНК. Концентрація нуклеїнових кислот вимірювалася за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

2.3.6. Ферментативна обробка ДНК. Аналіз сумарної та плазмідної ДНК із використанням ендонуклеаз рестрикції здійснювали за допомогою ферментів від ThermoFisher Scientific та NEB за умов, рекомендованих виробниками. В середньому, на 1 мкг ДНК використовували від 2 до 10 одиниць ендонуклеази рестрикції, рестрикційну суміш інкубували від 1 години при 37 °С. Для дефосфорилювання 3'-кінців розщеплених молекул плазмідної ДНК використовували лужну фосфатазу Fast AP від ThermoFisher Scientific.

2.3.7. Синтез кДНК. Для синтезу кДНК на основі сумарної РНК використовували RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit від ThermoFisher Scientific згідно із рекомендаціями виробника; особливостями цього набору є використання швидкої зворотної транскриптази M-MuLV RT та інгібітора рибонуклеаз RiboLock, що ефективно захищає РНК від деградації. Пізніше, 2 мкл реакційної суміші використовувалися як матриця для ПЛР, в якій здійснювалася ампліфікація фрагменту цільового транскрипту.

2.3.8. Полімеразна ланцюгова реакція. Полімеразні ланцюгові реакції були здійснені за допомогою різних ампліфікаторів від компаній BioRad, ThermoFisher Scientific, Eppendorf. Також, були використані різні ДНК-полімерази. Для клонування генів було використано високоточні полімерази такі як Pfu, Phusion, Q5 від різних виробників (NEB, ThermoFisher Scientific). Для рутинних ПЛР та ПЛР з кДНК було використано Taq-полімерази від різних виробників (ThermoFisher Scientific, Qiagen). Базовий склад суміші для ПЛР та базові параметри протоколів відповідали рекомендаціям виробника. У раз потреби у ампліфікації складних ділянок підбирали оптимальні умови реакції, використовуючи градієнти температури плавлення праймерів, різні концентрації Mg^{2+} , ДНК матриці.

2.3.9. Розділення молекул ДНК за допомогою горизонтального агарозного гель-електрофорезу та елюювання фрагментів ДНК з агарозного

гелю. Електрофорез ДНК здійснювали в горизонтальному агарозному гелі в тріс-ацетатному буфері (TAE), із складом: 40 мМоль Tris, рН 8,0; 20 мМоль CH_3COONa ; 1 мМоль Na_2EDTA ; 25 мМоль CH_3COOH протягом 15-30 хв. при напрузі 100-150 В. Для різних цілей використовували різні концентрації агарози в гелі; так, для рутинного розділення молекул ДНК розміром 500-8000 п.н. використовували 1% гель, для розділення молекул більше 8000 п.н. використовували 0,7% гель, а для розділення молекул ДНК менше 500 п.н. – 1,5-2% гель. 0,7% агарозний гель також використовувався для розділення молекул ДНК із подальшим їх елююванням.

Розмір фрагментів ДНК визначали за їхньою електрофоретичною рухливістю у порівнянні із сумішами молекул ДНК із відомими розмірами; такими маркерами були GeneRuler 1 kb DNA Ladder, GeneRuler DNA Ladder Mix від ThermoFisher Scientific та інші. Для візуалізації фрагментів ДНК в гель додавали броміду етидію або SYBR Green. Бажані фрагменти ДНК елюювали за допомогою наборів QIAquick Gel Extraction Kit від Qiagen та GeneJET Gel Extraction від ThermoFisher Scientific.

2.3.10. Субклонування ПЛР-продуктів та їх секвенування. Для субклонування ПЛР-продуктів використовували CloneJET PCR Cloning Kit від ThermoFisher Scientific. В склад цього набору входить вектор pJET1.2, попередньо розщеплений за сайтом розпізнавання ендонуклеази рестрикції EcoRV; так як EcoRV залишає тупі кінці, pJET1.2/EcoRV підходить для субклонування ПЛР-продуктів, ампліфікованих за допомогою високоточних полімераз Pfu, Phusion, тощо, що генерують амплікони із тупими кінцями.

Сайт EcoRV в плазміді pJET1.2 міститься в летальному для *E. coli* гені, що запобігає відбору клонів, які несуть вектор, лігований сам на себе. Фрагменти ДНК, субклоновані в pJET1.2, далі вищеплювалися із використанням відповідних ендонуклеаз рестрикції і використовувалися для подальшого клонування; послідовність фрагментів, субклонованих в pJET1.2 можна було перевірити за допомогою комерційного секвенування, забезпеченого компанією Eurofins Genomics.

2.3.11. Ферментація *A. teichomyceticus* та високоефективна рідинна хроматографія тейкопланінів. Для кількісного визначення тейкопланінів штамами *A. teichomyceticus* використовували модифіковану методику, описану в [136]. Для цього штами культивували в середовищі ТМ1; культуральну рідину відбирали у бажаних часових точках, 2 мл культуральної рідини центрифугували протягом 2-5 хв при 13 т.о., тейкопланін вимірювали в супернатанті. ВЕРХ проводили в системі розчинників: розчинник А – 32 мМоль форміату амонію, рН=4.5 до ацетонітрилу як 90:10, розчинник Б - 32 мМоль форміату амонію, рН=4.5 до ацетонітрилу як 30:70 із використанням C_{18} (5 мкм, 4,6 · 250 мм) колонок різних виробників; швидкість елюції становила 1 мл/хв в 30-ти хвилинному лінійному градієнті від 15% до 65% розчинника Б, що завершувалося 10 хв. у 100% розчинника Б. ВЕРХ здійснювалася за допомогою хроматографа Elite Lachrom VWR Hitachi LLC 1100 з УФ детекцією при довжині хвилі 263 нм. Як контроль використовували чисті зразки тейкопланіну (Таргоцид від Sanofi-Aventis).

Концентрація тейкопланінового комплексу визначалася за наступною формулою:

$$\text{Конс. Т-А}_2 \text{ (мг/л)} = \frac{C(\text{std}) \times A}{A(\text{std})}, \text{ де:}$$

$C(\text{std})$ = концентрація контрольного розчину таргоциду (мг/л);

A = сума площ піків Т-А₂₋₁, Т-А₂₋₂, Т-А₂₋₃, Т-А₂₋₄, Т-А₂₋₅ в досліджуваному зразку;

$A(\text{std})$ = сума площ піків Т-А₂₋₁, Т-А₂₋₂, Т-А₂₋₃, Т-А₂₋₄, Т-А₂₋₅ в контрольному зразку.

Для кожного зразка повторювали три раунди ВЕРХ і брали середнє арифметичне значення трьох повторів.

Два різних методи було використано для аналізу продукції глікопептидів із використанням ВЕРХ-МС. Для першого методу було використано систему для ВЕРХ Thermo Finnigan Surveyor у поєднанні з Thermo Finnigan LCQ Deca Ion Trap мас-спектрометром разом із джерелом іонів електроспрей. Зразки проходили

через колонку Phenomenex Kinetex 2.6 μ m XB-C18 (0,01 мкм, 50 · 2.1 мм) за температури 30 °C в лінійному градієнті від 5 до 95% ацетонітрилу + 0.1% мурашиної кислоти протягом 12 хв із швидкістю 0.35 мл/хв, потім перебували в 95% розчині ацетонітрилу протягом 3 хв і, на кінець, в 5% ацетонітрилу протягом 4 хв. Дані мас-спектрометрії збиралися у діапазоні m/z 200-2000.

У другому методі використовували систему для ультра-ВЕРХ Shimadzu Nexera X2 разом із Shimadzu IT-TOF мас-спектрометром. Зразки проходили через колонку Phenomenex Kinetex 2.6 μ m XB-C18 column (0,01 мкм, 50 · 2.1 мм) за температури 40°C, в лінійному градієнті від 5 до 95% ацетонітрилу + 0.1% мурашиної кислоти протягом 10 хв із швидкістю 0.6 мл/хв, потім перебували в 95% розчині ацетонітрилу протягом 12 хв і, на кінець, в 5% ацетонітрилу протягом 14 хв. Дані мас-спектрометрії збиралися у діапазоні m/z 500-2000.

2.3.12. Розділення білкових молекул. Електрофорез білків проводився в вертикальному поліакриламідному гелі. Для приготування 5 мл концентруючого гелю використовували: H₂O – 2,975 мл; 0,5 Моль Тріс-НCl, pH 6,8 – 1,25 мл; 10% ДСН – 0,05 мл; акриламід/біс-акриламід (30%/0.8%) – 0,67 мл; 10% персульфат амонію – 0,05 мл; TEMED – 0,005 мл. Для приготування 10 мл 15% розділяючого гелю використовували: H₂O – 2,2 мл; акриламід/біс-акриламід (30%/0,8%) – 5 мл; 1,5 Моль Тріс (pH=8,8) – 2,6 мл; 10% ДСН – 0,1 мл; 10% амонію персульфату – 100 мкл; TEMED – 10 мкл. Електрофорез здійснювали в Тріс-Гліциновому буфері (5-кратний буфер, 1 л: Тріс – 15 г., гліцин – 72 г, ДСН – 5 г). Гелі зафарбовували в буфері Кумасі для зафарбовування (10% CH₃COOH, 0,006% Кумасі діамантового синього, 90% H₂O) протягом 15 хв, а потім знебарвлювали в буфері для знебарвлювання (10% CH₃COOH, 25% ізопропанолу, 65% H₂O). Перед нанесенням на гель, зразки білка денатурувалися інкубуванням в буфері Лемлі (2-кратний буфер Лемлі: 4% ДСН, 20% гліцерол, 10% β -меркаптоетанол, 0,004% бромфенол синій, 0.125 Моль Тріс-НCl, pH 6,8) протягом 30 хв при 100°C. Як маркер молекулярної ваги використовували PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Розділення білків проводили 1 – 1,5 год при напрузі 50-100 В.

2.3.13. Вимірювання концентрація білка. Концентрацію очищеного білка вимірювали за допомогою Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) відповідно до інструкцій виробника.

2.3.14. Очищення HIS і MalE –тагованих білків. Клітини *E. coli*, в яких експресували гетерологічні білки збирали центрифугуванням і лізували в буфері для лізису (50 мМоль NaH_2PO_4 , 300 мМоль NaCl) за допомогою Френч преса (Thermo Electron).

Очищення розчинного His₆-tagged BldD_{AT} з лізатів здійснювали за допомогою Ni-NTA Superflow Columns (Quiagen). Білок, зв'язаний з Ni-NTA-смолами для афінної очистки білків було промито (промивний буфер: 50 мМоль NaH_2PO_4 , 300 мМоль NaCl , 10 мМоль імідазол), а тоді елюйовано (буфер для елюювання: 50 мМоль NaH_2PO_4 , 300 мМоль NaCl , 250 мМоль імідазол).

Рекомбінантні білки, злиті із MalE очищували з лізатів за допомогою Amylose Resin (NEB). Зв'язаний білок промивали (промивний буфер: 20 мМоль Tris-HCl (pH 7,4) 0,2 М NaCl 1 мМ EDTA, 0,1 мМоль мальтоза) і елюювали (буфер для елюювання: 20 мМоль Tris-HCl (pH 7,4) 0,2 Моль NaCl 1 мМоль EDTA, 10-50 мМоль мальтоза).

Аліквоти отриманих очищених білків було досліджено за допомогою електрофорезу білків у вертикальному поліакриламідному гелі із Кумасі зафарбовуванням. Після вимірювання концентрацій білків їх негайно використовували для аналізів зміни електрофоретичної рухливості ДНК.

2.3.15. Аналіз зміни електрофоретичної рухливості молекул ДНК (EMSA). Су5-мічені фрагменти ДНК, що містили досліджувані промоторно-операторні ділянки готували у два кроки. Спочатку їх ампліфікували із використанням праймерів, кожен із яких містив ділянку гомології до Су5-міченого праймера (Су5_Pr). Амплікони було проелюйовано та використано як матрицю для наступного раунду ПЛР із Су5_Pr, даючи фрагменти ДНК із інкорпорованими Су5-мітками. Мічені фрагменти було очищено та застосовані в подальшому аналізі. Для EMSA використовували реакційний буфер такого складу: 10 мМоль Tris (pH 7,5), 5 мМоль MgCl_2 , 50 мМоль EDTA, 60 мМоль KCl,

10 мМоль DTT, 10% гліцерол. До складу кожної реакції входило 25-250 нг очищених білків, 1-5 нг міченої ДНК та 1 мкг ДНК сперми лосося. Реакції інкубували протягом 15 хв. на льоді, а потім проганяли в 2% TBE агарозному гелі в 0,5-кратному TBE-буфері (10-кратний TBE-буфер: 89 мМоль Тріс, 89 мМоль борної кислоти, 2 мМоль ЕДТА). Гелі візуалізовували із використанням Typhoon 9410 (GE Healthcare).

2.3.16. Вимірювання активності β -глюкуронідази в лізатах міцелію *A. teichomyceticus*. Виявлення активності β -глюкуронідази проводили за модифікованою методикою Джеферсона [59, 60, 96]. Для цього спорову суспензію досліджуваних штамів інокулювали в 50 мл середовища TSB і вирощували впродовж 36 годин (250 об/хв). 36-годинну культуру інокулювали у 100 мл відповідного середовища і вирощували протягом необхідного проміжку часу. Міцелій із 10 мл культури осаджували центрифугуванням, промивали дистильованою водою і ресуспендували в 10 мл буферу для лізування (50 мМоль фосфатний буфер рН 7,0, 0,1% Тритон X-100, 0,77% дитіотреїтол та лізоцим 4 мг/мл). Лізування проводили протягом 30 хв при 37 °С, періодично помішуючи. Отриманий лізат центрифугували. Для вимірювання активності ферменту змішували рівні об'єми лізату і буферу №2 (буфер №1 з додаванням р-нітрофеніл- β -Д-глюкуроніду в кінцевій концентрації 1 мМоль). Реакцію проводили при температурі 37 °С. Кількість утвореного р-нітрофенолу визначали спектрофотометрично при $\lambda=415$ нм. Як контроль для спектрофотометричного вимірювання використовували суміш рівних об'ємів лізату і буферу №1. Масу сухого міцелію в одиниці об'єму культури визначали шляхом висушування міцелію при 60 °С, осадженого з 10 мл культури.

2.3.17. Технологія ПЛР-направленого мутагенезу Redirect.

Руйнування генів *A. teichomyceticus* здійснювалося за допомогою методу Redirect [41, 42].

Принцип цього методу полягає у заміні кодуючої ділянки бажаного гена на маркер стійкості до антибіотика, що здійснюється на косміді в клітинах *E. coli*. В клітинах актиноміцетів гомологічна рекомбінація проходить лише при великій

довжині (від 500 п.н.) ділянок гомології, тоді як в *E. coli* гомологічна рекомбінація вимагає набагато коротших ділянок гомології. Тому, порівняно легко можна замістити бажаний ген на маркер стійкості до антибіотику за допомогою RED-індукованої гомологічної рекомбінації в клітинах *E. coli*.

Косміду, на якій міститься бажаний ген, переносять в штам *E. coli*, що несе λ -RED гени (*gam* – кодує інгібітора екзонуклеази V, *bet* – кодує SSBp, *exo* – кодує екзонуклеазу, що покращує рекомбінацію разом із SSBp) під контролем індукцибельного промотора. Далі, маркер стійкості до антибіотику, яким планують заміщати бажаний ген ампліфікують із використанням праймерів, кожен із яких на 5' кінці має послідовність розміром 39 п.н. гомологічні до ділянок біля старт- та стоп-кодонів гена мішені, а на 3' кінці послідовності розміром 19 і 20 п.н., гомологічні з фланкуючими послідовностями маркера стійкості до антибіотику. Отриманим ампліконом електропорують штам *E. coli*, що несе косміду із бажаним геном та індуковані λ -RED: продукт *gam* забезпечує ефективну електропорацію лінійним фрагментом, інгібуючи екзонуклеазу V, а продукти *bet* та *exo* індукують гомологічну рекомбінацію. Як результат, бажаний ген заміщується на маркер стійкості до антибіотику на косміді. Косміда переноситься в штам актиноміцета методом міжродової кон'югації, в подальшому ведеться відбір клонів, в яких пройшов первинний та вторинний кросинговер, і на хромосомі бажаний ген є заміщеним на маркер стійкості до антибіотику.

2.3.18. Мікроскопія. Для спостереження спор та спорангіальних структур *A. teichomyceticus* в роботі застосовували стандартні методи світлової мікроскопії. Препарати типу «роздавлена крапля» мікроскопували за допомогою мікроскопа Olympus BX60 (Olympus).

Для дослідження морфології поверхонь газонів різних штамів актинобактерій, отриманих в роботі, використовували сканувальну електронну мікроскопію. Для цього, з газону вирізали невеликий фрагмент, який напиляли тонким шаром міді у вакуумі із використанням ВУП-5м. Напилені препарати

мікроскопували із використанням сканувального електронного мікроскопа JEOL JSM-T220a SEM (Jeol).

2.3.19. Алгоритми біоінформатичного аналізу. Для рутинного аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, створення мап векторів та підбору праймерів використовували Geneious 4.8.5 [66]. Для філогенетичного аналізу використовували Mega 6 [134]. Для пошуку послідовностей в базах даних NCBI використовували BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для створення структурних формул хімічних речовин використовували ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Штам *A. teichomyceticus* NRRL-B16726 – єдиний відомий природний продуцент унікального ліпоглікопептидного антибіотика тейкопланіну, що використовується в клініках України, Європейського Союзу та Японії.

На сьогодні секвеновано та анотовано кластер генів біосинтезу тейкопланіну (*tei*-кластер), досліджено *in vitro* особливості деяких ферментів, що кодуються генами цього кластеру [81]. Вивчено механізми стійкості *A. teichomyceticus* до тейкопланіну, які виявилися дуже подібними до тих, що зустрічаються в інших продуцентів глікопептидів і патогенів, стійких до глікопептидів [7]. Складність генно-інженерних маніпуляцій з продуцентом тейкопланіну довгий час ставала на заваді дослідженню більшості генів біосинтезу тейкопланіну та генів, що регулюють цей процес. Останнім часом доведено можливість застосування низки інтегративних та реплікативних векторів для внесення додаткової генетичної інформації в геном *A. teichomyceticus* та адаптовано систему генних нокаутів в *A. teichomyceticus* [51, 54]. У цих же роботах також з'ясовано роль двох транскрипційних факторів – *Tei15** та *Tei16**, що кодуються генами *tei*-кластеру, як ключових позитивних регуляторів біосинтезу тейкопланіну, без яких біосинтез не відбувається.

Проте, багато аспектів генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну, як і деякі важливі особливості морфогенезу його продуцента – *A. teichomyceticus*, залишаються невивченими. У нашій роботі ми поставили за мету дослідити механізми генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну та використати отримані дані для конструювання *A. teichomyceticus* із підвищеною продукцією тейкопланіну. Для цього нами було створено платформу для надекспресій генів в *A. teichomyceticus*, здійснено нокаути низки генів, які кодують ферменти модифікації тейкопланінового аглікону та досліджено похідні тейкопланіну, що синтезувалися отриманими мутантами. Вивчення впливу нокауту генів, що кодують регулятори *Tei15** та *Tei16** на експресію *tei*-генів було використано

для з'ясування ієрархії *Tei15** та *Tei16** у системі регуляції та ідентифікації їхніх регулонів у складі *tei*-кластера.

Беручи до уваги, що у кластерах генів біосинтезу глікопептидів присутні гени, відповідальні за його забезпечення амінокислотами-попередниками [137], ми виявили і дослідили такі гени у *tei*-кластері, порівнявши їх з гомологами з інших кластерів. Для цього було сконструйовано штами із надекспресією таких генів *A. teichomyceticus* та гетерологічною експресією гомологічних генів продуцента баліміцину *Am. balhimycina*.

У стрептоміцетів глобальна регуляція вторинного метаболізму нерозривно пов'язана із регуляцією морфологічної диференціації. Так як *A. teichomyceticus* належить до маловивченої групи актинобактерій, ми дослідили особливості морфології та життєвого циклу цього організму, щоб мати змогу адекватно трактувати будь-які відмінності в морфології отриманих рекомбінантних штамів і штаму дикого типу. Дослідивши геном *A. teichomyceticus*, ми знайшли багато аналогій із елементами глобальної регуляції в стрептоміцетів. Ми припустили, що знайдені в геномі *A. teichomyceticus* гени-гомологи та ортологи морфогенів стрептоміцетів також можуть брати участь в глобальному генетичному контролі біосинтезу тейкопланіну і морфологічної диференціації *A. teichomyceticus*. Для з'ясування їхньої ролі у глобальному контролі біосинтезу тейкопланіну та морфологічної диференціації *A. teichomyceticus* ми створили низку штамів із надекспресією цих морфогенів.

3.1 Створення системи для надекспресії генів в *A. teichomyceticus*

Генетичні маніпуляції із штамом *A. teichomyceticus* донедавна були обмеженими внаслідок відсутності генно-інженерного «інструментарію» для цього штаму. Проте, роботи останніх років значно розширюють набір інструментів для маніпулювання *A. teichomyceticus* [51, 54]. Це, зокрема, набір різних інтегративних та реплікативних векторів, які можна використовувати для внесення генетичної інформації в *A. teichomyceticus* [54]. Найбільш ефективним способом надекспресії генів у актиноміцетів є інтеграція додаткової копії під

контролем сильного конститутивного промотора [72]. Проте, оптимальні промотори для експресії генів в *A. teichomyceticus* ще не були підібрані. Тому, у цьому підрозділі ми вирішили дослідити активність різних промоторів в штамі-продуценті тейкопланіну.

3.1.1. Активність гетерологічних промоторів в *A. teichomyceticus*

Промотори, що були обрані для дослідження походять із добре вивченого модельного об'єкту генетики актиноміцетів *S. coelicolor*. Це були промотори, які активні у *S. coelicolor*: *cdaRp* – промотор регуляторного гена біосинтезу Са-залежного антибіотика *cdaR*; *actII-R4p* – промотор гена шлях-специфічного регулятора біосинтезу актинородину *actII-R4*; *wblAp* – промотор гена глобального регулятора *wblA* [113, 35, 3]. Оскільки у попередній роботі [54] було досягнуте значне збільшення рівня синтезу тейкопланіну за експресії позитивного регулятора *tei15** під контролем промотора гена стійкості до апраміцину (*aac(3)IVp*) з *Klebsiella pneumoniae*, ми також вирішили вивчити активність *aac(3)IVp*.

Для того, щоб дослідити активність промоторів, нами було сконструйовано систему, де як репортерний використовується ген β -глюкуронідази *gusA*, що є синтетичним кодон-оптимізованим варіантом гена β -глюкуронідази *E. coli* (NP_416134). Цей ген було ампліфіковано з плазмиди pGUS [96] за допомогою Pfu-полімерази із використанням пари праймерів GUSAEVForw та GUSAEVRev. Ампліфікований фрагмент було субклоновано в EcoRV-сайт плазмиди pUC57 (Y14837.1). Отриманий вектор pUC57gusA було розщеплено ендонуклеазами рестрикції XbaI/BamHI, отриманий фрагмент, розміром 1,9 т.п.н. (що ніс *gusA*) було клоновано по відповідним сайтам розпізнавання в плазміді pMT3226 [72], даючи вектор pMT3226gusA. Отже, отриманий вектор містив *gusA* без жодного промотора. pMT3226gusA було використано як негативний контроль для подальшого експерименту.

Для того, щоб виміряти активність *aac(3)IVp*, фрагмент розміром 0,35 т.п.н., що містив промотор гена *aac(3)IV* ампліфіковано з плазмиди pSET152 [72], за

допомогою полімерази Pfu із використанням пари праймерів aacPF/aacPR. Амплікон клоновано в плазмиду pSET152 по сайтам розпізнавання ендонуклеазами рестрикції BamHI та EcoRV. Отриманий вектор отримав назву pSETPAm (рис.3.1).

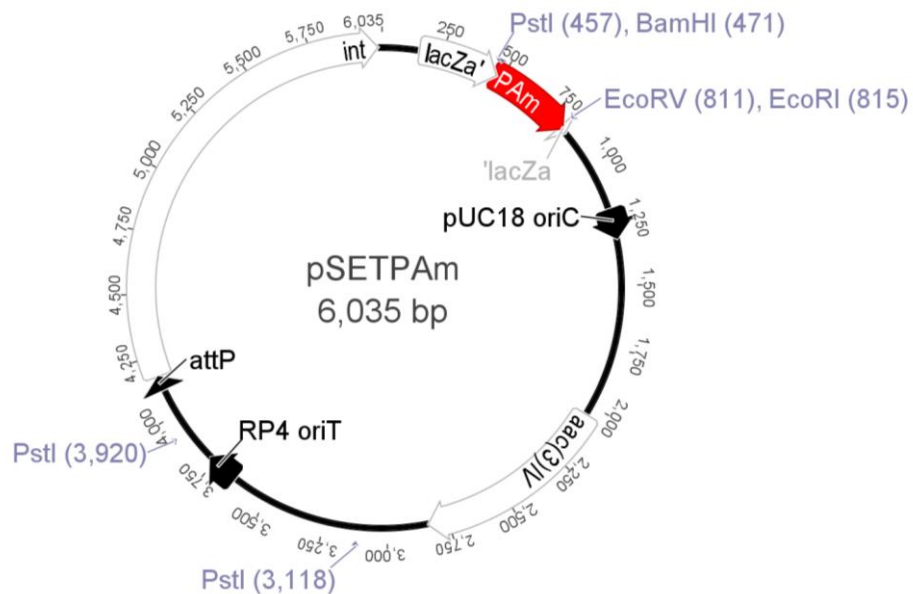


Рис.3.1 Мапа вектора pSETPAm. Позначення: int – ген інтегрази фага ϕ C31; PAm – *aac(3)IVp*; attP – сайт *attP* фага ϕ C31; RP4 oriT – точка початку перенесення ДНК; pUC18 oriC – ділянка початку реплікації плазмиди в клітинах *E. coli*; lacZa – фрагмент гена *lacZ*.

Фрагмент, що містив ген *gusA*, переклоновано із pUC57*gusA* в pSETPAm по сайтам розпізнавання ендонуклеазами рестрикції EcoRV/EcoRI, даючи вектор pSETPAm*gusA*, який було використано для вимірювання активності *aac(3)IVp*.

В свою чергу, промоторні ділянки генів *actII-R4*, *cdaR* та *wblA* було ампліфіковано із хромосомної ДНК *S. coelicolor* за допомогою Pfu-полімерази із використанням пар праймерів actII-R4Forw/actII-R4Rev, cdaRForw/cdaRRev та wblAForw/wblAREv, відповідно. Отримані амплікони розміром 0,41 т.п.н., 1,04 т.п.н. та 0,52 т.п.н. та було розщеплено за сайтами розпізнавання ендонуклеаз рестрикції KpnI та XbaI та клоновано у відповідні сайти вектора pGUS. В результаті, було сконструйовано плазмиди pSETPact*gusA*, pSETPcdaR*gusA* та pSETPwblA*gusA*.

Всі отримані вектори перевірено за допомогою рестрикційного картування та перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 рUZ8002. Отримані екскон'юганти відібрано за стійкістю до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл.

Далі, ми визначили β -глюкуронідазну активність в усіх отриманих штаммах із використанням методики, описаної у пункті 2.3.16 матеріалів та методів. Як і очікувано, цитозольні екстракти штамів *A. teichomyceticus* рMT3226gusA не виявляли β -глюкуронідазної активності. Проте, екстракти всіх інших штамів були здатні до розщеплення р-нітрофеніл-D-глюкуроніду.

Активність гетерологічних промоторів *cdaRp* та *wblAp*, опосередкована β -глюкуронідазною активністю екстрактів відповідних штамів, виявилася радше помірною (рис.3.2). Від цих результатів сильно відрізнялася активність *actII-R4p* (рис.3.2), що була у десять раз більшою ніж у промоторів *cdaRp* та *wblAp*. З одного боку така висока активність цього промотора може бути використана для сильної надекспресії цільових генів *A. teichomyceticus*. Проте, часто занадто сильна надекспресія деяких генів повністю порушує метаболічний баланс клітини і призводить зниження показників росту та синтезу корисних метаболітів [112].

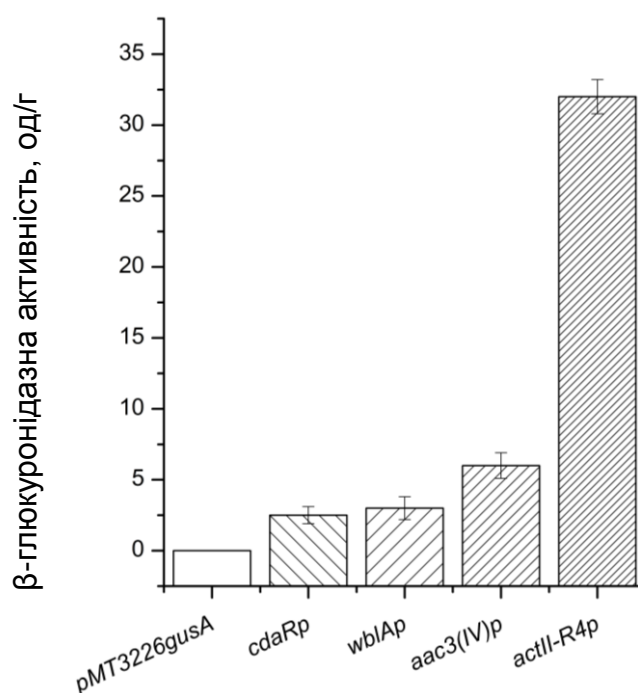


Рис.3.2 Порівняння активності гетерологічних промоторів *cdaR*, *wblA*, *actII-R4* та *aac(3)IV* в *A. teichomyceticus*.

Активність промотора *aac(3)IVp* була приблизно в 2-3 рази вищою, ніж активність *cdaRp* та *wblAp*, хоча і значно нижчою ніж активність *actII-R4p* (рис.3.2). Для дальших робіт з надекспресією генів було обрано саме *aac(3)IVp*. pSETPAm є підходящою платформою для клонування будь-яких генів для надекспресії в *A. teichomyceticus*. У подальшій роботі переважна більшість надекспресій генів в *A. teichomyceticus* відбувалася саме на платформі pSETPAm.

3.1.2. Надекспресія гена *frr_{AT}* в *A. teichomyceticus* із використанням плазмиди pSETPAm

Як один із підходів для отримання штамів стрептоміцетів, що надсинтезують антибіотики, нещодавно використано надекспресію гена фактора рециклінгу рибосом – *frr* [80, 87]. Білок RRF життєво важливий для бактерій. Його функція полягає у зв'язуванні з рибосомою наприкінці трансляції, що ініціює дисоціацію мРНК та рибосоми [58]. Надсинтез RRF в цілому збільшує життєздатність бактерійної клітини, що, зокрема, приводить до кращого накопичення біомаси та біосинтезу антибіотиків [80, 87].

Для нестрептоміцетних продуцентів антибіотиків вищезгаданий підхід ще не застосовувався. У геномі *A. teichomyceticus* ми знайшли ген *frr_{AT}*, що кодує власний RRF. Ми вирішили надекспресувати цей ген під контролем сильного конститутивного промотора *aac(3)IVp*, активність якого визначено у попередньому пункті (рис.3.1), у складі плазмиди pSETPAm. Це дозволить показати ефективність *aac(3)IVp* для надекспресії генів, що позитивно впливають на біосинтез тейкопланіну та життєздатність у *A. teichomyceticus*.

Так як після апраміцинового промотора у pSETPAm є послідовно сайти розпізнавання ендонуклеаз рестрикції EcoRV та EcoRI (рис.3.1), ген *frr_{AT}* було ампліфіковано за допомогою полімерази Pfu із використанням праймерів rrfAT_EV_F та rrfAT_ERI_R. У послідовність праймера rrfAT_EV_F включено сайт зв'язування рибосоми (GGAGG), розміщений на відстані 6 нуклеотидів від старт-кодону гена *frr_{AT}*. Амплікон клоновано у pSETPAm у сайти відповідних

ендонуклеаз рестрикції. Структуру отриманої рекомбінантної плазмиди pSETPAmrrf підтверджено за допомогою рестрикційного картування.

Плазмиду pSETPAmfrr далі перенесено у *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації із *E. coli* ET12567 pUZ8002. Екскон'юганти *A. teichomyceticus* *frr*_{AT}⁺ відбірано як стійкі до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл.

За умов росту в промисловому середовищі TM1, як описано в пункті 2.3.11, визначення продуктивності штаму *A. teichomyceticus* *frr*_{AT}⁺ на 5 добу культивування показало, що *A. teichomyceticus* *frr*_{AT}⁺ продукує в середньому майже у вісім разів більше тейкопланіну порівняно із штамом дикого типу (рис.3.3). Отже, надекспресія гена *frr*_{AT} збільшує рівень синтезу тейкопланіну подібно до того, як було у випадку стрептоміцетних продуцентів. Більше того, ця надекспресія забезпечується введенням додаткової копії гена *frr*_{AT} під контролем промотора *aac(3)IVp*, активність якого була досліджена у попередньому пункті.

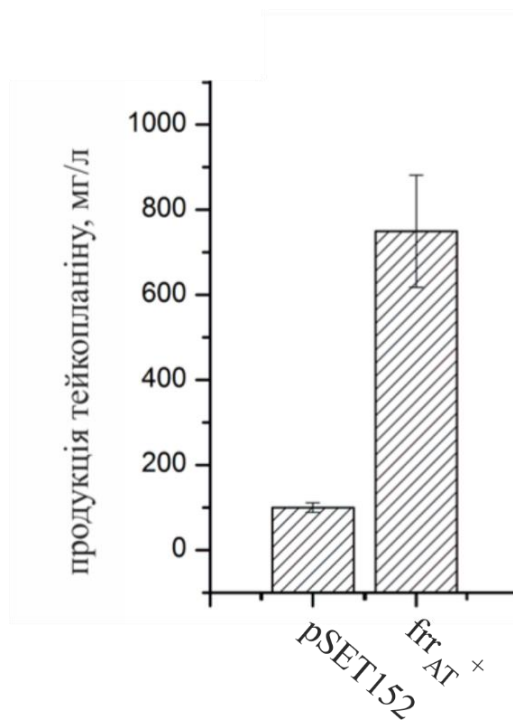


Рис.3.3 Вплив надекспресії гена *frr*_{AT} на рівень синтезу тейкопланіну.

В цьому підрозділі ми проаналізували активність набору гетерологічних промоторів в *A. teichomyceticus* за допомогою GusA-репортерної системи. Найбільш активним виявився промотор *actII-R4p*, менш активними – промотори

aac(3)IVp, *wblAp* та *cdaRp*. Відомо, що використання для експресії генів занадто сильних конститутивних промоторів накладає додатковий метаболічний тягар на бактерійні клітини і призводить до негативних побічних ефектів [112]. Враховуючи це, в дальшій роботі ми не використовували промотор *actII-R4p*. Натомість другий по силі промотор, *aac(3)IVp*, може бути використаний для надекспресії генів у *A. teichomyceticus*. Щоби підтвердити це, ми ввели додаткову копію гена *frr_{AT}* в *A. teichomyceticus* під контролем цього промотора. Як і очікувалося, це привело до збільшення рівня синтезу тейкопланіну. Найслабший промотор – *cdaRp* – в свою чергу може бути використаний для надекспресії генів, продукти яких є токсичними для *A. teichomyceticus*.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [50, 52, 172, 173].

3.2. Роль генів *tei3**, *tei10**, *tei11**, *tei13** та *tei30** у біосинтезі тейкопланіну

3.2.1. Роль генів глікозил-трансфераз *tei3** та *tei10** в біосинтезі тейкопланіну

У кластері генів біосинтезу тейкопланіну присутні три гени, що кодують глікозил-трансферази – *tei1*, *tei3** та *tei10** [81]. Попередні біохімічні аналізи *in vitro* показали, що *Tei1* та *Tei10** здатні переносити GlcNAc на 6 та 4 (див. рис. 1.1) амінокислотні залишки аглікону відповідно [81]. У свою чергу, *Tei3** є представником 39 родини глікозилтрансфераз [15] і, найімовірніше, використовує ундекапренілфосфоманозу як донор для манозилування 7 амінокислотного залишку аглікону тейкопланіну (рис. 1.1). Однак, трансферази 39 родини (і, отже, *Tei3**) є мембрано-асоційованими білками, що унеможливило аналіз *in vitro* їхніх функцій та специфічності.

Для дослідження функцій ферментів, кодованих генами *tei3** та *tei10**, *in vivo* вирішено створити мутанти за цими генами та дослідити комплекси сполук, які вони продукують. На основі отриманих даних можна буде реконструювати послідовність реакцій глікозилування аглікону тейкопланіну.

Мутанти за генами глікозил-трансфераз були створені за допомогою методу Redirect (див. пункт 2.3.17). Для цього, кодуючі послідовності генів *tei3** та *tei10** на косміді 4B2hyg [51] (похідна косміди 4B2 [81], в якій ген стійкості до канаміцину (*neo*) замінений на ген стійкості до гігromіцину (*hyg*)) були заміщені касетами стійкості до апраміцину (*aac(3)IV*). Касети стійкості до апраміцину було ампліфіковано за допомогою пар праймерів *tei10*DelForw/Rev*, *tei3*DelForw/Rev*, для нокауту кожного відповідного гена. Рекombінантні косміди 4B2hyg*tei10*::aac(3)IV* та 4B2hyg*tei3*::aac(3)IV* було введено до *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 pUZ8002. Штами із нокаутами генів *tei3** та *tei11** відібрано як стійкі до апраміцину та чутливі до гігromіцину. Для перевірки заміщення відповідних генів на *aac(3)IV*, послідовність *aac(3)IV* ампліфікована за допомогою пари праймерів Am_F/R із сумарної ДНК рекombінантних штамів. Рекombінантні штами *A. teichomyceticus*

tei10::aac(3)IV* та *A. teichomyceticus tei3*::aac(3)IV* вирощено в продукційному середовищі ТМ1 згідно із методикою, описаною в пункті 2.3.11.

Аналіз продукції антибіотика штамми *A. teichomyceticus tei10*::aac(3)IV* та *tei3*::aac(3)IV* показав помітні відмінності від штаму дикого типу. Мутант зі зруйнованим геном *tei3** продукував деманозильовані похідні тейкопланіну. ВЕРХ-МС аналіз екстрактів виявив дві нові сполуки із молекулярними масами 1716 та 1730 Да (рис.3.4).

A. teichomyceticus tei3::aac(3)IV*

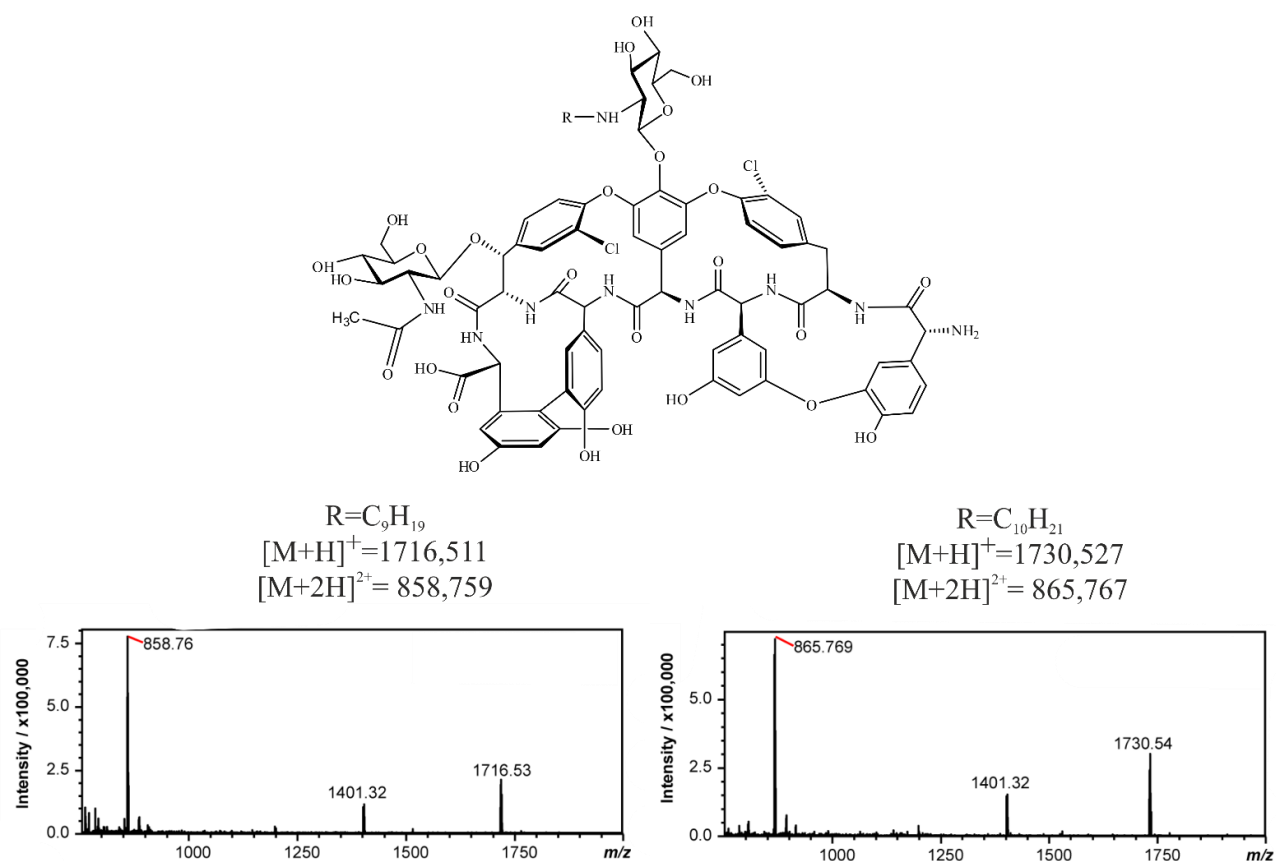


Рис.3.4 Структурна формула деманозильованих похідних тейкопланіну, що продукувалися штамом *A. teichomyceticus tei3*::aac(3)IV* та відповідні МС профілі. Похідні відрізняються лише довжиною бічного аліфатичного ланцюга (R).

Обидві маси відповідають деманозильованим похідним тейкопланіну із приєднаними C10 та C11 бічними ацильними ланцюгами, що підтверджено дальшими МС-МС аналізами. Цікаво, що мутант *tei3*::aac(3)IV* не продукував навіть слідів інших частково глікозильованих похідних тейкопланіну. Це вказує

на те, що інші дві глікозилази (*tei1* та *tei10**) здатні високо-специфічно розпізнавати як субстрат неманозильований аглікон тейкопланіну. Також, присутність похідних із масами 1716 та 1730 Да свідчить, що ацетил-трансфераза *Tei11** розпізнає як субстрат неманозильований аглікон тейкопланіну.

У свою чергу, результати ВЕРХ-МС аналізу екстракту культуральної рідини показали, що штам із зруйнованим геном *tei10** продукував лише один варіант тейкопланіну – сполуку із молекулярною масою 1360 Да. Така молекулярна маса відповідає манозильованому тейкопланіновому аглікону. Жодних інших похідних тейкопланіну в екстрактах не виявлено. Присутня також невелика кількість сполуки із молекулярною масою 1198 Да, що відповідає тейкопланіновому аглікону (рис.3.5).

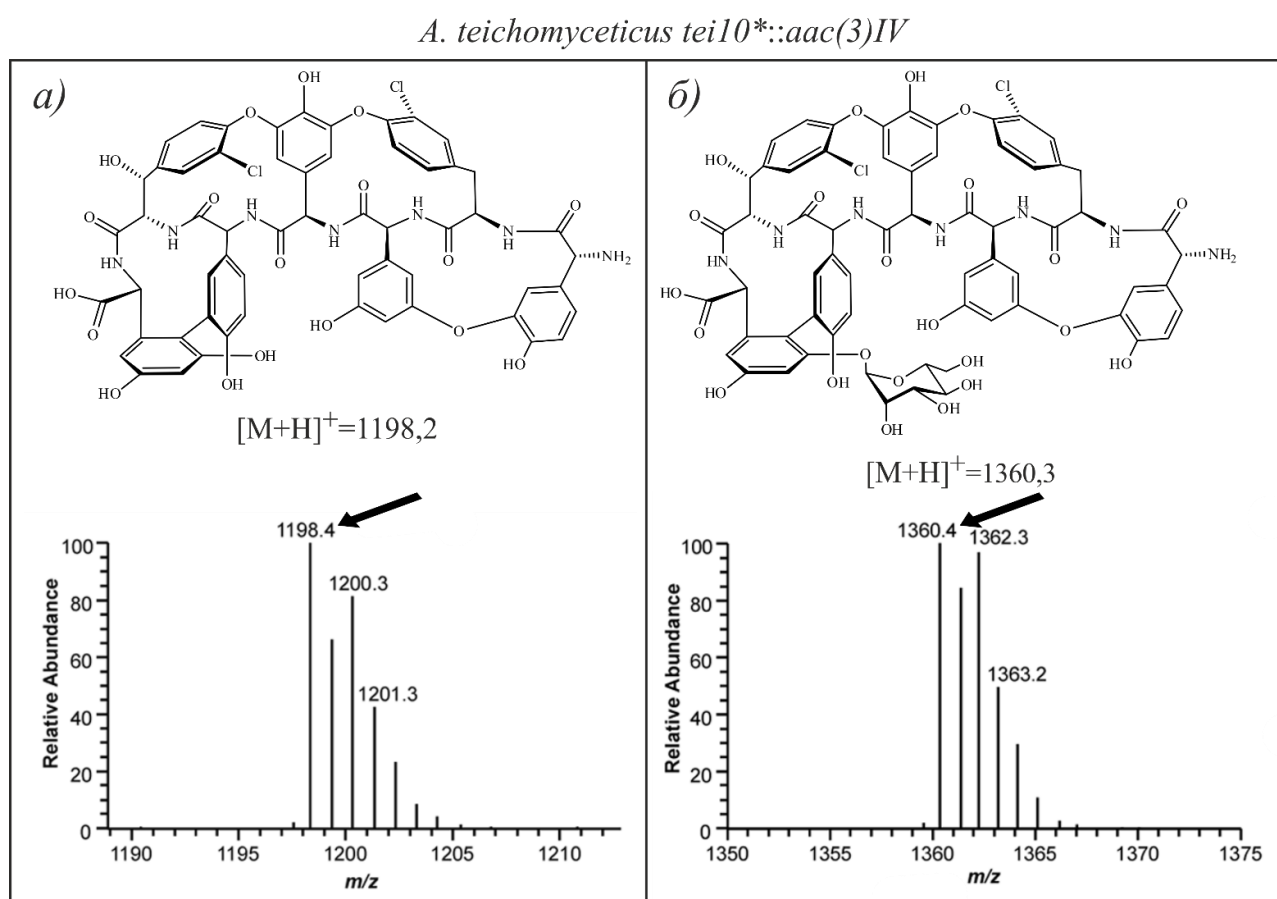


Рис.3.5 Структурні формули сполук, що продукуються штамом *A. teichomyceticus tei10*::aac(3)IV* та відповідають: а) – аглікону тейкопланіну (1198,2 КДа), б) – манозильованому аглікону тейкопланіну (1360,3 КДа), та їх МС-профілі з характерними розподілами ізотопів цих похідних.

Подібний результат є цілком очікуваним, враховуючи попередні дослідження активності *Tei10** *in vitro* [81]; більше того, було показано [81], що *Tei1* має вкрай низьку афінність до немодифікованого тейкопланінового аглікону і здатний переносити GlcNAc на 6 амінокислотний залишок лише такого аглікону, який попередньо глікозильований по 4 амінокислотному залишку. Що більш важливо, виходячи із отриманих нами даних стає очевидною висока активність манозилази *Tei3** до такого субстрату як аглікон тейкопланіну.

Отже, із результатів, отриманих нами, а також результатів попередніх досліджень [81] можна зробити висновок, що глікозилази *Tei10** та *Tei1* функціонують одна за одною у процесі біосинтезу тейкопланіну. Натомість, *Tei3** скоріше за все володіє високою афінністю як до неглікозильованого аглікону, так і до його глікозильованих версій і функціонує по мірі появи цих субстратів.

3.2.2. Роль генів, що кодують ферменти, задіяні у приєднанні аліфатичного ланцюга в процесі біосинтезу тейкопланіну

Попередні дослідження біохімічних властивостей *Tei11** *in vitro* показали, що він функціонує як ацетилтрансфераза [81]. Проте, роль цього ферменту в біосинтезі тейкопланіну *in vivo* досліджена не була. Тому, ми вирішили створити мутант *A. teichomyceticus* за геном *tei11** та проаналізувати похідні тейкопланіну, що будуть ним продукуватися. Дослідження *tei11** *in vivo* є важливим ще й тому, що це може пролити світло на послідовність реакцій декорування тейкопланінового аглікону.

Ген *tei11** було зруйновано із використанням Redirect. Послідовність гена *tei11** в косміді 4B2hyg було замінено на *aac(3)IV*, що була ампліфікована за допомогою пари праймерів *tei11RedR/F*. Для аналізу продукції рекомбінантний *tei11*::aac(3)IV* штам вирощувався в середовищі TM1.

Аналіз показав, що *A. teichomyceticus tei11*::aac(3)IV* не продукував стандартних A_{2-1} - A_{2-5} сполук комплексу тейкопланіну. Натомість, ВЕРХ-МС аналіз культуральних екстрактів рекомбінантних штамів виявив (рис.3.6) дві нові

A. teichomyceticus *tei11*::aac(3)IV*

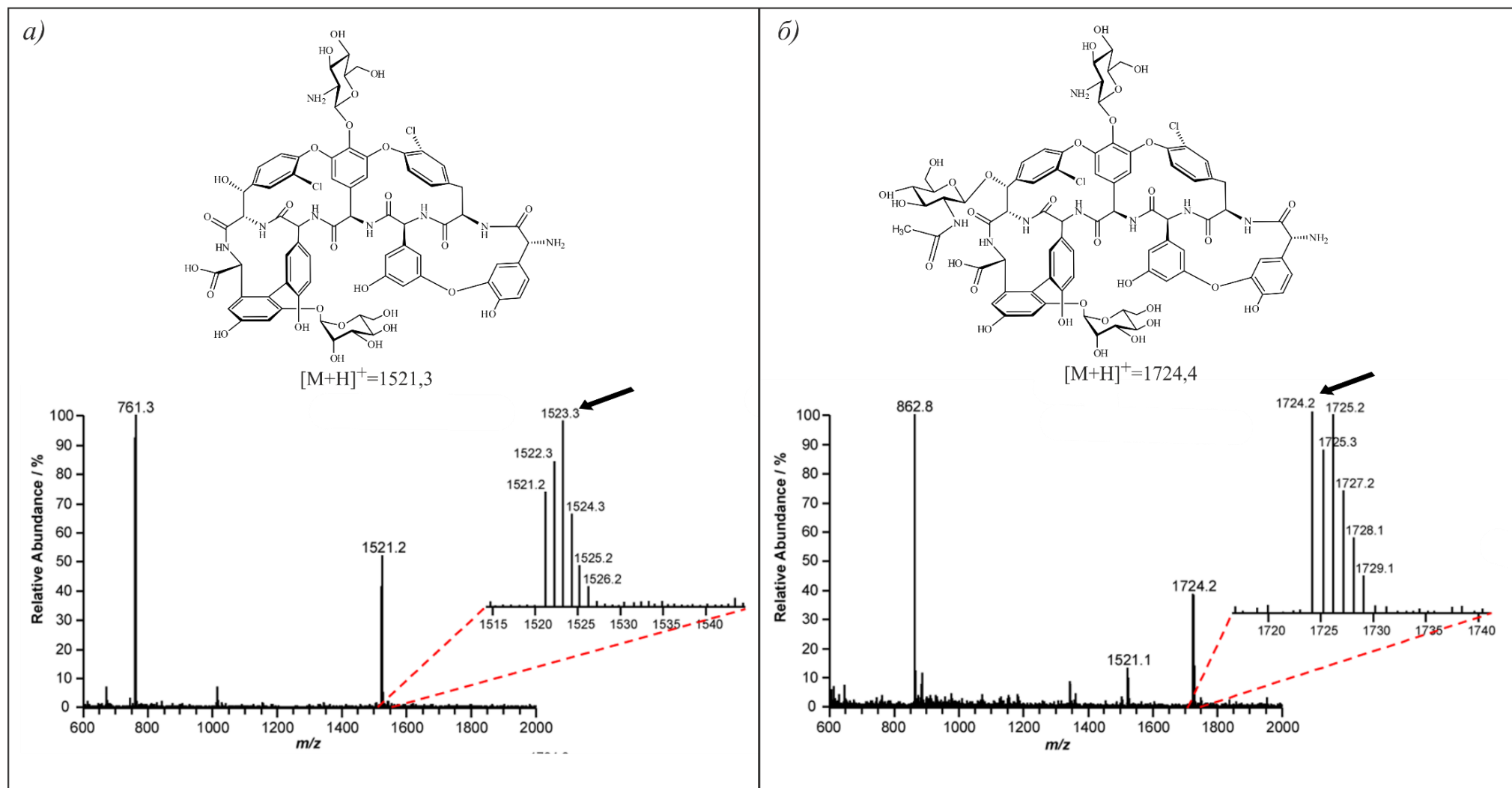


Рис.3.6 Структурні формули похідних тейкопланіну, що продукувалися штамом *A. teichomyceticus* *tei11*::aac(3)IV* та їх ВЕРХ-МС-спектри, які відповідають: а) деацільованому тейкопланіну без одного GlcNAc (1521,3 кДа); б) глікозильованому аклікону тейкопланіну (1724,4 кДа).

сполуки із молекулярними масами 1521 та 1724 кДа, що відповідають похідним тейкопланіну без бічного ацильного ланцюга (поряд із слідовими кількостями сполуки із молекулярною масою 1487, що є дехлорованою формою сполуки із молекулярною масою 1521 кДа). Похідна з молекулярною масою 1724 відповідала деацильованому тейкопланіну (рис.3.6, *a*), а із масою 1521 – деацильованому тейкопланіну без залишку GlcNAc, приєднаного до 6 амінокислотного залишку пептидного кору (рис.3.6, *b*).

Дані ВЕРХ-МС аналізу також дали змогу оцінити співвідношення між похідними тейкопланіну із масами 1487, 1521 та 1724 кДа. Превалюючою сполукою виявилася похідна тейкопланіну із молекулярною масою 1521 (біля 90%).

Отже, дані аналізу *in vivo* доводять, що ген *tei11** кодує ключовий фермент, який забезпечує приєднання ліпідного бічного ланцюга в процесі біосинтезу тейкопланіну. Більше того, перелік похідних тейкопланіну, що продукувалися штамами *tei11*::aac(3)IV* проливає світло на особливості функціонування глікозилтрансферази Tei1: 90% деацильованих похідних тейкопланіну, які продукувалися штамами *tei11*::aac(3)IV*, були без залишку GlcNAc на шостій амінокислоті аглікону. Це дає підстави висловити припущення про Tei1, як про фермент із винятковою афінністю до ацильованих попередників тейкопланіну; варто також звернути увагу на те, що Tei1 таки спроможний приєднувати залишки GlcNAc до неацильованих попередників тейкопланіну, хоча і з низькою частотою. Все це говорить про те, що приєднання бічного ліпідного ланцюга в процесі біосинтезу тейкопланіну відбувається після реакції, каталізованої Tei10*; після функціонує глікозилтрансфераза Tei1.

Роль продуктів генів *tei13** та *tei30** раніше ніколи не досліджувалася. Наявність цих генів в кластері біосинтезу тейкопланіну скоріше за все свідчить про те, що їх продукти можуть брати участь у біосинтезі ацил-КоА-субстрату для Tei11*.

Біоінформатичний аналіз вказує на те, що *tei13** кодує ймовірну ацил-КоА-синтазу/ацил-АМФ-лігазу. Отже, Tei13* може каталізувати АТФ-

залежне приєднання вільних ланцюгів жирних кислот до КоА, що в свою чергу забезпечуватиме надлишок субстрату для нормального функціонування *Tei11**. В інших кластерах глікопептидних антибіотиків ортологи *Tei13** практично не зустрічаються. Дуже близький гомолог, з 84% ідентичністю амінокислотної послідовності кодується лише геном кластера, що був знайдений в геномі некультивованого ґрунтового ізолянта *esnapd_15* (KF264554, [103]). Ще один досить близький гомолог (56% ідентичності) присутній в геномі (контіг WP_052704666, [6]) *S. tsukubaensis*. Геномний контекст відповідного гена, що кодує гомолог, може свідчити про наявність в WP_052704666 слідів кластера, що кодує тейкопланін-подібний глікопептид. На додачу, *Tei13** є на 42% ідентичним до *DptE*, добре охарактеризованого білка, що відповідає за активацію C8-C12 жирних кислот в біосинтезу даптоміцину [152].

У свою чергу, *Tei30** є потенційною тіоестеразою II типу, на 41% ідентичною до добре дослідженої тіоестерази II типу *RifR* з *Amycolatopsis*. *Tei30** може виконувати гідроліз ацильних ланцюгів, що приєднані до синтаз жирних кислот чи до ацетил-КоА, тим самим забезпечуючи пул субстратів для *Tei13**. По-друге, *Tei30** може виконувати функцію відщеплення помилкових мономерів від РСР в процесі роботи НРПС біосинтезу тейкопланіну. Найближчий досліджений гомолог *Tei30** – *RifR* – власне і виконує подібну функцію по відщепленню помилкових субодиниць з рифаміцинових ПКС. Проаналізувавши інші описані кластери біосинтезу глікопептидних антибіотиків, ми також помітили що жоден з них не має генів, що кодували б ортологів *Tei30**. Для того, щоби показати роль *Tei13** та *Tei30** в процесі біосинтезу тейкопланіну ми вирішили нокаутувати відповідні гени та проаналізувати продукцію тейкопланіну створеними рекомбінантними штамми.

Гени *tei13** та *tei30** було зруйновано також із використанням Redirect (див. пункт 2.3.17). Послідовність гена *tei13** в косміді 4B2hyg було замінено на *aac(3)IV*. Касета *aac(3)IV* ампліфікована за допомогою пари праймерів

*tei13*DelRev/Forw*. Заміна кодувальної послідовності *tei30** була здійснена на косміді JB7hyg (похідне косміди JB7, в якому ген стійкості до канаміцину замінений на ген стійкості до гігromіцину); *aac(3)IV* для цього було ампліфіковано із використанням пари праймерів *tei30*DelForw/Rev*. Для аналізу продукції рекомбінантні *tei13*::aac(3)IV*, *tei30*::aac(3)IV* штамми вирощувалися в середовищі TM1.

Виявилося, що мутанти *A. teichomyceticus* за відповідними генами продукували комплекс тейкопланіну, що не відрізнявся від комплексу, який продукується штамом дикого типу. Отже, продукти генів *tei13** та *tei30** не є важливими для нормального біосинтезу тейкопланіну.

Підсумовуючи результати цього підрозділу варто відзначити, що ми вперше встановили найімовірнішу послідовність реакцій ацилювання та глікозилювання аглікону тейкопланіну *in vivo*. Ця послідовність, що впливає із даних порівняння продукції похідних тейкопланіну різними мутантними штамми, зображено на рисунку 3.7. Наші дані вказують на те, що Tei10* спершу приєднує GlcNAc до тейкопланінового аглікону, утворюючи GlcNAc-AGT. Після цього відбувається деацетилювання GlcNAc, найімовірніше для цього задіюється деацетилаза Tei2* [142]. До продукту попередньої реакції Tei11* приєднує ацильну групу, даючи *N*-ацилглюкозамініл-AGT. Далі, Tei1 приєднує залишок GlcNAc до 6 амінокислоти аглікону.

Накінець, Tei3* каталізує останню реакцію, продуктом якої є повноцінний тейкопланін, приєднуючи залишок манози до 7 амінокислотного залишку аглікону. Внаслідок очевидної субстратної неспецифічності Tei3* важко встановити точне положення реакцій манозилування в послідовності реакцій декорування AGT. Tei3* цілком ймовірно може функціонувати раніше в послідовності реакцій, як зображено червоним на рис. 3.7: в цьому разі саме аглікон може служити субстратом для Tei3*, або каталізувати реакцію манозилування використовуючи як субстрат *N*-ацилглюкозамініл-AGT (як показано синім на рис. 3.7).

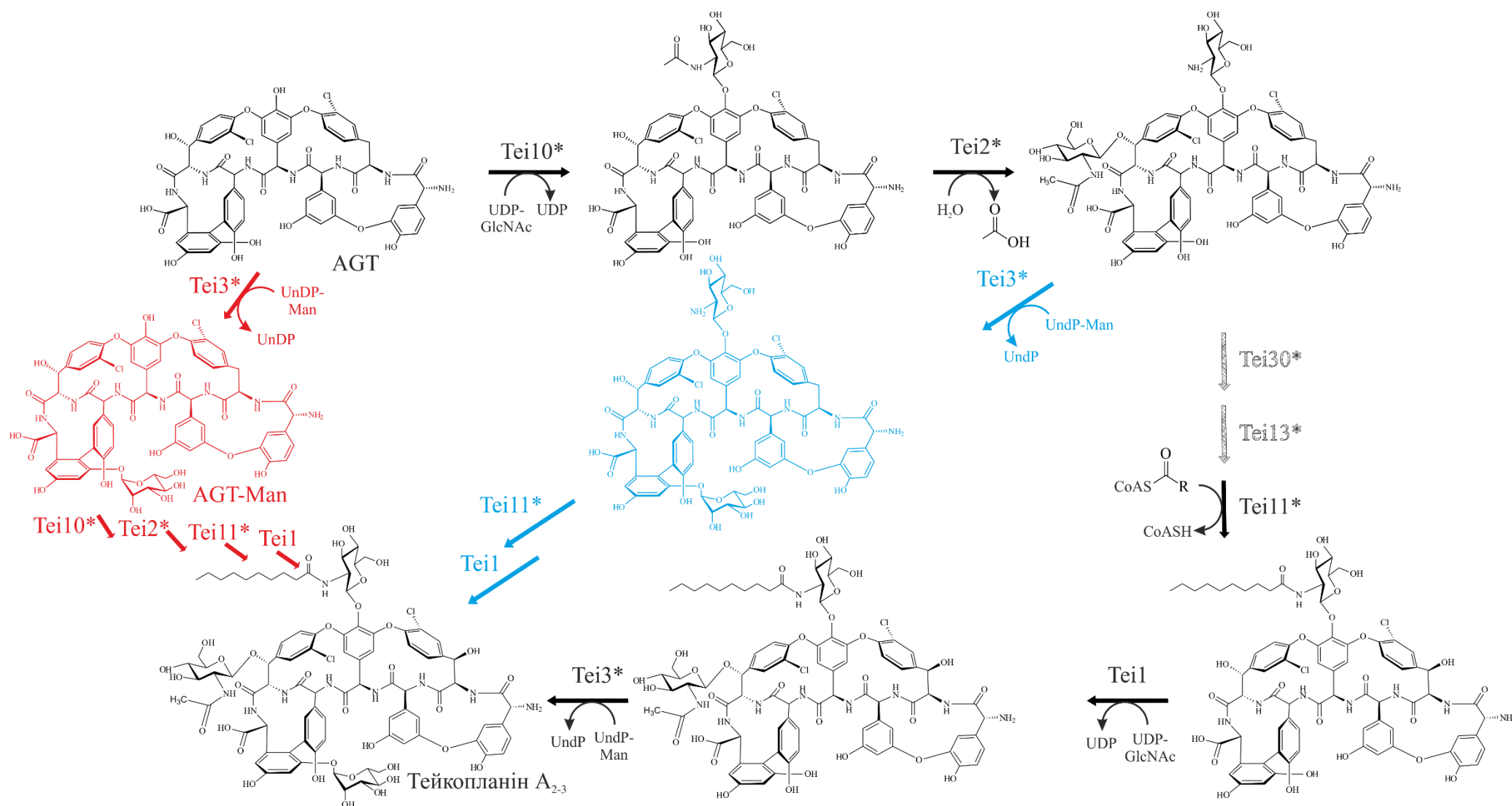


Рис. 3.7 Запропонована послідовність реакцій декорації аглікону тейкопланіну (AGT), де AGT-Man – манозильований AGT; UDP – уридиндифосфат; UDP-GlcNAc – N-ацетилглюкозамініл уридиндифосфат; UndP – ундекапренілфосфат; UndP-Man – манозил ундекапренілфосфат; CoASH – кофермент А. Коментарі в тексті.

Запропонована схема узгоджується із даними біохімічного аналізу деяких ферментів модифікації тейкопланінового аглікону *in vitro* і значно доповнює їх. Зокрема, стає зрозумілим, коли відбувається ацилювання попередника тейкопланіну, а також проясняється субстратна специфічність Tei10* та Tei1 *in vivo*. Наші дані також показують, що гени *tei13** та *tei30** не важливі для нормального біосинтезу тейкопланіну.

Матеріалами цього підрозділу опубліковано в [164].

3.3. Особливості шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну у *A. teichomyceticus*

Безпосередніми, а інколи і єдиними ідентифікованими, регуляторами біосинтезу вторинних метаболітів є шлях-специфічні транскрипційні регулятори, що кодуються генами, розміщеними в межах самих генних кластерів [3, 108, 109, 116]. Маніпулювання позитивними шлях-специфічними регуляторами часто використовують для збільшення рівнів біосинтезу важливих вторинних метаболітів [54, 109].

У кластері генів біосинтезу тейкопланіну знайдено три гени, що кодують білки, які можуть розглядатися як шлях-специфічні регулятори. Це *tei15**, *tei16** та *tei31** (див рис. 1.5 огляду літератури). Перші два з них кодують білки StrR- та LuxR-родин, а третій – ДНК-зв'язувальний білок з невизначеною функцією. Попередніми дослідженнями встановлено, що *Tei15** та *Tei16** є позитивними регуляторами біосинтезу тейкопланіну. Надекспресія генів *tei15** і *tei16* зумовлює значне підвищення рівня синтезу тейкопланіну, а їх нокаут повністю припиняють біосинтез цього антибіотика. Дослідження ДНК-зв'язувальних властивостей білків *Tei15** і *Tei16** а також біоінформатичний аналіз дали змогу встановити ймовірні сайти зв'язування *Tei15** в промоторно-операторних ділянках деяких генів кластера генів біосинтезу тейкопланіну [51].

Хоча всі ці дані дають підставу охарактеризувати *Tei15** та *Tei16** як ключові позитивні регулятори біосинтезу тейкопланіну, їх регулони, зокрема регулон *Tei16**, в кластері генів біосинтезу тейкопланіну залишаються невизначеними. Невстановленим є й ієрархічний взаємозв'язок між цими білками. Не відомо також, чи ген *tei31** контролює біосинтез тейкопланіну. З'ясування цих питань було метою цього підрозділу роботи.

3.3.1. Нокаут та надекспресія гена *tei31**

Біоінформатичний аналіз імовірної амінокислотної послідовності регулятора *Tei31.** Ген *tei31** кодує білок з 539 а. з. Для того, щоб з'ясувати його імовірні функції, ми здійснили пошук гомологів *Tei31** в інших

актинобактерій. Виявилося, що найближчими гомологами Tei31* є регулятори, анотовані як AfsR-подібні плейотропні регулятори [78] деяких представників родини *Micromonosporaceae* та *Pseudonocardiaceae*.

У *S. coelicolor* AfsR є регулятором вторинного метаболізму [145]. Цей білок починає зв'язувати промоторно-операторні регіони генів-мішеней після фосфорилювання сенсорними серин-треоніновими кіназами, у тому числі AfsK. Загалом, для AfsR-подібних білків характерна наявність SARP-подібного ДНК-зв'язувального та АТФ-азного доменів. В них також присутній тетратрикопептид-вмісний N-термінальний домен. Так як тетратрикопептидні повтори беруть участь у формуванні білок-білкових інтерфейсів, цілком можливим є те, що вони важливі для комплексу AfsR із AfsK при фосфорилюванні, однак експериментальних доказів цього немає [114].

Пошук консервативних доменів в амінокислотній послідовності білка Tei31* виявив HlrB-подібний ДНК-зв'язувальний домен «петля-поворот-петля», а також нуклеотид-зв'язувальний домен. Тетратрикопептид-вмісний домен відсутній. Загалом, така архітектура лише віддалено нагадує класичні стрептоміцетні AfsR-подібні білки. Як вже зазначалося вище, ближчими є AfsR-білки, кодовані геномами *Micromonosporaceae*. Для них також характерна наявність HlrB-ДНК-зв'язувального домену як у Tei31* (рис.3.8), однак присутній і тетратрикопептид-вмісний домен (як у AfsR стрептоміцетного типу, рис.3.8).

Отже, Tei31* можна охарактеризувати як ДНК-зв'язувальний білок, ймовірний транскрипційний регулятор. Він володіє HlrB-подібним ДНК-зв'язувальним доменом, а також НТФ-азним доменом, чим нагадує AfsR-подібні плейотропні регулятори. Важливим є те, що в Tei31* відсутній тетратрикопептид-вмісний домен, який в AfsR-білків стрептоміцетів ймовірно бере участь у формуванні комплексів із кіназами.

Далі ми проаналізували кластери генів біосинтезу глікопептидів на наявність ортологів Tei31*. Це були кластери біосинтезу UK-68,597, баліміцину, ванкоміцину, рістоміцинів, хлороеремоміцину, A40926, A47934 та

кластери з неідентифікованих бактерій з ґрунтових ізолятів (KF192710, Y16952, HE589771, KJ364518, CP008953, AJ223998-9, AJ561198, STU82965 та EU874252, HM486074, HM486076, KF264554 відповідно). У жодному з них, навіть у такому близькому до тейкопланінового кластері як UK-68597, не знайдено ортологів *Tei31**, як і взагалі AfsR-подібних регуляторних білків.

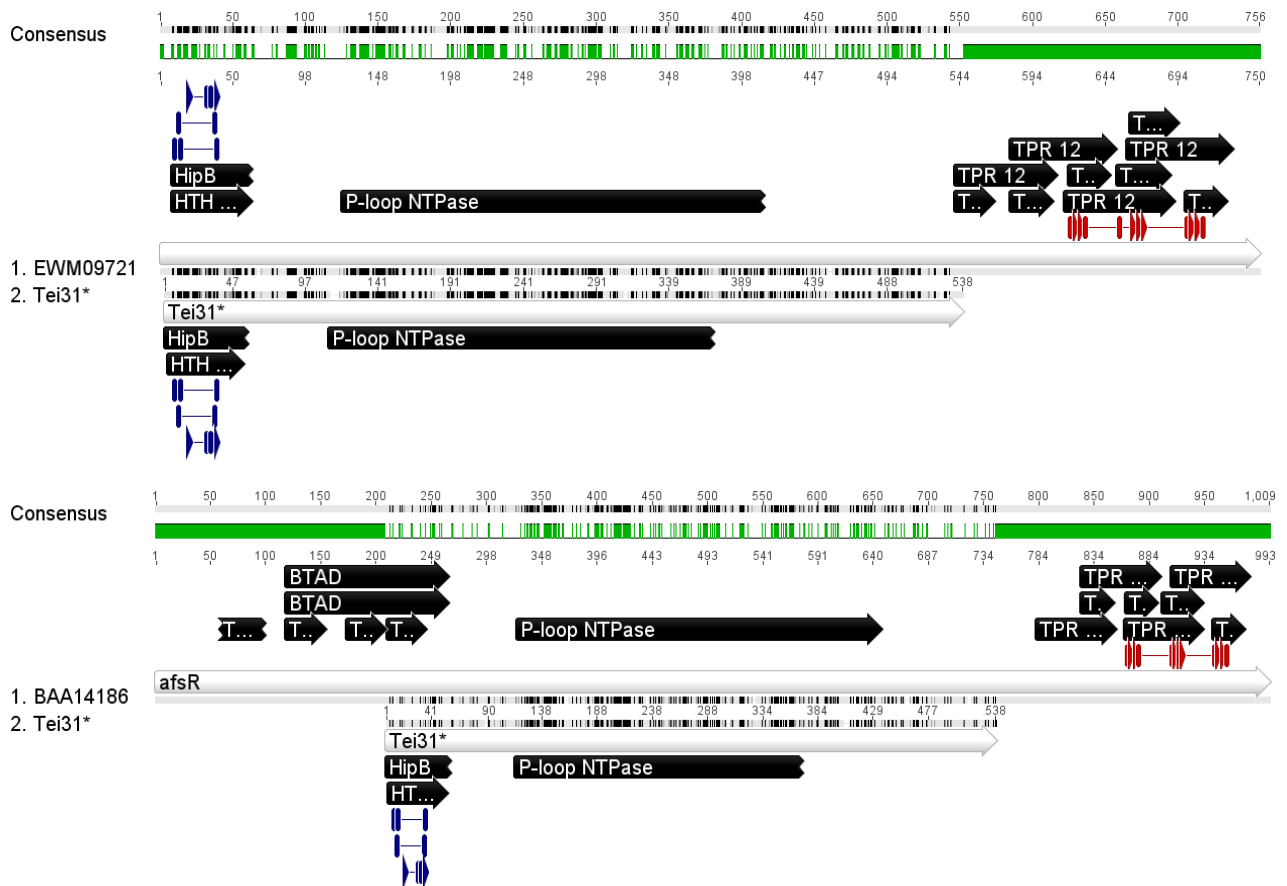


Рис.3.8 Попарне вирівнювання амінокислотної послідовності білка *Tei31** та білків EWM09721 (AfsR-подібного білка *Kutzneria* sp. 744) та BAA14186 (AfsR з *S. coelicolor*); з першим *Tei31** об'єднує ДНК-зв'язувальний домен (HipB-HTH) та НТФ-азний домен (P-loop NTPase); з останнім – лише НТФ-азний домен. Фіолетовим показано ДНК-зв'язувальний інтерфейс HipB-подібного HTH-домену, а червоним – білок-білковий інтерфейс, утворений тетратрикопептидними мотивами (що відсутні у *Tei31**).

Нокаут та надекспресія гена *tei31.** Для того, щоб встановити чи *Tei31** має вплив на біосинтез тейкопланіну, ми вирішили нокаутувати та надекспресувати *tei31** і дослідити рівень синтезу тейкопланіну в отриманих

рекомбінантних штамів. Також було вивчено вплив нокауту та надекспресії на морфологію рекомбінантних штамів *tei31**.

Нокаут *tei31** здійснено за допомогою технології напрямленого мутагенезу Redirect (див. пункт 2.3.17 матеріалів та методів). Кодуючу послідовність гена *tei31** заміщено на касету стійкості до апраміцину, ампліфіковану за допомогою пари праймерів *tei31REDF/R*, на косміді JB7hyg.. Отриману рекомбінантну космиду JB7hyg*tei31*::aac(3)IV* перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 pUB307. Штами з нокаутом гена *tei31** відібрали як стійкі до апраміцину та чутливі до гігromіцину. Для перевірки заміщення *tei31** на *aac(3)IV* послідовність останнього ампліфіковано за допомогою пари праймерів Am_F/R із сумарної ДНК рекомбінантних штамів.

Надекспресію гена *tei31** під контролем власного промотора здійснено в інтегративному векторі pSET152. Для цього хромосомну ділянку, що містила кодуючу послідовність *tei31** із ймовірною промоторно-операторною ділянкою, ампліфіковано за допомогою пари праймерів 311/312 із використанням високоточної полімерази Phusion. Отриманий амплікон клоновано у вектор pJET1.2. та секвеновано. Фрагмент розміром 1893 п.н., що містив амплікон, виділено з рекомбінантної плазмиди на основі pJET1.2. за допомогою ендонуклеаз рестрикції EcoRI та EcoRV та клоновано в плазмиду pSET152 у відповідні сайти. Отриману плазмиду pSET*Tei31** перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 pUB307. Транскон'юганти відібрано як стійкі до апраміцину в концентрації 100 мкг/мл.

Ми дослідили синтез тейкопланіну в штамів із надекспресією (*tei31*⁺*) та в мутанта за геном *tei31** (*tei31*::aac(3)IV*). Виявилося, що ні *tei31*⁺*, ні *tei31*::aac(3)IV*, не відрізняються від *A. teichomyceticus* дикого типу за рівнем синтезу тейкопланіну (рис.3.9, а). Нокаут та надекспресія *tei31** не мали також впливу на морфологію колоній за умов росту на різних середовищах (рис.3.9, б). Не було помічено відмінностей між дослідженими штамів і на мікроморфологічному рівні.

Аналіз експресії гена *tei31.** Цікаво було дослідити, чи ген *tei31** взагалі експресується за умов, в яких у клітинах *A. teichomyceticus* синтезується тейкопланін. Для цього відібрано зразки біомаси *A. teichomyceticus* дикого типу, що вирощений в середовищі ТМ1, на 48, 72, 96 та 120 години росту. Із зразків виділено сумарну РНК, яку використали для синтезу кДНК. Наявність кДНК *tei31** в продуктах зворотної транскрипції тестували за допомогою ПЛР із використанням праймерів *tei31_RT_F/R*. В усіх проаналізованих зразках не виявлено кДНК *tei31** (рис.3.9, в).

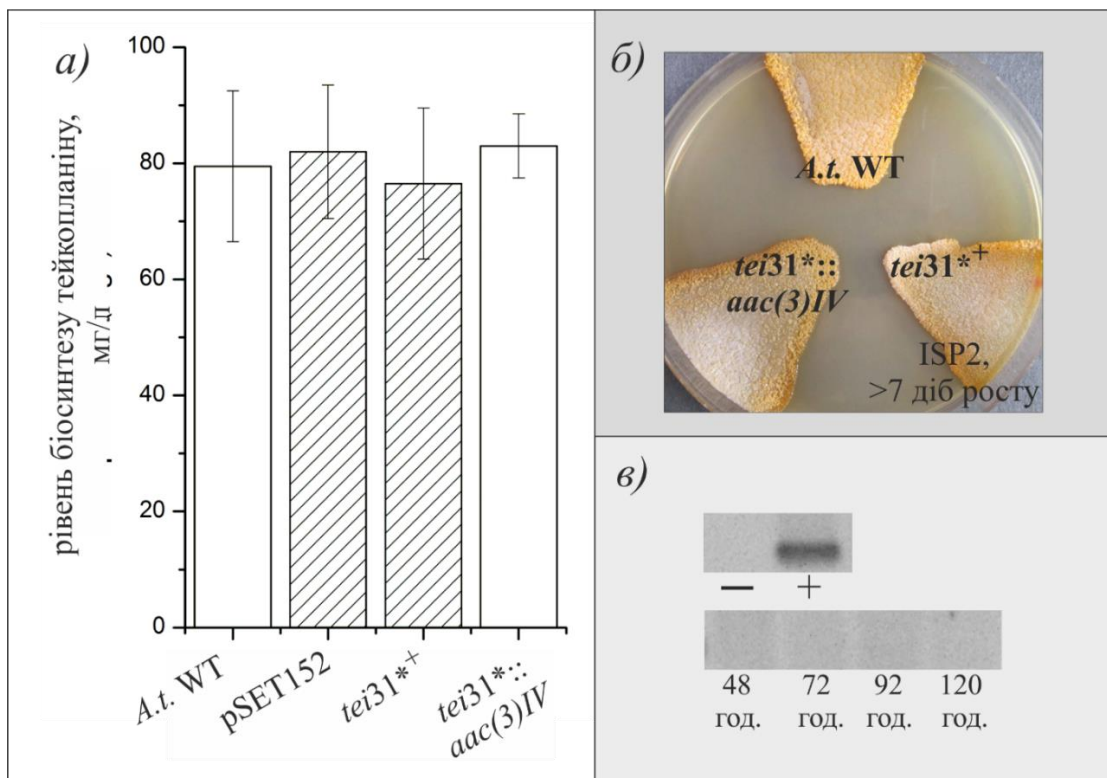


Рис.3.9 Рівень біосинтезу тейкопланіну (а) у штамів із нокаутом (*tei31*::aac(3)IV*) та надекспресією (*tei31*+*) гена *tei31** та їхня морфологія (б) на середовищі ISP2; в) відсутність експресії гена *tei31** в різних часових точках росту *A. teichomyceticus* дикого типу в середовищі ТМ1.

Отже, на основі усіх отриманих даних можна зробити висновок, що продукт гена *tei31** не задіяний в регуляції біосинтезу тейкопланіну за умов вирощування в середовищі ТМ1. Більше того, цей ген не експресується за умов росту, коли в клітинах *A. teichomyceticus* синтезується тейкопланін. Дискусійним залишається запитання, чи входить *tei31** в склад кластера генів біосинтезу тейкопланіну.

3.3.2. Дослідження транскрипційної організації кластера біосинтезу тейкопланіну.

Кластери генів біосинтезу глікопептидних антибіотиків різняться за організацією та кількістю відкритих рамок зчитування. Наприклад, кластер біосинтезу ванкоміцин-подібного антибіотика баліміцину містить більше тридцяти відкритих рамок зчитування [116]. На транскрипційному рівні більшість генів цього кластеру є окремими транскрипційними одиницями. Експериментально доведено присутність в ньому принаймні трьох полігенних транскрипційних одиниць [116, 105, 107]. Натомість у кластері біосинтезу антибіотика А40926 37 відкритих рамок зчитування організовані у 8 полігенних та 5 моногенних транскрипційних одиниць [2]. Із особливостей транскрипційної організації вищезгаданих кластерів помітно тенденції до об'єднання у оперони генів НРПС та генів біосинтезу непротеїногенних амінокислот, що входять до складу антибіотиків.

До початку наших досліджень спроб встановити транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну не було. Про те, що деякі гени *tei*-кластера можуть об'єднуватися в оперони, можна посередньо судити за даними літератури. Так, гени *tei7-5* та *tei3-2*, продукти яких забезпечують стійкість до тейкопланіну, є очевидними ортологами *vanHAX*- та *vanRS*-кластерів [7]. Те, що гени *tei7*, *tei6*, *tei5* є полігенною транскрипційною одиницею доведено експериментально [7].

Далі, у всіх продуцентів глікопептидних антибіотиків *vanRS*-кластери також є полігенними транскрипційними одиницями. Нуклеотидна послідовність *tei3* та *tei2* ідентична до послідовностей ортологів з інших кластерів біосинтезу глікопептидів, зокрема А40926. Це вказує на те, що ділянка генів *tei3* та *tei2* також є полігенною транскрипційною одиницею.

Утім, приналежність решти генів *tei*-кластера до певних транскрипційних одиниць неможливо передбачити лише за порівнянням з кластерами генів біосинтезу інших глікопептидів, оскільки кластери генів біосинтезу А40926, баліміцину і тейкопланіну не колінеарні.

Спочатку ми здійснили передбачення потенційних полігенних транскрипційних одиниць в *tei*-кластері. Ми прийняли, що у випадках, коли відстань між генами становить більше ніж 250 п.н., слід однозначно вважати, що ці гени є окремими транскрипційними одиницями. Більше того, згідно із базою даних оперонів DOOR² (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/displayNCstatistics.php?id=585>) міжгенні ділянки в оперонах стрептоміцетів рідко досягають розміру 90 п.н., а в оперонах мікромоноспорових – 160 п.н. У разі перекривання сусідніх генів ми приймали, що такі гени належать до однієї транскрипційної одиниці. Отже, всі гени *tei*-кластера, оточені міжгенними ділянками більшими ніж 160 п.н., вважалися моногенними транскрипційними одиницями. Із 13 міжгенних ділянок потенційних оперонів розмірами від 28 до 143 п.н. ми експериментально проаналізували такі: *teiB-teiC*, *teiD-tei1**, *tei2-tei3**, *tei5*-tei6**, *tei6*-tei7**, *tei8*-tei9**, *tei19*-tei20**, *tei20*-tei21**, *tei22*-tei23**, *tei23*-tei24** (рис.3.10). Виявлення транскрипційних одиниць *tei*-кластера здійснено за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією. Ми ампліфікували міжгенні ділянки в потенційних оперонах цього кластера. У разі, якщо транскрипція сусідніх генів формує одну мРНК, використання таких пар праймерів приводило до появи відповідного сигналу. Коли ж гени є окремими транскрипційними одиницями, то такий сигнал був відсутній.

У випадках міжгенних ділянок *tei5*-tei6*-tei7** було отримано позитивні сигнали (рис.3.10), що підтверджує наявність оперона. Аналогічні дані отримано для міжгенних ділянок *teiB-C* та *teiD-1**. Оперонну організацію підтверджено також і для ділянки *tei17*-tei23**. Ген *tei24** виявився окремою транскрипційною одиницею, хоча він відділений від попереднього гена лише 35 п.н. (рис.3.10). Бачимо, що передбачення оперонної структури *tei*-кластера на основі даних, отриманих з DOOR², корелює з результатами наших експериментів.

В одному випадку ми не змогли встановити оперонну організацію *tei*-генів: обидва гени ймовірного оперона *tei26*-25** не експресувався за досліджених умов (рис.3.11).

Виходячи із отриманих даних, ми припускаємо, що гени *tei*-кластера організовані принаймні в 18 транскрипційних одиниць (якщо приймати ген *tei31** як складову кластера генів біосинтезу тейкопланіну) – як моногенних, так і полігенних (рис.3.10). На сьогодні це найбільша кількість транскрипційних одиниць, виявлених у кластерах біосинтезу глікопептидних антибіотиків.

Отже, до складу *tei*-кластера входять такі оперони (рис.3.10):

- 1) *tei5*-7** – *vanHAX*; цей оперон був раніше ідентифікований експериментально [7];
- 2) *tei2*-3** – *vanRS*, за аналогією із опероном продуцента A40926 [2];
- 3) *teiABCD-1**, кодує НРПС та MbtH-подібний білок, необхідний для дисоціації олігопептиду з НРПС; дві міжгенні ділянки нами перевірено експериментально, ще одна складається лише з 19 п.н., що свідчить про групування цих генів в оперон;
- 4) *tei2*-3**, що кодує деацетилазу та манозил-трансферазу; існування цього оперона підтверджено експериментально;
- 5) *tei5*-7**, що кодує три монооксигенази; існування цього оперона підтверджено експериментально;
- 6) *tei8*-12**, що кодує четверту монооксигеназу, галогеназу, глікозилазу, ацилтрансферазу та β -гідроксилазу; в ймовірному опероні немає жодної міжгенної ділянки, більшої за 160 п.н., що згідно із DOOR² свідчить на користь групування цих генів в оперон;
- 7) *tei17*-23**, що містить гени біосинтезу Hrg та Dhrg та ген антипортера; існування цього оперона підтверджено експериментально;
- 8) *tei26*-25**, що включає гени білків із неочевидними функціями, що, найбільш ймовірно, не беруть участі в біосинтезі тейкопланіну; належність цих генів до оперона не можна перевірити експериментально, бо вони не експресуються за досліджених умов;
- 9) *tei28*-30**, що містить гени біосинтезу непротеїногенних амінокислот та ацетилтрансферази; розміри міжгенних ділянок за DOOR² свідчать на користь того, що ці гени згруповано в оперон.

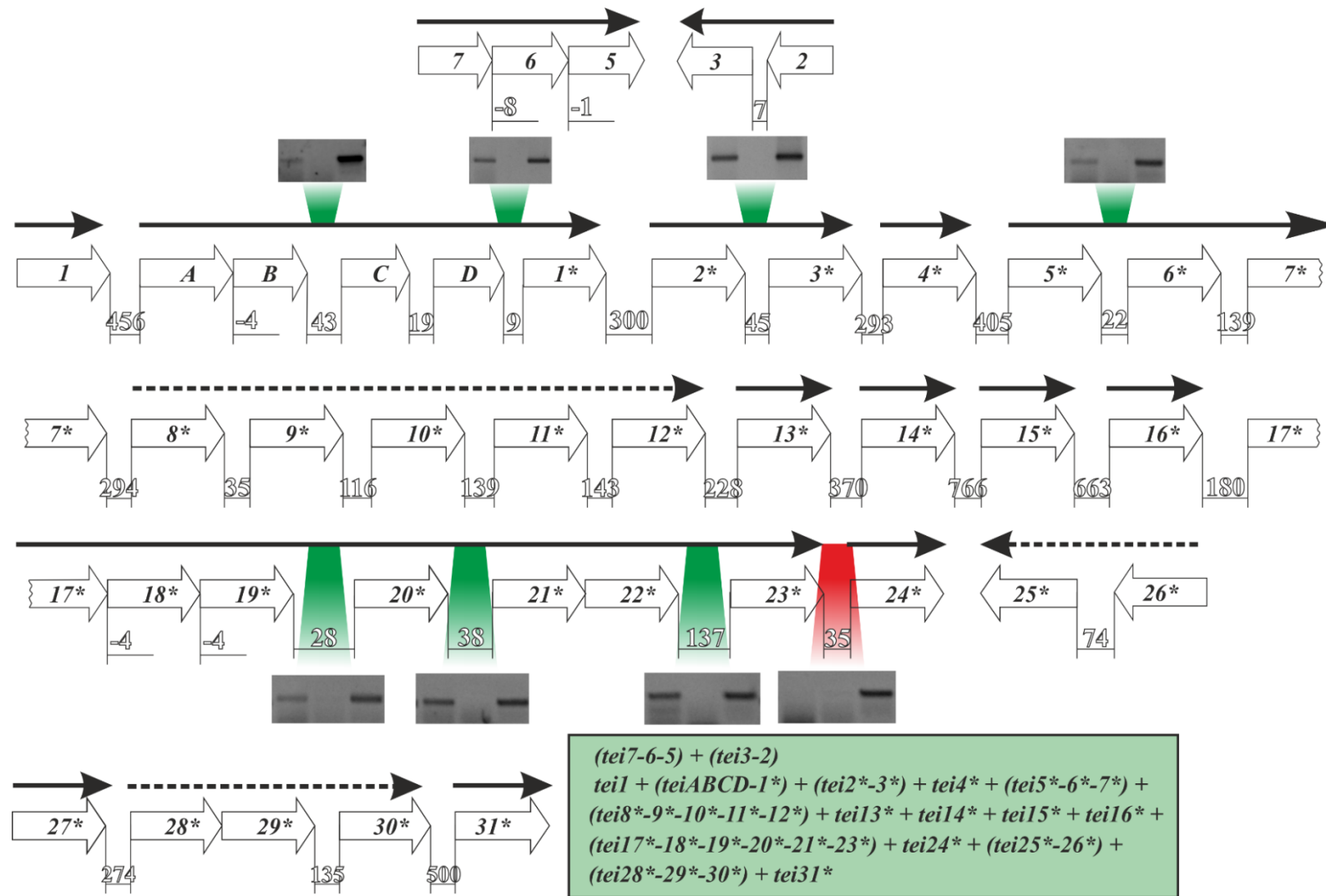


Рис.3.10 Ймовірна оперонна організація кластера біосинтезу тейкопланіну. Стрілками показано оперони, що були досліджені експериментально та/або зустрічаються у кластерах інших глікопептидів; пунктирними стрілками показані оперони, що визначені виключно біоінформатично. Електрофореграми показують міжгенні ділянки, перевірені експериментально; перша фракція відповідає міжгенній ділянці, ампліфікованій з кДНК, друга із сумарної РНК, третя – сумарної ДНК.

Гени *tei1*, *tei4**, *tei13**, *tei14**, *tei15**, *tei16**, *tei24**, *tei27** та *tei31** є моногенними транскрипційними одиницями. Інформація про оперонну організацію *tei*-кластера значно полегшує дальші дослідження шлях-специфічної регуляції експресії генів кластера.

3.3.3. Дослідження транскрипції генів кластера біосинтезу тейкопланіну в мутантах за генами *tei15** та *tei16**

Із попередніх досліджень відомо, що *Tei15** та *Tei16** є ключовими шлях-специфічними позитивними регуляторами біосинтезу тейкопланіну. Доведено, що білок *Tei15** здатний зв'язувати деякі промоторно-операторні ділянки кластера біосинтезу тейкопланіну. Це, зокрема, ділянки перед генами *teiA*, *tei2**, *tei17**, *tei27** та *tei31** [51, 54]. Як впливає із досліджень транскрипційної організації кластера біосинтезу тейкопланіну (пункт 3.3.2), *teiA* входить до складу оперона *teiABCD-1**, *tei2** є частиною оперона *tei2*-3**, а *tei17** – оперона *tei17*-23**. У свою чергу, *tei27** та *tei31** є моногенними транскрипційними одиницями.

У цій частині роботи ми дослідили, чи змінюється транскрипція *tei*-генів у мутантів $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ порівняно з їх експресією в клітинах штаму дикого типу. Для цього застосовано ПЛР із зворотною транскрипцією. Штам дикого типу і мутанти $\Delta tei15^*$ і $\Delta tei16^*$ вирощували за однакових умов: використано середовище ТМ1, в якому спостерігається продукція тейкопланіну. Зразки сумарної РНК штамів виділено в чотирьох часових точках – на 48, 72, 92 та 120 годину культивування. Екстракти культуральної рідини всіх штамів проаналізовано за допомогою ВЕРХ, щоб пересвідчитись у тому, що штам дикого типу продукує тейкопланін, а мутанти $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ його не продукують. У контрольному експерименті визначали транскрипцію гена *groB* (що кодує β -субодиницю РНК-полімерази), що була на постійному рівні у всіх часових точках у всіх штамах (позитивний контроль).

Отримані дані (рис.3.11) показують, що транскрипція переважної більшості генів кластера біосинтезу тейкопланіну розпочинається вже на другу добу культивування, досягаючи своїх піків на третю-четверту доби. На п'яту добу експресія генів кластера біосинтезу тейкопланіну помітно зменшується. Цікаво, що

експресія *tei*-генів випереджає в часі появу тейкопланіну в культуральній рідині, яка, як відомо [136] розпочинається на 3 добу та досягає свого піку на 5-6 доби культивування.

Далі виявилось, що оперони генів резистентності, а саме *tei7-5 (vanHAX)* та *tei3-2 (vanRS)* експресуються конститутивно протягом всього дослідженого періоду часу (рис.3.11). Більше того, експресія цих оперонів залишається незмінною в мутантах $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ (рис.3.11). В одній із попередніх робіт [51] *in silico* було передбачено ймовірний сайт зв'язування регулятора *tei15^** в промоторно-операторній ділянці оперона *tei3-2*. Припускалося, що експресія *tei3-2* може залежати від регулятора *Tei15^**. Однак отримані дані спростовують цю гіпотезу: гени стійкості до глікопептидів у *A. teichomyceticus* експресуються незалежно від шлях-специфічних регуляторів. Схоже, що навіть тоді, коли *Tei15^** зв'язується *in vivo* з промоторно-операторною ділянкою *tei3-2*, він не впливає на експресію генів стійкості. Експресія гена *tei17^**, що репрезентував оперон *tei17^*-23^**, нагадувала таку в штамі дикого типу.

Не всі *tei*-гени експресувалися за умов продукування тейкопланіну. Як вже зазначалося в попередньому пункті, була відсутня експресія гена *tei31^**, що кодує ймовірний транскрипційний регулятор. Також не спостерігали експресії гена *tei27^** імовірної сидерофор-редуктази, яка, очевидно, не виконує жодної ролі в біосинтезі тейкопланіну; а також генів *tei25^** та *tei26^**, для яких нами було передбачено один оперон і які кодують ймовірну діоксигеназу та білок із невідомою функцією відповідно (рис.3.11). Експресія інших транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну відрізнялася у штамів дикого типу та $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ мутантів.

Варто відзначити, що у переважній більшості випадків експресія генів не зникала повністю у штамів із нокаутами шлях-специфічних регуляторів. Скоріше, рівень експресії опускався до базального. Таке спостерігали у випадку експресії генів *tei1*, *tei3^**, *tei4^**, *tei5^**, *tei8^**, *tei12^**, *tei14^**, *tei24^**, *tei29^**, *tei30^** і відповідних оперонів, до яких деякі з них входять (рис.3.11). Не спостерігали експресії генів *teiA* та *tei13^** у мутантів $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ (рис.3.11).

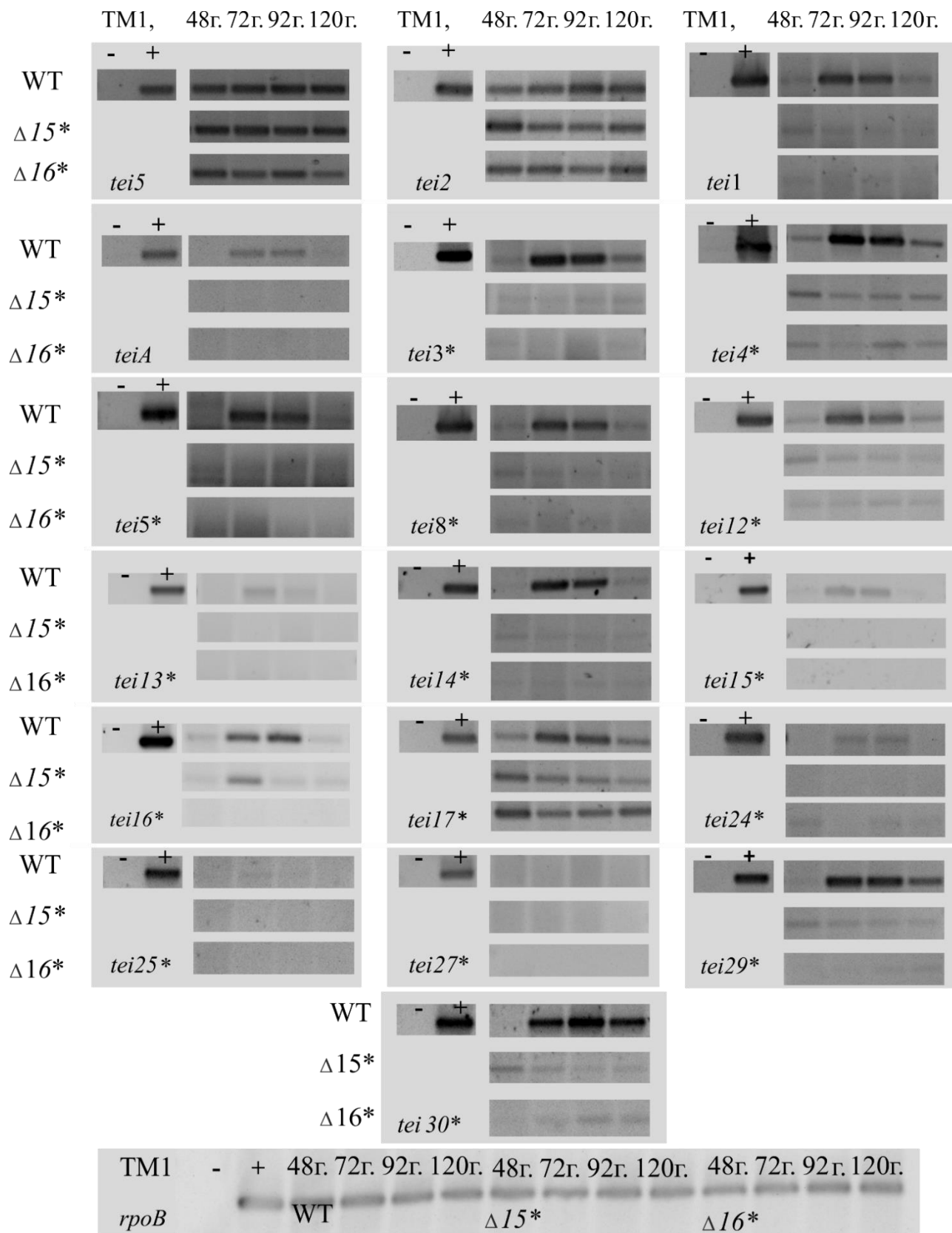


Рис.3.11 Експресія основних транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну в штаммах Δtei15^* , Δtei16^* та дикого типу (WT) при їх вирощуванні в середовищі TM1 в різних часових точках (в “-” матриці немає, в “+” матрицею служила хромосомна ДНК, в усіх інших – відповідний зразок кДНК).

Найбільш цікавим виявився взаємозв'язок між експресією генів шлях-специфічних регуляторів. Так, в штамі із нокаутом *tei16** не спостерігали експресію *tei15**. Натомість, у штамі із нокаутом *tei15**, експресія *tei16** змінювалася порівняно з диким типом: вона не зникала повністю, але помітно зменшувалася на 92 год. Є очевидним, що експресія *tei15** залежить від *Tei16**.

Врахувавши дані про спроможність білка *Tei15** зв'язувати промоторно-операторний ділянку гена *tei16** [51] із даними про експресію *tei16** в Δ *tei15** штамі, можна припустити, що і *Tei15** може впливати на експресію *tei16**. Отже, дані аналізу транскрипції генів кластеру біосинтезу тейкопланіну свідчать на користь того, що регулятори *Tei15** та *Tei16** впливають на експресію більшості транскрипційних одиниць *tei*-кластера.

Для того, щоби підсумувати отриману інформацію, ми вирішили об'єднати отримані дані у схемі, що ілюструє ймовірні шлях-специфічні регуляторні механізми біосинтезу тейкопланіну (рис.3.12). Ми припускаємо, що транскрипційні регулятори працюють залежно один від одного: *Tei16** «запускає» експресію *tei15**, а *Tei15** позитивно впливає на експресію *tei16**. Таке припущення пояснює попередньо отримані результати [51], в яких надекспресія кожного із регуляторів вела до стрибкоподібного збільшення рівня синтезу тейкопланіну: зростання пулу одного регулятора веде до зростання пулу іншого за принципом помножувача. В свою чергу, обидва регулятори синергічно активують експресію більшості біосинтетичних генів кластера біосинтезу тейкопланіну; внаслідок цього важко точно встановити де починається регулон одного регулятора та закінчується регулон іншого. Далі, отримані нами дані експресії генів кластера в мутантах за генами *tei15** та *tei16** не завжди співпадають із даними про ДНК-зв'язувальні властивості *Tei15** *in vitro*. Зокрема, показано [51], що *Tei15** зв'язується з промоторно-операторною ділянкою оперона *tei17*-23**, експресія якого не змінюється у мутанта Δ *tei15**, а також промоторно-операторними ділянками транскрипційних одиниць *tei25*-26**, *tei27**, *tei31**, що взагалі не експресуються. В свою чергу, експресія транскрипційних одиниць *tei1*, *teiABCD-1**, *tei2*-3**, *tei5*-7**, *tei8*-12**, *tei28*-29**, *tei30**, в промоторно-операторних ділянках яких є підтверджені

експериментально або передбачені сайти зв'язування *Tei15**[51], знижується до базального, або зникає. Ця сукупність даних може свідчити про те, що *Tei15** виступає транскрипційним фактором, який здатний не починати експресію генів з нуля, а скоріше посилювати її від базального рівня. На відміну від цього, шлях-специфічні регулятори кластерів біосинтезу баліміцину *bbr* та *A40926 Dbv4* розпочинають експресію генів мішеней (промоторно-операторні сайти яких зв'язують): у мутантів за генами регуляторів експресія генів-мішеней повністю припиняється [2].

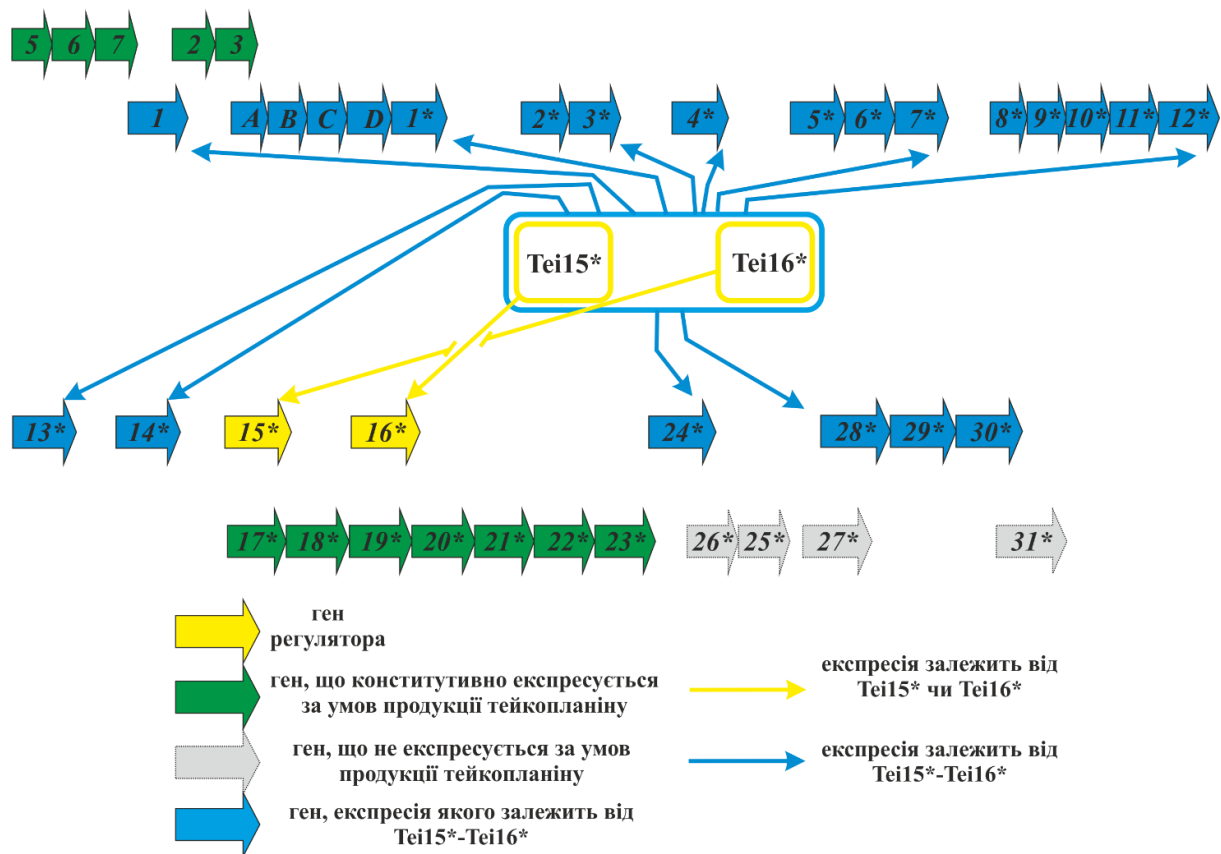


Рис. 3.12 Схема запропонованого механізму регуляції транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну парою шлях-специфічних регуляторів *Tei15** та *Tei16**.

Цікаво, що при філогенетичному аналізі генів, що кодують StrR-подібні регулятори кластерів біосинтезу глікопептидів всі послідовності із ванкоміцин подібних кластерів формують одну кладу, до якої також входить *dbv4* (рис. 3.13, б). Натомість, клада генів StrR-регуляторів із кластерів, що кодують біосинтез тейкопланін-подібних антибіотиків є окремою.

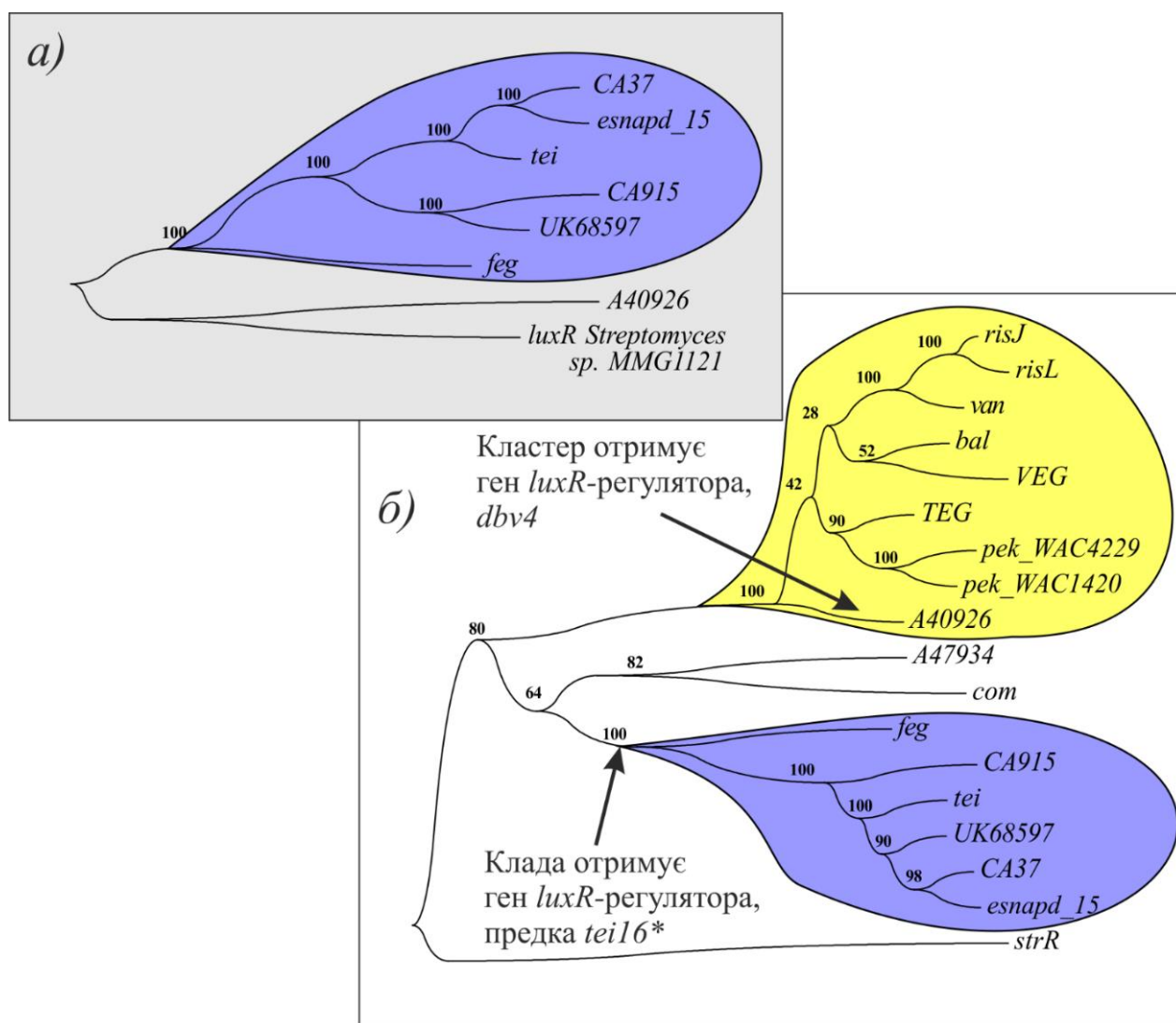


Рис. 3.13 Філогенетичні дерева, побудовані на основі нуклеотидних послідовностей генів LuxR-подібних регуляторів (а) та StrR-подібних регуляторів (б) із таких кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків: (скорочення/номер в GB): *tei*/AJ632270 (тейкопланін); UK68597/KF192710 (глікопептид UK-68,597); *bal*/Y16952 (баліміцин); *van*/HE589771 (ванкоміцин); *risL*, *risJ*/KJ364518, CP008953 (рістоцетини); *cem*/AJ223998-9 (хлороеремоміцин); VEG/EU874252; TEG/EU874253.1; A40926/AJ561198 (глікопептид A40926); A47934/STU82965 (глікопептид A47934); CA37/HM486074; CA915/HM486076; *esnapd_15*/KF264554; *pek_WAC1420*, *pek_WAC4229*/JX026280.1, KC688274.1 (пекіскоміцини); *com*/AF386507.1 (комплестатин); *feg*/KT809366.1 (фегліміцин). Планка масштабу вказує на кількість нуклеотидних замін на один сайт.

Загалом, із такого розподілу стає очевидним, що *bbr*-подібні регулятори є досить віддаленими від *tei15**-подібних. Далі, ми спробували відшукати інші LuxR-регулятори у нашій вибірці кластерів. Виявилося, що ортологи *tei16** присутні у кластерах біосинтезу тейкопланін-подібних антибіотиків. У цілому топологія дерева *luxR* практично повторює топологію тейкопланін-подібної клади дерева *strR*. Ген LuxR-регулятора біосинтезу A40926 (*dbv3*) до неї не входить, і є сильно віддаленим (рис.3.13, *a*). Амінокислотна послідовність його продукту – Dbv3, лише на 30% ідентична до Tei16*. Отже, він не споріднений з LuxR-регуляторами, які кодуються кластерами генів біосинтезу тейкопланін-подібних глікопептидних антибіотиків. Імовірно, що спільний предок (“протокластер”) кластерів біосинтезу тейкопланін-подібних антибіотиків вже мав як StrR-регулятор, так і LuxR-регулятор. Водночас, спільний предок клади ванкоміцин-подібних антибіотиків мав лише StrR-регулятор, а LuxR-регулятор зі шляху біосинтезу A40926, мабуть, має походження незалежне від решти досліджених LuxR (рис.3.13, *b*).

Загалом, отримані дані про шлях-специфічну регуляцію біосинтезу тейкопланіну порівняно з аналогічними даними для регуляції біосинтезу баліміцину та A40926 дають підставу висловити припущення про різновиди шлях-специфічної регуляції кластерів біосинтезу глікопептидів. Головний елемент такої регуляції кластерів біосинтезу глікопептидів це регулятор StrR-родини, завжди присутній у всіх кластерах біосинтезу глікопептидів. Далі, кластери біосинтезу мають ген додаткового LuxR-подібного регулятора. Кластер біосинтезу A40926 також має додатковий ген LuxR-регулятора, неспорідненого до Tei16*. Отже, згідно із даними філогенетичного аналізу, механізми шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну, досліджені у цьому підрозділі, повинні бути аналогічними до таких у біосинтезі інших тейкопланін-подібних глікопептидів, наприклад UK-68,597.

Повертаючись до ролі гена *tei31**, ми припускаємо, що це ген нефункціонального AfsR-подібного регулятора, в якому немає тетратрікопептидних доменів. Тому він не здатний формувати комплекси з

кіназами – компонентами двохкомпонентних регуляторних систем, до складу яких входять AfsR-подібні транскрипційні регулятори. Отже, Tei31* є одним із множинних паралогів AfsR-подібних регуляторів, які трапляються у представників *Micromonosporaceae*. Він не має стосунку до біосинтезу тейкопланіну і, ймовірно, до інших виявлених регуляторних процесів.

Матеріали підрозділу викладено в публікаціях [50, 173].

3.4. Дослідження генів, продукти яких задіяні в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками

Як вже зазначалося, природний продуцент тейкопланіну – штам *A. teichomyceticus* NRRL-B16726 – синтезує малі (в різних середовищах від 20 до 100 мг/л) кількості антибіотика. Деякі підходи, спрямовані на збільшення рівня продукції тейкопланіну було застосовано, серед них методи індукованого мутагенезу та селекції [61], оптимізації умов ферментації [136], а також генно-інженерні маніпуляції із генами регуляторів біосинтезу тейкопланіну *tei15** та *tei16** [51]. Однак, підходи до конструювання штамів із підвищеним рівнем синтезу тейкопланіну є далеко не вичерпаними. Перспективним є застосування методів метаболічної інженерії щодо продуцента тейкопланіну, що включає широкий спектр експериментальних підходів. Один із них – покращення забезпечення біосинтезу певного метаболіту сполуками-попередниками. Основними попередниками глікопептидів є ароматичні амінокислоти, із залишків яких побудовано аглікони цих антибіотиків. У тейкопланіновому агліконі всі сім амінокислотних залишків безпосередньо чи опосередковано походять з тирозину (рис.3.14). Про те, що біосинтез глікопептидних антибіотиків має бути забезпечений достатньою кількістю цього попередника, свідчить організація кластерів генів біосинтезу глікопептидів. Усі ці кластери (окрім кластерів біосинтезу A40926 та A47934) містять гени, що кодують: дезокси-D-арабіно-гептулозонат-7-фосфатсинтази (DAHPS), ферменти, які каталізують першу реакцію шикіматного шляху, перетворюючи еритрозофосфат в дезоксиарабіногептулозонатфосфат (рис.3.14); та префенатдегідрогенази (PDH), що каталізують останню реакцію шикіматного шляху, перетворюючи арогенат чи префенат у тирозин (рис.3.14). Гени DAHPS, окрім кластерів генів біосинтезу глікопептидів, також зустрічаються в кластерах біосинтезу сидерофорів [4]. Очевидно, що в продуцентів глікопептидів є додаткові гомологи DAHPS та PDH, які не належать до кластерів глікопептидних антибіотиків та задіяні в первинному метаболізмі. Експресія генів, що кодують ферменти первинного та вторинного метаболізму, розділена в часі. Перші експресуються під час логарифмічного періоду росту культури, експресія других спряжена із біосинтезом антибіотиків і починається в стаціонарній фазі [38].

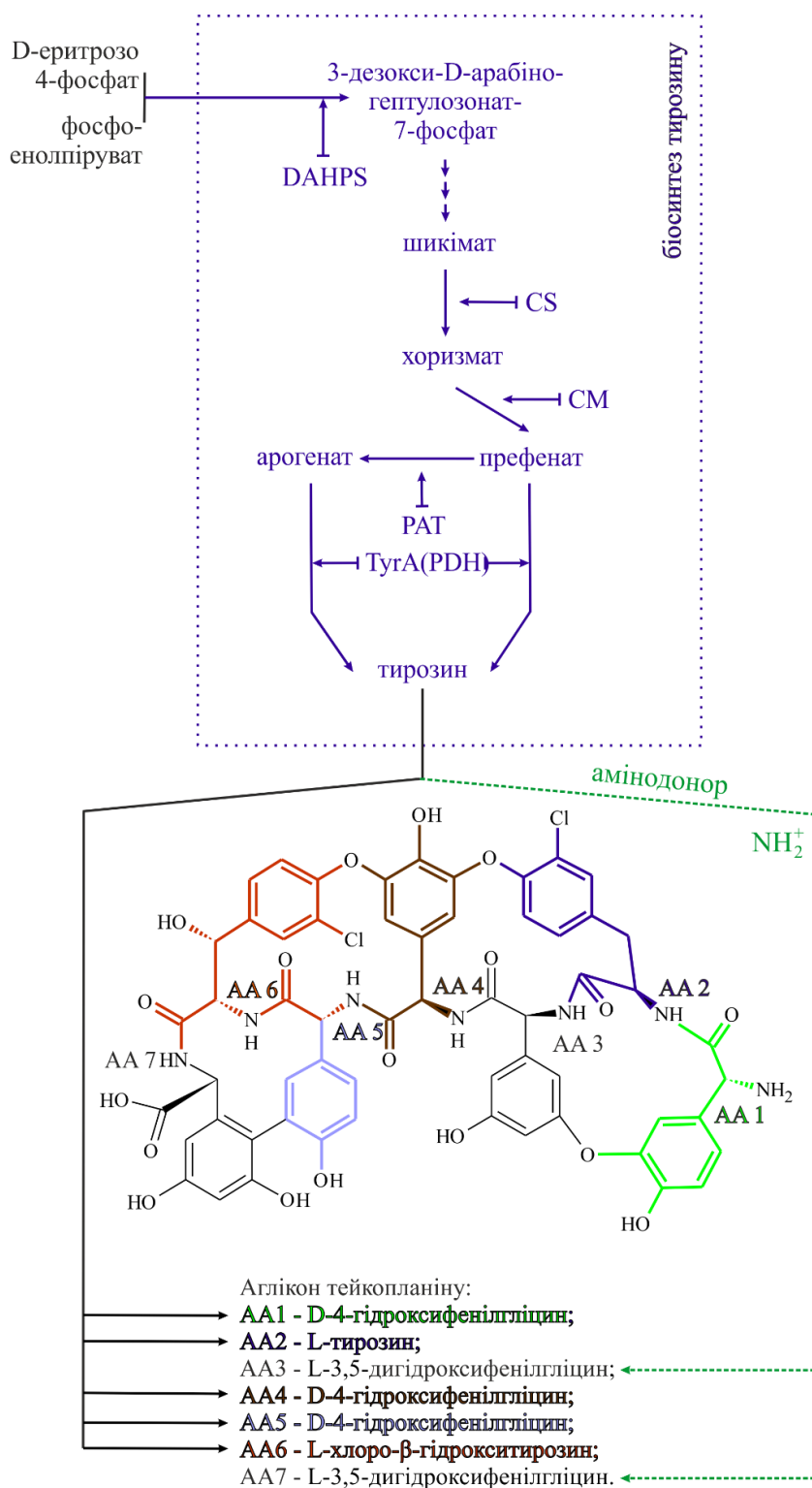


Рис.3.14 Схема походження амінокислотних залишків тейкопланінового аглікону від тирозину та реакцій біосинтезу тирозину (описані за консенсусним бактерійним шляхом біосинтезу з KEGG PATHWAY Database). AA – амінокислоти, DAHPS – 3-дезоксид-Д-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтаза, CS – хоризматсинтаза, CM – хоризматмутаза, PAT – префенатамінотрансфераза, PDH – префенатдегідрогеназа (за [137]).

Тільки гени *dahp_{secABAL}* (кодує DАHPS) та *pdh_{secABAL}* (кодує PDH) з кластеру біосинтезу баліміцину досліджені експериментально. Надекспресія *dahp_{secABAL}* в *Am. balhimycina* збільшує рівень синтезу баліміцину до 250%. Надекспресія та нокаут *pdh_{secABAL}* не мали помітного впливу на продукцію баліміцину [137]. У тейкопланіновому кластері є гомолог *pdh_{secABAL}* – *tei24** [81]. Більше того, цей кластер також містить ген, що кодує потенційну DАHPS/хоризмат-мутазу – *tei14**. Проте, *Tei14** не був описаний як споріднений до *Dahp_{secABAL}*. Усі ці гени, як власні *A. teichomyceticus*, так і гетерологічні, виглядають перспективними знаряддями для збільшення продукції тейкопланіну. Тому в цьому підрозділі ми дослідили роль різних генів, що кодують ферменти тирозинового метаболізму в біосинтезі тейкопланіну.

3.4.1. Філогенетичний аналіз префенатдегідрогеназ актинобактерій

Дегідрогенази родини TugA каталізують перетворення арогенату або префенату (чи обох) в тирозин (рис.3.14). Ці ферменти поширені серед усіх основних еволюційних ліній бактерій [13, 121]. Їхнє філогенетичне дерево формує ряд кластерів, що відповідають різним класам еубактерій; серед них є два актинобактерійних кластера [121]. Згідно із наявними даними [121], представники одного з актинобактерійних кластерів вважаються НАД⁺/НАДФ⁺-чутливими TugA і трапляються у коринебактерій, мікобактерій та біфідобактерій. До другого включено TugA всіх інших актинобактерій, що описані як НАД⁺-чутливі. Цікаво, що багато актинобактерійних TugA мають С-термінальні домени, так звані АСТ-домени, що ймовірно задіяні у ретроінгібуванні активності ферменту продуктами реакції. Представники обох кластерів актинобактерійних TugA описані як арогенат-специфічні дегідрогенази. Це виглядає цілком достовірним для *Corynebacteriales* [34]. Однак, сукупність літературних даних дає підстави стверджувати, що актинобактерійні TugA є ферментами із різною специфічністю. Наприклад, PDH з *Actinoplanes missouriensis* виключно арогенат специфічний фермент, що не підлягає ретроінгібуванню тирозином [57]. Інформація про експериментально досліджені

стрептоміцетні TygA є суперечливою: TygA *Streptomyces phaeochromogenes* специфічний до арогенату, проте його специфічність щодо префенату не досліджувалась [70], а клітинні екстракти *Streptomyces refuineus* мали префенат-дегідрогеназну активність [124]. У *Microtetraspora glauca* (*Streptosporangiaceae*) також описано дегідрогеназу, здатну перетворювати арогенат та префенат у тирозин [125]. TygA з *Mycobacterium tuberculosis* є ферментом із ексклюзивною специфічністю тільки до префенату [157].

Ставлячи за мету уточнити філогенію актинобактерійних TygA і з'ясувати в ній місце PDH з кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків (і, зокрема, Tei24* з кластера біосинтезу тейкопланіну) ми проаналізували більше ніж 150 амінокислотних послідовностей TygA з 18 родин актинобактерій разом із TygA глікопептидних кластерів. Ці послідовності знайдено за допомогою BLAST в 138 актинобактерійних геномах, представлених в базах даних NCBI у вигляді завершених проектів або високоякісних чернеток, використавши як зразок амінокислотну послідовність PDH_{secABAL}. У всіх випадках, крім деяких, описаних далі, знайдено один гомолог на один геном. Геномний контекст більшості знайдених гомологів свідчив про те, що вони не належать до біосинтетичних кластерів вторинних метаболітів, отже можуть розглядатися як ферменти первинного метаболізму. Для вирівнювання отриманих амінокислотних послідовностей, а також для конструювання філогенетичного дерева використали утиліту MEGA 6.06 [134], де для вирівнювання амінокислотних послідовностей застосували алгоритм MUSCLE [32]. Після ручної перевірки остаточного множинного вирівнювання, філогенетичне дерево побудовано за методом максимальної правдоподібності, достовірність галуження оцінено на основі 500 бутстрепів.

Фінальне філогенетичне дерево показало, що всі актинобактерійні TygA розподіляються на два великі кластери, як це і було передбачено раніше [13, 121] (рис.3.15). Проте, склад цих кластерів кардинально відрізнявся від попередньо опублікованого [13]. Виявилось, що до кластера I потрапили TygA первинного метаболізму *Streptomycetales*, *Frankiales*, *Actinomycetales* та ін., а також всі PDH-

подібні білки, кодовані в кластерах біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Далі, кластер II об'єднав TugA із первинного метаболізму представників порядків *Micromonosporales* (включно з родом *Actinoplanes*), *Bifidobacteriales*, *Corynebacteriales*, *Pseudonocardiales* (включно з родом *Ammycolatopsis*) та деяких менших таксонів. Отже, TugA із первинного метаболізму продуцентів глікопептидів та TugA із кластерів глікопептидів належать до двох цілком різних еволюційних ліній префенатдегідрогеназ.

Цікавим є те, що TugA з кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків формували дві розділені клади в межах кластеру I. Послідовності кожної з цих клад походили із кластерів, які кодують біосинтез тейкопланін- та ванкоміцин-подібних глікопептидів відповідно (далі *teico*- та *vanco*-). Філогенетична реконструкція також проливалася світло на ймовірне еволюційне походження TugA з кластерів біосинтезу глікопептидів: *vanco*-подібна група білків виявилася спорідненою з дегідрогеназами первинного метаболізму представників порядку *Streptosporangiales*, а клада *teico*-подібних – з білками з порядків *Catenulisporales* та *Streptomycetales* (рис.3.15).

Переважає більшість TugA із кластера I мали С-термінальний АСТ-подібний домен. Лише подекуди він втрачений, а саме у деяких PDH, кодованих у *vanco*-подібних кластерах (біосинтезу ванкоміцину, баліміцину, рістоцетинів). На противагу, всі представники кластера II виявилися короткими білками і жоден із них не містив АСТ-подібного домену.

Тільки два геноми з проаналізованої вибірки, а саме геноми *Actinoplanes reclineatus* та *Rhodococcus rhodnii*, містили додаткові гени, що кодують PDH. Амінокислотні послідовності цих додаткових PDH ми також включили до множинного вирівнювання, на основі якого будувалося фінальне дерево. Отже, TugA *A. reclineatus* та *R. rhodnii* у фінальному дереві були представлені двома парами амінокислотних послідовностей. Одна послідовність в кожній з пар групувалася з послідовностями TugA первинного метаболізму родів *Actinoplanes* та *Rhodococcus* (рис.3.15). Друга послідовність кожної з пар розміщувалася в кладах, що відповідають PDH кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків.

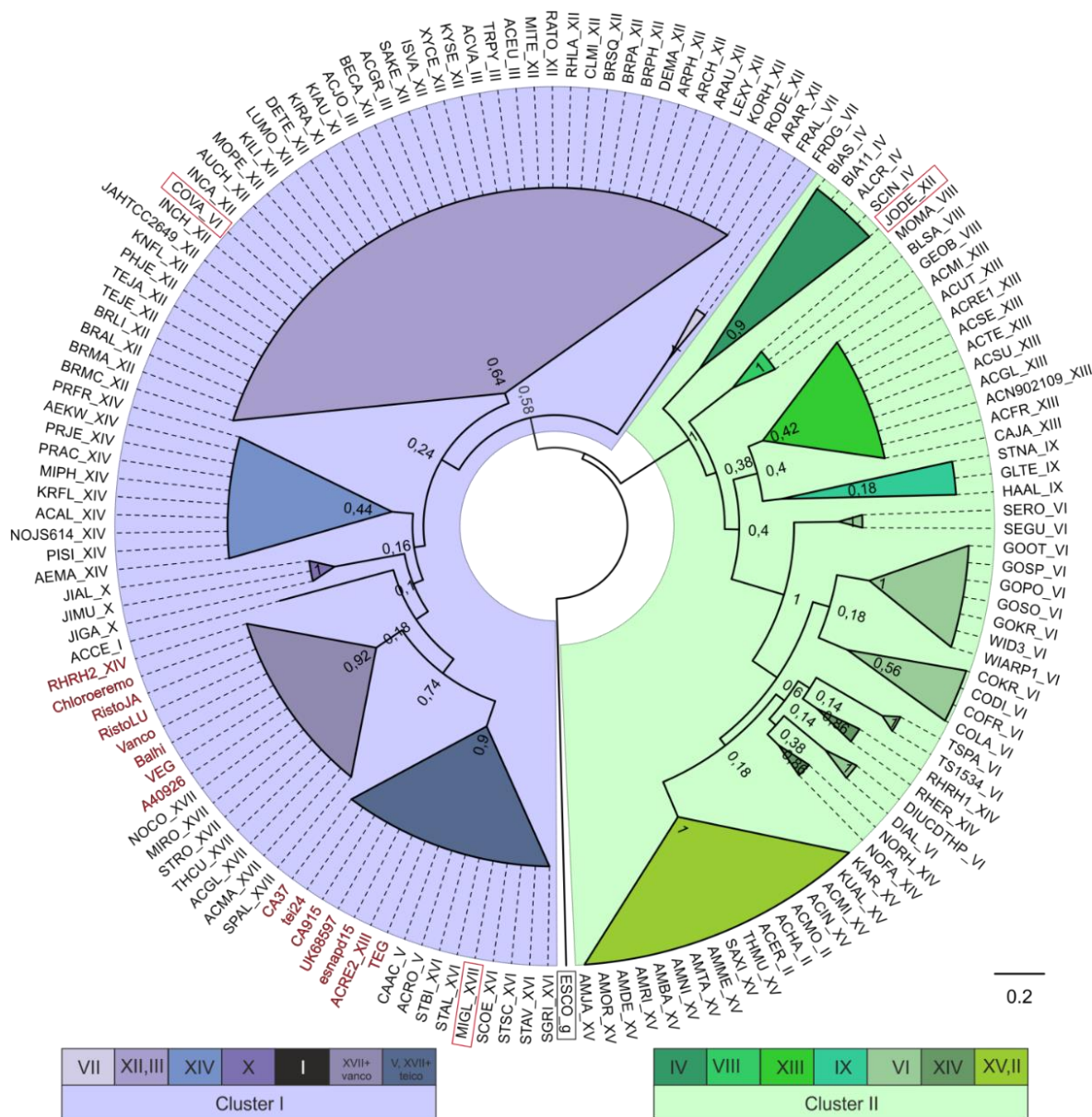


Рис.3.15 Фінальне філогенетичне дерево, що показує родинні зв'язки між актинобактерійними PDH (TyrA). Нумерація клад в кластерах I та II відповідає таким порядкам класу Actinobacteria: I Acidothermales, II Actinopolysporales, III Actinomycetales, IV Bifidobacteriales, V Catenulisporales, VI Corynebacteriales, VII Frankiales, VIII Geodermatophilales, IX Glycomycetales, X Jiangellales, XI Kineococcales, XII Micrococcales, XIII Micromonosporales, XIV Propionobacteriales, XV Pseudonocardiales, XVI Streptomycetales, XVII Streptosporangiales. Червоним шрифтом показані клади PDH з кластерів біосинтезу глікопептидів. Як послідовність для укорінення було використано послідовність фермента TyrA *E. coli*. Планка масштабу показує кількість амінокислотних замін на один сайт.

При аналізі ділянок геномів по сусідству з відповідними генами префенатдегідрогеназ (контіг NZ_JZKF01000002 геному *A. reclineatus* та контіг NZ_JOAA01000006.1 геному *R. rhodnii*) за допомогою ANTISMASH [149], було встановлено, що вони входять до складу невідомих кластерів, подібних на кластери генів біосинтезу глікопептидів. Зокрема, кластер, виявлений в *A. reclineatus*, подібний до кластера біосинтезу тейкопланіну, а кластер *R. rhodnii* – ідентичний з кластером біосинтезу хлороеремоміцину *A. orientalis*.

Не дивно, що в геномі *A. reclineatus* ми знайшли кластер біосинтезу глікопептидів, враховуючи те, що у інших актинопланет також є кластери біосинтезу глікопептидних антибіотиків. Проте, випадок із *R. rhodnii* є першим прикладом того, що кластер біосинтезу глікопептидних антибіотиків розміщується в геномі симбіотичної актинобактерії, що не формує багатоклітинного міцелію [104]. Щоправда, нові реконструкції еволюційної історії актинобактерій [79] вказують на те, що *Rhodococcus* цілком може бути вторинно-спрощеним родом актинобактерій. Тоді, присутність в геномі *R. rhodnii* кластера генів біосинтезу глікопептида, який міг бути наявним у вільноживучих предків *R. rhodnii*.

Загалом, отримані дані аналізу філогенії актинобактерійних TugA не тільки дали змогу виявити два нові кластера глікопептидних антибіотиків, але й вказують на можливість цілком нового підходу до біоінформатичного пошуку кластерів генів вторинних метаболітів. Наявність декількох генів, що кодують TugA та не є паралогами, вказує на те, що один із них може кодувати фермент вторинного метаболізму і належати до біосинтетичного кластеру.

Отже, філогенетичний аналіз чітко показав, що в актинобактерій зустрічаються два різних типи PDH: ті, що належать до I-го кластера та володіють АСТ-подібними С-термінальними доменами і ті, що належать до II-го кластера та не мають АСТ-доменів. Обидва типи дегідрогеназ є ключовими ферментами первинного метаболізму для різних порядків актинобактерій. Однак, префенатдегідрогенази, задіяні у біосинтезі глікопептидів, належать лише до кластера I, тоді як PDH з первинного метаболізму відповідних штамів-

продуцентів найчастіше належать до кластера II. Всі префенатдегідрогенази КБГ мають АТС-подібний С-термінальний домен. Хоча PDH *teico*- та *vanco*-подібних кластерів і належать до I кластера, вони формують дві окремі клади, що не є сестринськими.

3.4.2. Вплив надекспресії генів різних префенатдегідрогеназ на біосинтез тейкопланіну в *A. teichomyceticus*

Результати аналізу *in silico* вказують на те, що префенатдегідрогенази з кластерів біосинтезу глікопептидів можна поділити на дві основні групи: ті, що володіють С-термінальним АСТ-доменом, і ті, що його втратили. До перших належить *Tei24** (373 а.з.) з *A. teichomyceticus*; прикладом другої групи є вкорочений PDH_{secABAL} (293 а.з.) з *Am. balhimycina*. Окрім цієї відмінності, обидва ферменти подібні і належать до I кластеру актинобактерійних TugA. Ставлячи за мету в'яснити, який вплив на біосинтез тейкопланіну мають ці ферменти, і яку роль відіграє наявність чи відсутність АСТ-домену, ми вирішили надекспресувати ген *tei24** та експресувати ген *pdh_{secABAL}* *Am. balhimycina* в *A. teichomyceticus*. Для того, щоби дослідити, чи має вплив наявність АСТ-домену на функціонування *Tei24**, ми також надекспресували вкорочену версію *tei24** (лише перших 861 нуклеотидів) – *tei24*_{tr}*.

Гени *pdh_{secABAL}*, *tei24** та *tei24*_{tr}* експресували у векторі pSETPrAm під контролем апраміцинового промотора *aac(3)IV*. Для цього ділянки ДНК, що містили послідовності генів *pdh_{secABAL}*, *tei24** та *tei24*_{tr}*, ампліфіковано з хромосомної ДНК штамів *Am. balhimycina* та *A. teichomyceticus* із використанням пар праймерів *pdhbal_F*, *pdhbal_R* та *tei24_F*, *tei24_R*, *tei24tr_R* відповідно. У послідовність праймера *tei24tr_R* уведено стоп-кодон TGA так, щоб в ампліфікованому фрагменті він містився після 287 триплету гена *tei24**. Для ПЛР використано високоточні полімерази Phusion від Thermo Fisher Scientific або Q5 від NEB. ПЛР-продукти елюювали та субклоновали в pJET1.2. Ампліфіковані послідовності перевірено за допомогою секвенування. Далі, фрагменти з генами *pdh_{secABAL}* (895 п.н.), *tei24** (1140 п.н.) та *tei24*_{tr}* (883 п.н.) вищеплювали з

конструктів на основі рJET1.2. за допомогою ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* та *EcoRV*. Отримані ділянки ДНК елюювали та клонували у вектор рSETPAm, розщеплений в *EcoRI*- та *EcoRV*-сайтах. Конструкти, названі рSETPAmpdhsecABAL, рSETPAmt_{ei24}* та рSETPAmt_{ei24}*tr (рис.3.16), перевірено за допомогою рестрикційного картування. Плазмиди для надекспресії перенесли в *A. teichomyceticus* за допомогою кон'югаційних схрещувань з *E. coli* ET12567 рUZ8002. Транскон'юганти відібрано як стійкі до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл. Інтеграцію плазмід у хромосому підтверджено за допомогою ПЛР, в якій ампліфікували ген стійкості до апраміцину за допомогою пари праймерів Am_F та Am_R.

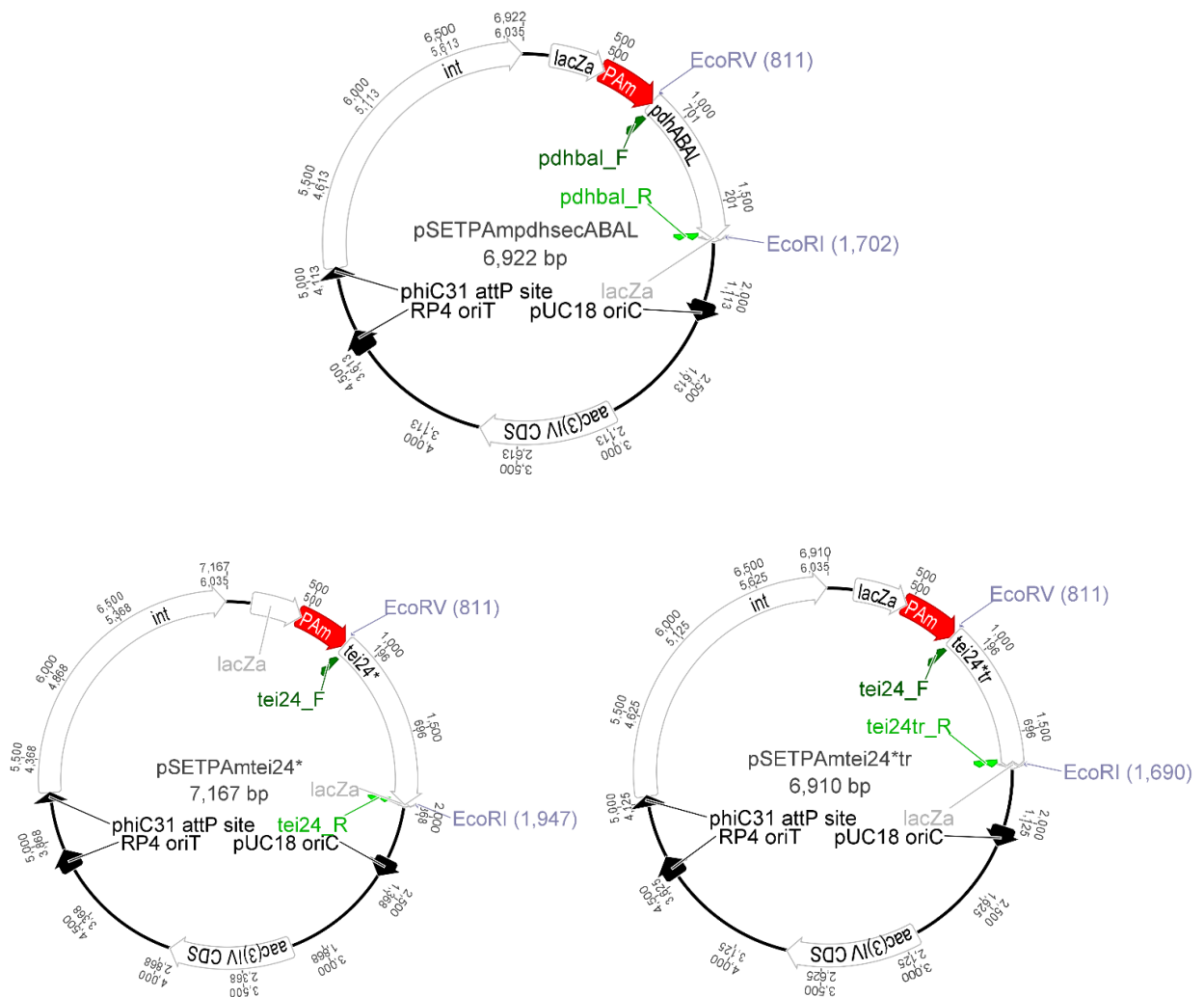


Рис.3.16 Будова рекомбінантних плазмід, які використано для надекспресії генів *pdh_{secABAL}*, *tei24** та *tei24*_{tr}* в (розшифрування умовних позначень див. на рис. 3.1.1).

Сконструйовані рекомбінантні штами *A. teichomyceticus* вирощували за умов, оптимальних для продукції тейкопланіну (див. пункт 2.3.11). Встановлено, що надекспресія гетерологічного гена *pdh_{secABAL}*, як і вкороченого варіанта гена *tei24**, не впливали на продукцію тейкопланіну (рис.3.17). У той же час штам *A. teichomyceticus tei24*⁺*, в якому надекспресовано повну версію гена *tei24** синтезував у тричі більше тейкопланіну, ніж контрольний штам, що містив вектор pSETPAm (рис.3.17).

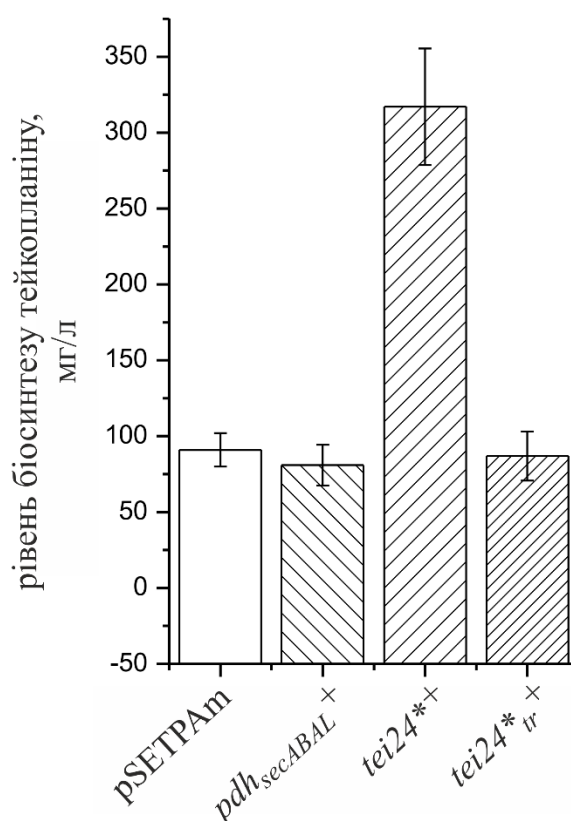


Рис.3.17 Рівень синтезу тейкопланіну штамми із надекспресіями генів префенатдегідрогеназ: *pdh_{secABAL}*, *tei24**, *tei24*_{tr}* порівняно з контрольним штамом *A. teichomyceticus* pSETPAm⁺.

Із отриманих даних випливає, що С-термінальна ділянка Tei24* необхідна для позитивного ефекту надекспресії відповідного гена на рівень біосинтезу тейкопланіну. Поміж PDH I кластеру лише деякі мають досліджені ензиматичні властивості. Наприклад, PDH з *Micr. glauca* описані як такі, що синергічно піддаються ретроінгібуванню фенілаланіном, триптофаном та тирозином [125]. Tei24* і PDH з *Micr. glauca* є філогенетично спорідненими білками і належать до

однієї кладі, що добре проілюстровано побудованим філогенетичним деревом (рис.3.15). Тому, можна зробити припущення, що Tei24* також підлягає зворотному інгібуванню тирозином, фенілаланіном чи триптофаном. Однак PDH_{secABAL} та Tei24*_{tr} втратили їхні АСТ-домени, а отже не можуть інгібуватися продуктами реакцій, які вони каталізують.

Надекспресія нерегульованих (тих, що не піддаються зворотному інгібуванню продуктами реакції) PDH_{secABAL} та Tei24*_{tr}, очевидно, приводитиме спершу до швидкого збільшення внутрішньоклітинного пулу тирозину. В свою чергу, високі концентрації тирозину можуть активувати, наприклад, метаболічний шлях перетворення тирозину у фенілаланін. Як наслідок, надлишок тирозину буде потрапляти в шляхи біосинтезу фенілаланіну. Це не впливатиме на рівень біосинтезу глікопептидних антибіотиків, або навіть матиме негативний вплив на цей процес (як це ми можемо спостерігати у випадках тейкопланіну та баліміцину). Надекспресія Tei24* скоріше приводитиме до помірного збільшення внутрішньоклітинного пулу тирозину. Дальше збільшення концентрації тирозину інгібуватиме активність Tei24*. Таке помірне збільшення концентрації тирозину, очевидно, не буде достатнім для активації його перетворення на фенілаланін, але може зумовлювати надпродукцію тейкопланіну.

3.4.3. Біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей дезокси-D-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтаз актинобактерій

ДАНР-синтази еубактерій ділять на два типи - I і II. У свою чергу в типі I виділяють два підтипи: I α та I β [154]. Синтази першого типу є порівняно короткими білками (розміром біля 350 амінокислотних залишків), а їх ферментативна активність негативно інгібується парами амінокислот: тирозином або фенілаланіном і хоризматом або префенатом відповідно [83]. Синтази другого типу на 100 а. з. довші і зазвичай негативно інгібуються фенілаланіном, тирозином чи триптофаном. Типи I та II ДАНР-синтаз – цілком різні еволюційні лінії ферментів, а подібність їх функцій є, очевидно,

результатом конвергентної еволюції. Так як поширення ДАНР-синтаз у представників класу *Actinobacteria* сьогодні не вивчене, ми вирішили дослідити це питання. Цікаво було дізнатися, як відрізняються ДАНР-синтази, що беруть участь у синтезі різних глікопептидних антибіотиків, і такі ферменти, що задіяні у первинному метаболізмі.

Проаналізувавши вибірку із 138 геномів актинобактерій (що вже застосовувалася у пункті 3.4.1), ми знайшли гени обох типів ДАНР-синтаз. Гени ДАНР-синтаз першого типу розміщалися як в кластерах, так і поодинокі. Однак гени, що кодують ферменти II типу, ніколи не зустрічалися в кластерах генів біосинтезу вторинних метаболітів. Наприклад, в геномі *A. teichomyceticus* крім генів ДАНР-синтаз I-го типу (це *tei14** з кластера біосинтезу тейкопланіну та розміщеного поодинокі *dahp_{ATE}*), ми знайшли два додаткові гени ДАНР-синтаз II-го типу. У продуцента баліміцину *Am. balhimycina* знайдено один ген ДАНР-синтази II-го типу. Далі, ми виявили, що копії генів (>2 на геном), які кодують ДАНР-синтази II-го типу, присутні в проаналізованих геномах представників усіх порядків класу *Actinobacteria* (табл. 3.1). Натомість, ферменти I-го типу зустрічаються рідше. ДАНР-синтази підтипу Ia поширені серед представників більш ніж половини досліджених порядків. Ферменти підтипу Ib надзвичайно рідкісні. Гени, що їх кодують, часто можна знайти в кластерах біосинтезу вторинних метаболітів [140].

Виходячи із того, що багато актинобактерій, включно із переважною більшістю стрептоміцетів, взагалі не мають в своїх геномах генів, що кодують ДАНР-синтази I-го типу, ми схильні вважати, що саме ДАНР-синтази II-го типу є основними ферментами первинного метаболізму актинобактерій. У роботі [137] ДАНР-синтази I-го типу, кодовані генами з кластерів, розглядалися як ферменти вторинного метаболізму, а синтази I-го типу, що кодуються генами, розміщеними поза кластерами, – ферментами первинного метаболізму. Однак, ДАНР-синтази II-го типу в такому розподілі не було враховано.

Далі в нашій роботі ми зосередилися на дослідженні ДАНР-синтаз I-го типу, як таких, що кодуються генами, розміщеними в кластерах біосинтезу

глікопептидних антибіотиків. Тим не менше, видається, що гени ДАНР-синтаз II-го типу також є перспективною мішенню для покращення забезпечення біосинтезу глікопептидів попередниками.

Таблиця 3.1

Поширення різних типів ДАНР-синтаз серед актинобактерій.

Підтип Iα	Підтип Iβ	Тип II	Клас <i>Actinobacteria</i> , порядки:
X	X	•	<i>Actinomycetales</i>
○	X	•	<i>Actinopolysporales</i>
•	X	•	<i>Bifidobacteriales</i>
○	○	•	<i>Catenulisporales</i>
•	○	•	<i>Corynebacteriales</i>
X	○	•	<i>Frankiales</i>
•	X	•	<i>Geodermatophilales</i>
•	X	•	<i>Glycomycetales</i>
•	•	•	<i>Jiangellales</i>
X	X	•	<i>Kineosporiales</i>
○	X	•	<i>Micrococcales</i>
•	○	•	<i>Micromonosporales</i>
○	X	•	<i>Nakamurella</i>
○	○	•	<i>Propionibacteriales</i>
•	○	•	<i>Pseudonocardiales</i>
○	○	•	<i>Streptomycetales</i>
○	•	•	<i>Streptosporangiales</i>

Примітка: • – гени присутні в усіх проаналізованих геномах представників родини; ○ – гени присутні у деяких проаналізованих геномах представників родини; X – відповідні гени відсутні.

Як вже було зазначено, в кластерах генів біосинтезу глікопептидів зустрічаються гени обох підтипів (Iα та Iβ) ДАНР-синтаз I-го типу. Всі інші ферменти I-го типу продуцентів глікопептидів, що не кодуються генами цих кластерів, належать виключно до підтипу Iα.

Філогенетичний аналіз показав, що всі ДАНР-синтази кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків формують дві групи білків. Це ванкоміцин-подібні

та тейкопланін-подібні ДАНР-синтази, що є ферментами підтипів І α та І β відповідно. Розподіл був аналогічним до того, що спостерігали у філогенії PDH (на рис.3.16).

Ми обрали Tei14* як архетип тейкопланін-подібних, а ДАНР_{secABAL} як архетип ванкоміцин-подібних ДАНР. За амінокислотною послідовністю Tei14* на 55% ідентичний до Dahp7ps з *Thermotoga maritima* (3PG9) - ферменту, кристалічна структура та функції якого вивчені [27]. У свою чергу, для ДАНР_{secABAL} найближчим гомологом із дослідженою структурою та функціями був AroG з *E. coli* [117]. Відмінності в структурі ферментів обох підтипів добре видні із порівняння тривимірних моделей Tei14* та ДАНР_{secABAL}, які ми побудували на основі депонованих у базі даних PDB тривимірних структур Dahp7ps та AroG, відповідно, за допомогою серверу Phyre² (рис. 3.18) [71].

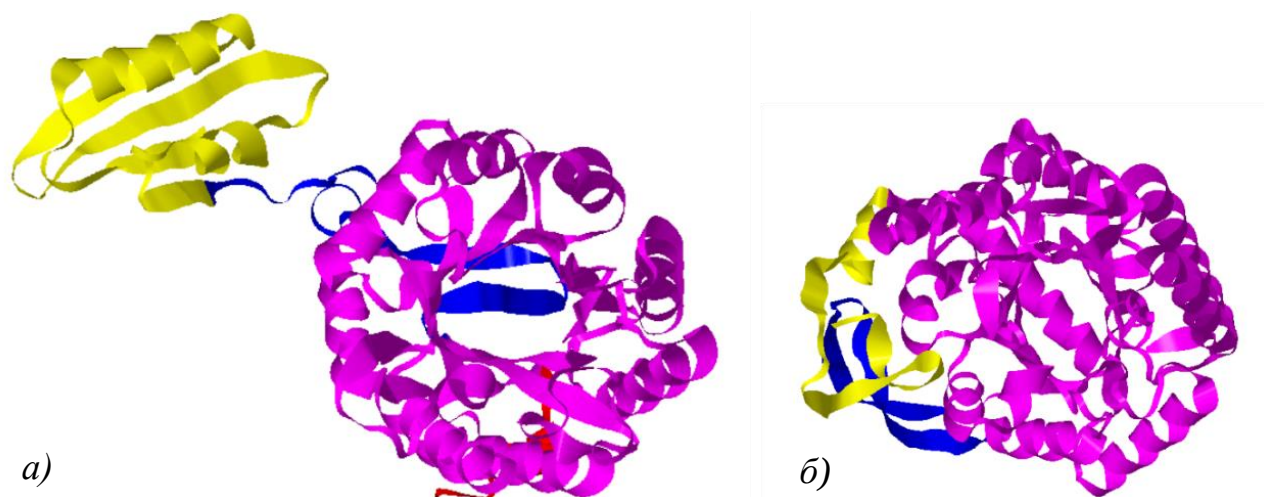


Рис.3.18 Моделі тривимірних структур білків Tei14*(a) та ДАНР_{secABAL}(б). Рожевим кольором показано С-термінальний каталітичний домен із ДАНР-синтазною активністю, що має архітектуру «барильця»; синім – лінкерні фрагменти білка; жовтим – домени із регуляторними функціями.

У Tei14* помітно характерний N-термінальний домен, що за своєю амінокислотною послідовністю нагадує домени із хоризмат-мутазною активністю. Наявність цього N-термінального регуляторного домена часто призводила до помилкової анотації *tei14** як гена, що кодує хоризмат-мутазу [81, 51]. На С-термінальному кінці розміщене каталітичне «барильце». Натомість,

ДАНР_{secABAL} містить каталітичне «барильце» та регуляторну внутрішню петлю, характерну для ферментів І α -підтипу.

Підсумовуючи результати біоінформатичного аналізу можна висловити гіпотезу, що ДАНР-синтази кластерів біосинтезу глікопептидних антибіотиків є результатом конвергентної еволюції під дією селективного тиску високої потреби в ароматичних амінокислотах як попередників для синтезу глікопептидів. Найближчі ортологи ванкоміцин-подібних ДАНР-синтаз знайдено в представників порядку *Micromonosporales*, а тейкопланін-подібних – у представників порядку *Streptosporangiales*.

3.4.4. Надекспресія генів, що кодують ДАНР-синтази І α та І β підтипів в *A. teichomyceticus*

Отже, як було показано *in silico*, в кластерах біосинтезу глікопептидів зустрічаються дві різні групи ДАНР-синтаз. Це *vanco*-подібні ДАНР, що є представниками підтипу І α та тейкопланін-подібні, що належать до рідкісного підтипу І β . У цьому підрозділі ми поставили за мету дослідити вплив надекспресій генів ДАНР обох типів на біосинтез тейкопланіну в *A. teichomyceticus*.

Гетерологічний ген *dahp*_{secABAL} було надекспресовано на інтегративній однокопійній плазміді pSETPAm. Для цього ділянку, що містить ген *dahp*_{secABAL} ми ампліфікували із хромосомної ДНК *Am. balhimycina* за допомогою високоточної полімерази Phusion з використанням праймерів *dahpbal_F/R*. Амплікон елюювали та субклонували у плазмиду pJET1.2., а його послідовність перевірили за допомогою секвенування. Фрагмент, що містить ген *dahp*_{secABAL}, вищепили із конструкту на основі pJET1.2. за допомогою ендонуклеаз рестрикції EcoRI та EcoRV. Отриманий фрагмент елюювали та клонували у вектор pSETPAm, розщеплений у EcoRI- та EcoRV-сайтах. Конструкт отримав назву pSETPAm_{dahpsecABAL} (рис.3.19), а його послідовність була перевірена за допомогою рестрикційного картування.

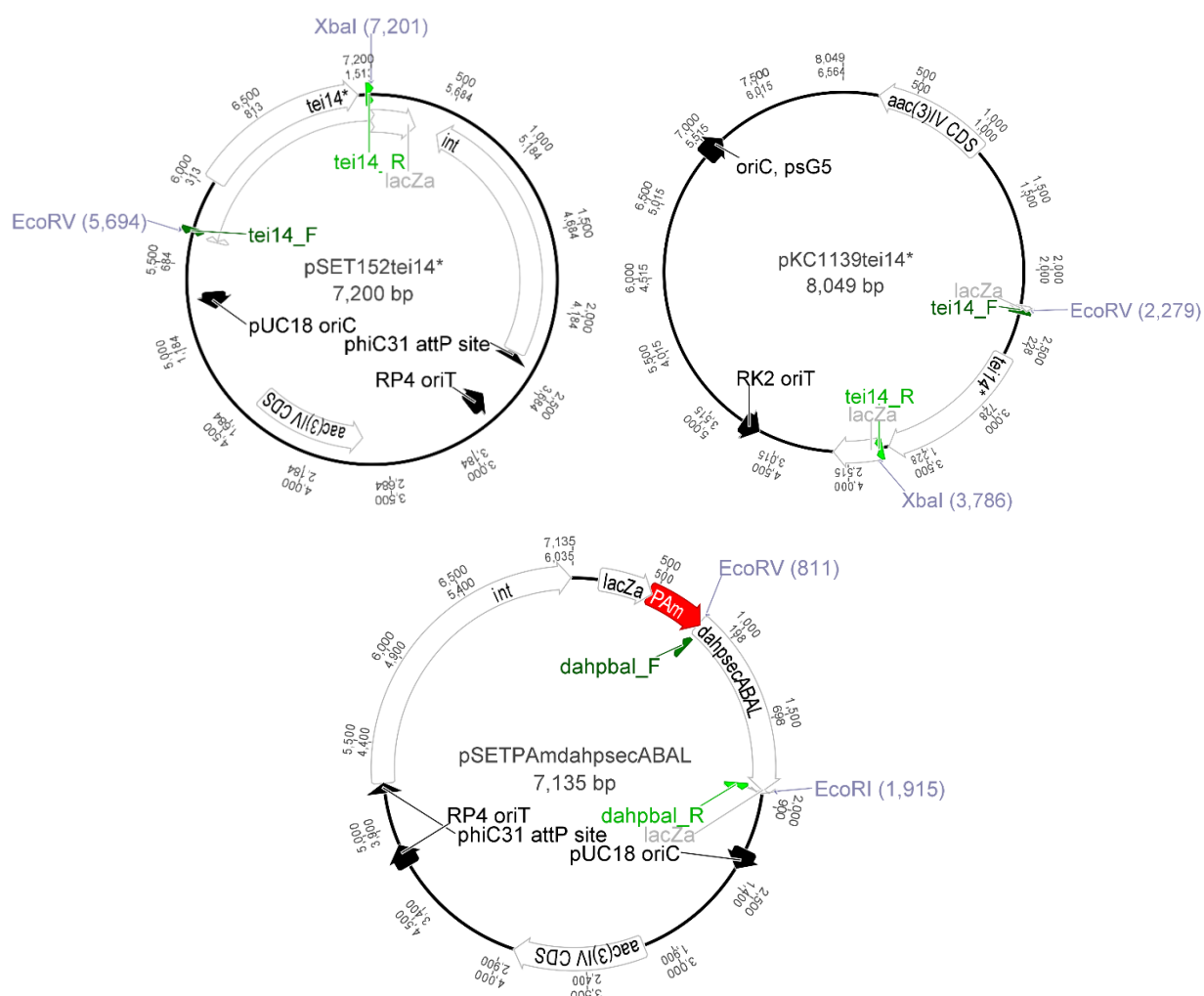


Рис.3.19 Будова рекомбінантних плазмід, використаних для надекспресії генів *dahp_{secABAL}* та *tei14** в *A. teichomyceticus*. Умовні позначення для pKC1139tei14*: RK2 oriT – оріджин кон'югаційного перенесення плазмід RK2, oriC, psG5 – оріджин реплікації плазмід psG5; інші умовні позначення для плазмід на основі pSRTPAм – див. рис. 3.1.

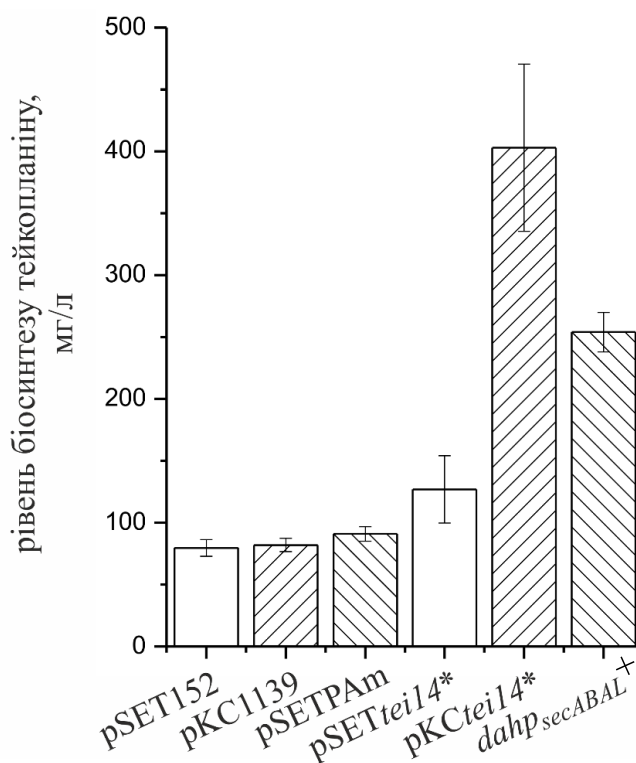
Ген *tei14** надекспресовано під контролем нативного промотора із використанням однокопійного інтегративного вектора pSET152 та вектора pKC1139, що є стабільною реплікативною плазмідною із помірною кількістю копій [11]. Наші попередні результати щодо експресії генів кластера біосинтезу тейкопланіну (див. підрозділ 3.3) показали, що *tei14** сильно експресуються за умов вирощування в середовищі TM1 (що використовується для продукції тейкопланіну, див пункт 2.3.11). Також, промотор *tei14** є ймовірною мішенню для шлях-специфічних регуляторів

кластера генів біосинтезу тейкопланіну [51]. Тому було вирішено не клонувати *tei14** під контроль гетерологічних промоторів, а надекспресувати його під контролем власного промотора.

Фрагмент, що містив ген *tei14** та його промоторно-операторну ділянку, ампліфіковано з хромосомної ДНК *A. teichomyceticus* за допомогою полімерази Phusion і праймерів *tei14F/R*. Отриманий фрагмент елюювали та обробили ендонуклеазами рестрикції *EcoRV* та *XbaI*. Потім його лігували з векторами *pSET152* та *pKC1139*, розщепленими тими самими ендонуклеазами. Отримані вектори перевіряли за допомогою рестрикційного картування (рис.3.19). Реконбінантні молекули перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 *pUZ8002*. Транскон'юганти відібрані як стійкі до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл. Інтеграцію вектора підтверджено за допомогою ПЛР з парою праймерів *Am_F/R*.

Рівень біосинтезу тейкопланіну визначено у всіх реконбінантних штамів: *A. teichomyceticus dahp_{secABAL}⁺* (несе *pSETPAmdahpsecABAL*), *A. teichomyceticus pSETtei14** та *A. teichomyceticus pKC1139tei14**. Ми виявили, що надекспресія *dahp_{balhisec}* приводила до збільшення рівня синтезу тейкопланіну більше ніж у двічі, подібно як і в *Am. balhimycina* [137] (рис.3.20).

Рис.3.20 Рівень синтезу тейкопланіну реконбінантними штамми *A. teichomyceticus* із надекспресіями генів *dahp_{secABAL}* та *tei14** у порівнянні із штамми, що несли відповідні вектори, без жодних клонованих генів.



Обидва штами із надекспресіями *tei14** – pSET*Tei14** та pKC1139*Tei14** синтезували в 1,5 та в 4 рази відповідно більше тейкопланіну ніж штами дикого типу (рис.3.20). Ефект у цьому випадку виявився залежним від вектора, який було застосовано для над експресії. Більше копій гена *tei14** зумовили помітніший позитивний ефект на рівень біосинтезу тейкопланіну.

Отже, ефекти надекспресій генів DAHP-синтаз, що належать до різних підтипів, були подібними. Хоча ці ферменти і мають різне походження, вони найімовірніше виконують одну функцію: забезпечення достатньої кількості тирозину для біосинтезу глікопептидів та мають подібні властивості. Тому, надекспресія генів *tei14** та *dahp_{secABAL}⁺* ймовірно гіперактивує біосинтез тирозину.

3.4.5. Збільшення рівня синтезу тейкопланіну шляхом зміщення метаболічного балансу між біосинтезом тирозину та фенілаланіну

Префенат, що синтезується в бактерійній клітині в шикіматному біосинтетичному шляху, може бути метаболізований в тирозин, чим завершується шикіматний шлях, або у фенілаланін. Остання реакція каталізується префенатдегідратазами (PDT). З'ясовано, що багато актинобактерійних префенатдегідратаз активуються тирозином і інгібуються фенілаланіном [1, 28, 138]. PDT з *Amycolatopsis mediterannei*, ензиматичні властивості якої вивчено експериментально, ідентична за амінокислотою послідовністю до PDT з *A. teichomyceticus* на 61% і більш, ніж на 90% – до PDT продуцента баліміцину *Am. balhimycina*. Така подібність амінокислотних послідовностей ферментів свідчить про подібність їх функцій.

Отже, маючи у своєму розпорядженні гени двох PDT (PDT_{ATE} з *A. teichomyceticus* та PDT_{ABAL} з *Am. balhimycina*), подібних до дегідратази із експериментально вивченими властивостями з *A. mediterannei*, ми вирішили застосувати ці гени для раціонального покращення продуцента тейкопланіну *A. teichomyceticus*. Ми припустили, що надекспресія генів, які їх кодують, повинна привести до різкого зростання пулу фенілаланіну в клітині. Враховуючи те, що

активність PDT інгібуються фенілаланіном, зростання концентрації фенілаланіну може пригнічуватиме активність PDT, а це в свою чергу може спричиняти збільшення пулу тирозину і підвищення рівня синтезу тейкопланіну.

Для того, щоб перевірити цю гіпотезу, ми сконструювали рекомбінантні штами із надекспресіями генів *pdt_{ATE}* та *pdt_{ABAL}*, що кодують префенатдегідрогенази *A. teichomyceticus* та *Am. balhimycina* відповідно. Гени клоновано у вектор pSETPAм під контроль конститутивного апраміцинового промотора. Ген *pdt_{ATE}* ампліфіковано із використанням пари праймерів *pdtATE_F/R*, а *pdt_{ABAL}* – пари праймерів *pdtBAL_F/R*. Отримані рекомбінантні вектори отримали назви pSETPAм*pdtATE* та pSETPAм*pdtABAL* (рис.3.21). Усі генно-інженерні маніпуляції при клонуванні та створенні рекомбінантних штамів виконано аналогічно до вже описаних у цьому розділі.

Аналіз продукції тейкопланіну в рекомбінантних штамів показав, що обидва *A. teichomyceticus* *pdt_{ATE}⁺* та *pdt_{ABAL}⁺* синтезували в понад два рази більше тейкопланіну порівняно зі штамми, які несли вектор без клонованих генів (рис.3.4.10, а).

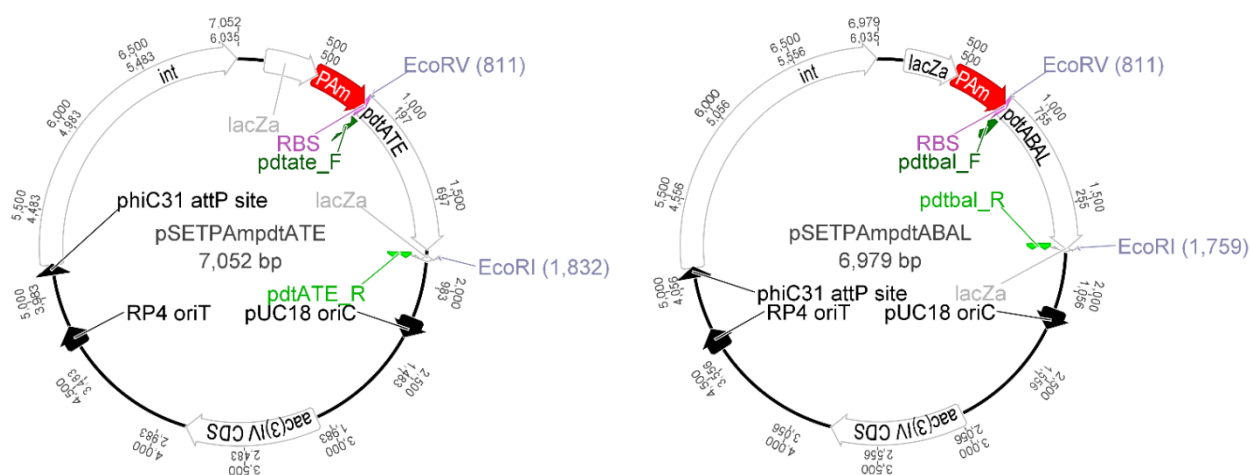


Рис.3.21 Будова рекомбінантних плазмідів, що використані для надекспресії генів *pdt_{ATE}* та *pdt_{ABAL}* (умовні позначення див. рис.3.1)

Цікаво, що перенаправлення пулу префенату в біосинтез тирозину вже було здійснено для *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptomyces refuines* шляхом додавання в середовище високих концентрацій L-фенілаланіну. Це зумовлювало

збільшення клітинного пулу фенілаланіну і блокування префенат-дегідратаз. [14, 124].

Ми спробували повторити подібний підхід для *A. teichomyceticus*. Виявилося, що штами, вирощені в середовищі TM1 із додаванням 5 мМоль фенілаланіну, продукували вдвічі більше тейкопланіну, аніж штами, вирощені без додавання фенілаланіну (рис.3.22, б). Ці значення близькі до отриманих на штаммах із надекспресіями генів PDT. Отримані дані вдруге вказують на те, що префенатдегідратаза первинного метаболізму *A. teichomyceticus* найімовірніше блокується за наявності великої концентрації фенілаланіну, незалежно від його екзогенного чи ендогенного походження.

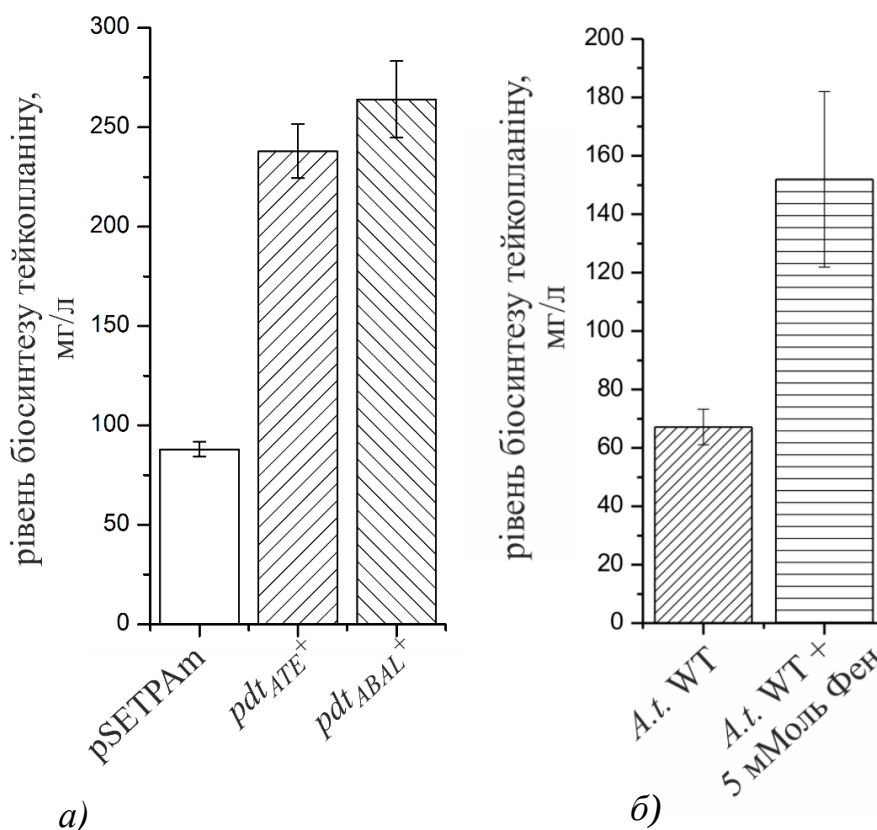


Рис.3.22 Рівень синтезу тейкопланіну: а) штамми, в яких надекспресовано *pdt_{ATE}*, *pdt_{ABAL}* у порівнянні із штамом, що ніс вектор pSETAm; б) штамми дикого типу за додавання 5 мМоль фенілаланіну порівнянно з контролем (WT).

Ми припускаємо, що збільшення рівня синтезу тейкопланіну як внаслідок додавання L-фенілаланіну, так і внаслідок надекспресій генів префенат-дегідратаз, підтверджує висловлену нами гіпотезу. А саме, отримані позитивні

ефекти є наслідком переспрямування пулу префенату в біосинтез тирозину, що досягається блокуванням функціонування PDT_{AT}. Особливо цікавим виглядає ефект додавання фенілаланіну, бо його можна застосовувати для того, щоби підвищити рівень синтезу тейкопланіну в інших штаммах, створених за допомогою генно-інженерних маніпуляцій.

Підсумовуючи написане в цьому підрозділі, потрібно відзначити, що забезпечення попередниками (а саме тирозином) біосинтезу тейкопланіну є дуже важливим. Сьогодні не так багато успішних прикладів метаболічної інженерії актинобактерій [37, 46, 63], тому отримані у цьому підрозділі надпродукуючі штами відкривають шлях новим способам створення штамів-продуцентів глікопептидів із збільшеним рівнем синтезу антибіотиків. Більше того, привабливою є перспектива комбінації надекспресії генів, продукти яких забезпечують біосинтез попередників глікопептидів, разом із генами позитивних глобальних та шлях-специфічних регуляторів біосинтезу, що може дати кумулятивний ефект на продукцію антибіотиків.

Продуктами генів *tei14** та *tei24**, що містяться в кластері біосинтезу тейкопланіну, є дезокси-D-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтаза та префенатдегідрогеназа відповідно. Надекспресії цих генів ведуть до підвищення рівня синтезу тейкопланіну, що дозволяє робити припущення про роль *tei14** та *tei24** в біосинтезі тейкопланіну (рис. 3.23).

Отже, на нашу думку, ген *tei14** кодує DANPS, що бере участь в першій реакції біосинтезу тирозину, і, ймовірно, піддається ретроінгібуванню тирозином. У свою чергу, *tei24** кодує префенатдегідрогеназу, здатну каталізувати перетворення як префенату, так і арогенату у тирозин.

Наявність С-термінального АТС-подібного регуляторного домену у Tei24* може свідчити про те, що цей фермент також зазнає ретроінгібування тирозином. Цікаво, що надекспресія як повного гена *tei24**, так і *tei24*_{tr}* (в якого відсутня частина, що кодує АТС-домен) мали різний вплив на синтез тейкопланіну: у першому випадку рівень синтезу тейкопланіну зростає, у другому – не змінювався. Ми вважаємо, що ключову роль у цьому відіграє наявність та

відсутність саме АТС-домена. За відсутності АТС-домену фермент стає нерегульованим і безконтрольно збільшує пул тирозину, що призводить до активації префенатдегідратази (PDT_{AT}) та до перетворення надлишку тирозину в фенілаланін.

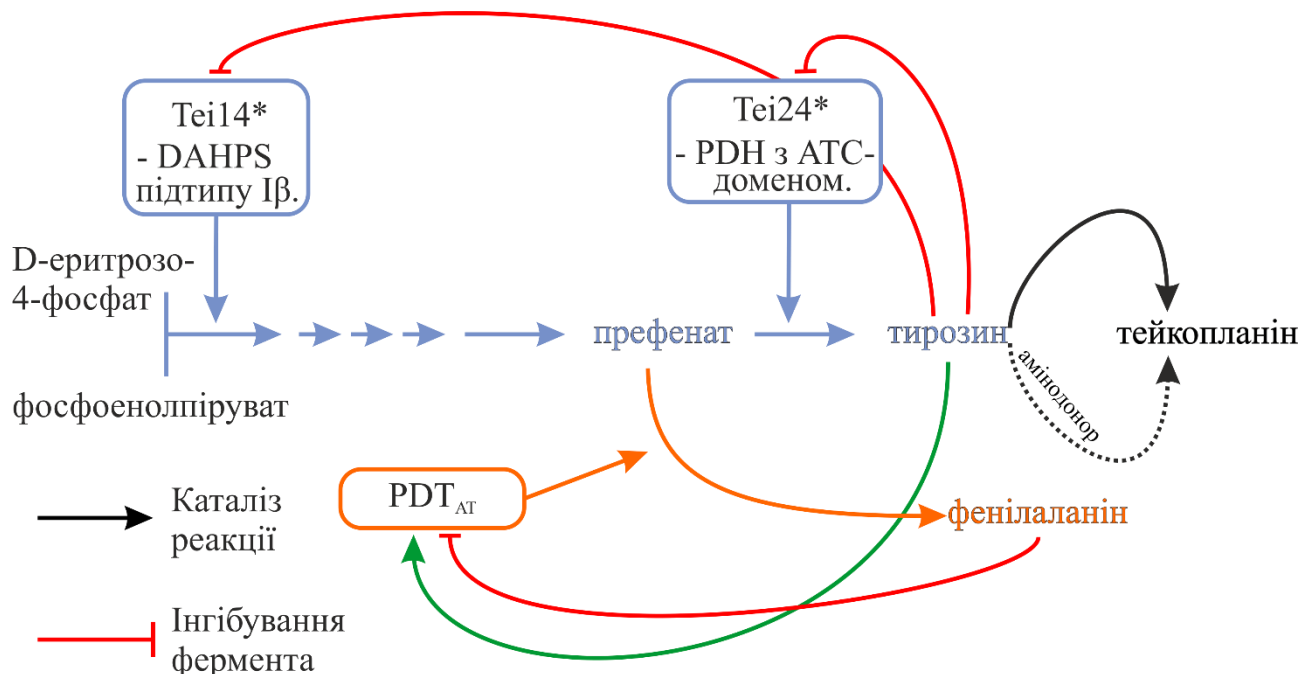


Рис. 3.23 Схема, що ілюструє роль ферментів, задіяних в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну тирозином, та гадані взаємозв'язки між ними та субстратами.

Надекспресія гена регульованої PDH ймовірно збільшує пул тирозину до кількості, достатньої для зростання біосинтезу тейкопланіну, але недостатньою для запуску конкурентного метаболічного шляху біосинтезу фенілаланіну. Оскільки PDT_{AT} найімовірніше блокується надлишком власного продукту – фенілаланіну, то блокування цього метаболічного дає змогу збільшити продукцію тейкопланіну.

Результати досліджень *in silico* та *in vivo* показують, що DAHPS та PDH, кодовані генами *tei14** та *tei24**, значно відрізняються від досліджених функціональних аналогів із кластера біосинтезу баліміцину. Так, Tei14* є DAHPS Іβ підтипу, що характеризується унікальною тривимірною структурою (рис.3.18). На противагу цьому, DAHPS_{secABAL} належить до Іα підтипу та має іншу тривимірну структуру. Далі, гени, що кодують DAHPS підтипу Іα характерні для всіх ванкоміцин-подібних кластерів глікопептидів: ванкоміцинового,

хлороеремоміцинового, баліміцинового, рістоцетинових та інших кластерів. DАНPS підтипу I β кодовані генами в кластерах біосинтезу тейкопланін-подібних антибіотиків (тейкопланіну, UK-68,597 та ін.). Аналогічний розподіл спостерігаємо і у префенатдегідрогеназ, що кодовані в кластерах біосинтезу глікопептидів. Перша група зустрічається у кластерах біосинтезу ванкоміцин-подібних глікопептидів (а деякі її представники тяжіють до втрати АСТ-регуляторного домена); інша група, із відмінним еволюційним походженням, як показують дані нашої філогенетичної реконструкції, зустрічається у кластерах біосинтезу тейкопланін-подібних глікопептидів. Подібна тенденція дає підставу зробити припущення, що предковий кластер біосинтезу глікопептидних антибіотиків взагалі не містив генів, які кодують ферменти шляху біосинтезу тирозину. Проте, дальший позитивний селекційний тиск сприяв відбору кластерів, у які в ході конвергентної еволюції із різних джерел потрапляли гени ферментів біосинтезу тирозину. У такий спосіб внаслідок незалежних процесів кластери біосинтезу тейкопланін-подібних антибіотиків отримали гени, які кодували DАНPS підтипу I β та PDH, а кластери біосинтезу ванкоміцин-подібних антибіотиків – гени DАНPS підтипу I α та PDH.

За матеріалами підрозділу опубліковано [167].

3.5. Особливості морфології та життєвого циклу *A. teichomyceticus*

У цьому підрозділі ми поставили на мету дослідити в деталях особливості морфології *A. teichomyceticus* за умов вирощування на різних середовищах, а також охарактеризувати послідовність життєвого циклу цього штаму за допомогою різних методів мікроскопії, включаючи світлову та електронну сканувальну мікроскопію.

3.5.1. Мікроморфологія *A. teichomyceticus* за умов вирощування на різних агаризованих середовищах

Інформації про особливості росту *A. teichomyceticus* на різних агаризованих середовищах на сьогоднішній день практично немає. Не описаною є і морфологія цієї актинобактерії за різних умов вирощування. Із літератури відомо лише те, що *A. teichomyceticus* здатний формувати спорангії на середовищі ISP3. У свою чергу, ми вирішили перевірити ріст *A. teichomyceticus* на низці найпоширеніших середовищ, що використовують для культивування актиноміцетів. Це були такі середовища: ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, ISP7, хітинове, Бенета, Чапека, соєво-манітоловий агар (СМ), L-агар (див. підрозділ 2.2, додаток В).

На середовищах ISP2 та Бенета *A. teichomyceticus* ріс добре, формуючи великі колонії вже на третій день культивування. Колонії формувалися за нокардіальним типом, вони слабо вросли в агар. Диференціація субстратного міцелію із формування спорангіїв на таких середовищах не відбувалася: на 6 день росту культури утворювалися тільки окремі гіфи повітряного міцелію. Гіфи вегетативного міцелію на цих середовищах мали яскраво-помаранчеве забарвлення (рис.3.24, а, к).

На середовищах ISP3 та СМ *A. teichomyceticus* активно спорулював, формуючи спорулюючий газон на 6-7 день росту культури (рис.3.24, б, з). Колонії вросли в агар. Вегетативні гіфи на середовищі ISP3 мали помаранчево-кремове забарвлення, на середовищі СМ – кремове. На середовищі СМ *A. teichomyceticus* синтезував меланоїдний пігмент (рис.3.24, з).

На середовищах ISP4, ISP5, ISP6, ISP7, L-агарі та хітиновому середовищі *A. teichomyceticus* формувал незабарвлений вегетативний міцелій, колонії вросли в агар, але формування спорангіїв не спостерігалось; морфологічний розвиток на цих середовищах зупинявся на етапі формування спорангіофорів (рис.3.24, а, б, в, г, д, е, є). Синтез меланоїдного пігменту також спостерігали на середовищі ISP6.

На середовищі Чапека *A. teichomyceticus* формувал вегетативний міцелій кремового кольору із надзвичайно добре розвиненим повітряним міцелієм (рис.3.24, ж), проте без формування спорангіїв.

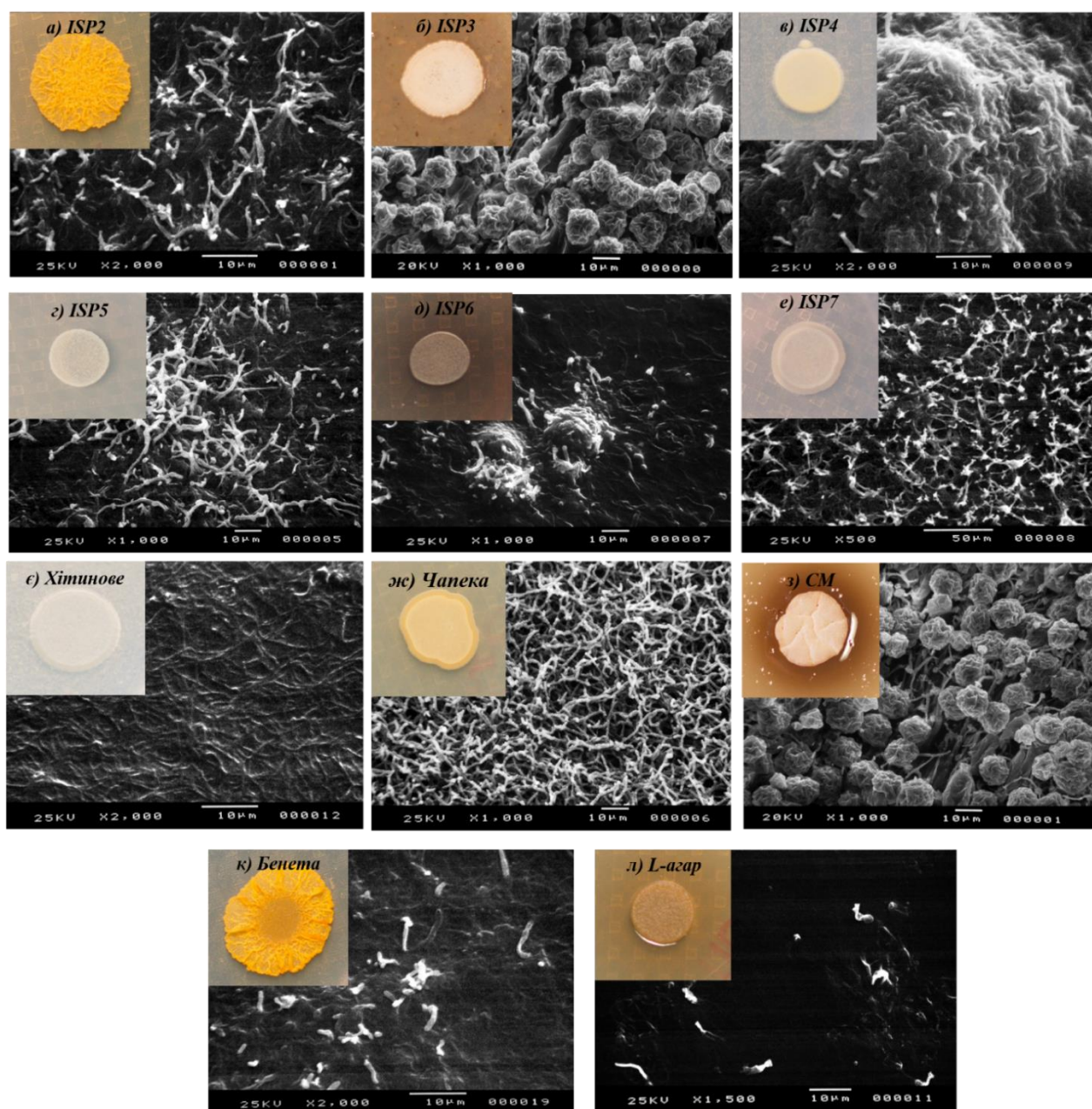


Рис.3.24 Морфологія колоній та мікоморфологія поверхонь газонів *A. teichomyceticus* на 6 добу вирощування на різних агаризованих середовищах.

3.5.2. Особливості життєвого циклу *A. teichomyceticus*

Життєвий цикл добре описано для актинобактерій, що належать до роду *Streptomyces*. Зазвичай він включає проростання спор, утворення субстратного міцелію, на поверхні якого формується спороносний повітряний міцелій [17]. Умови, за яких відбувається споруляція у стрептоміцетів, добре вивчені. Для актинопланет подібні дані є вкрай фрагментарними [47, 48, 77]. Так як в подальшому в нашій роботі ми планували вивчення механізмів глобальної регуляції в *A. teichomyceticus*, зрозуміло, що необхідно було докладно вивчити життєвий цикл *A. teichomyceticus* дикого типу, інформація про який сьогодні відсутня. Ми встановили, що найкращими середовищами, на яких *A. teichomyceticus* формує спорангії протягом 6 днів є середовища ISP3 та СМ (див. пункт 3.5.1) Тому ми почали дослідження життєвого циклу *A. teichomyceticus* за умов культивування саме на цих середовищах.

3.5.2.1 Вихід та проростання спор *A. teichomyceticus*. Характерною особливістю актинопланет є здатність формувати рухомі спори всередині спорангіальних структур. Відомо, що спорангії із спорами формуються на поверхні субстратного міцелію за умов тривалого культивування на різних агаризованих середовищах у різних представників роду *Actinoplanes* [48, 77]. Ряд чинників, серед яких просте зволоження, як у випадку з *Actinoplanes sp.* 7-10 [77] або додавання водної витяжки із лісового ґрунту (із триггером невідомої природи [144]) спричиняють вихід спор із спорангіїв.

У випадку *A. teichomyceticus* ми виявили, що для виходу спор із спорангіїв також достатньо простого зволоження. Для того, щоби спостерігати процес виходу спор із спорангіїв, ми зробили змиви із шестиденних газонів. Спостереження мікропрепаратів, зроблених з цих змивів, показали, що після змочування спори всередині спорангію набрякали та збільшувалися у розмірах. Це приводило до розриву спорангіальної оболонки (рис.3.25, а, б) (подібний процес було показано для *Actinoplanes sp.* 7-10, [47]). Вихід спорангіоспор починався на 30 хвилину після змивання (рис.3.25, в, г), проте спори починали рухатися раніше, часто знаходячись ще всередині спорангію.

Діаметр поодинокі вивільненої спори становив близько 1 мкм, проте ці розміри могли незначно варіювати. Вивільнені спори були як поодинокими, так і могли формувати ланцюжки (рис.3.25, е).

У геномі *A. teichomyceticus* ми виявили лише один ген, що кодує флагеллін, який був ортологом гена *fliC* з *Actinoplanes missouriensis*. Білок FliC є єдиним флагеліном в *A. missouriensis* і відповідає за рух спор [159]. FliC-білки *A. teichomyceticus* та *A. missouriensis* ідентичні за амінокислотними послідовностями на 62,2%. Імовірно, що й будова джгутиків спор у *A. teichomyceticus* і *A. missouriensis* аналогічна. Після 1 год інкубування суспензії спорангіїв в термостаті при температурі 30 °C спори вивільнялися із понад 90 % спорангіїв.

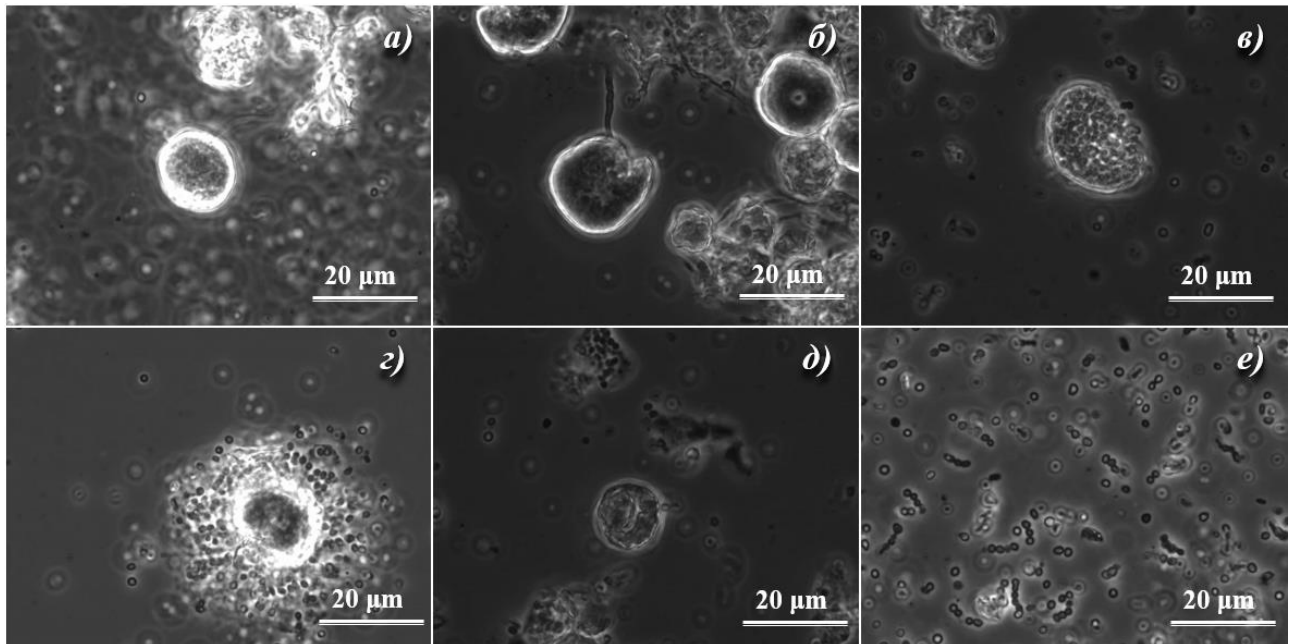


Рис.3.25 Вивільнення спор зі спорангіїв у *A. teichomyceticus*: а) інтактний спорангій; б) початок набрякання спор, в оболонці спорангію з'являється розрив; в-г) етапи вивільнення рухливих спор; д) пуста спорангіальна оболонка; е) вільні плаваючі спори.

Отримані дані мають важливе значення для приготування спорових препаратів *A. teichomyceticus* із визначеним титром спор. З них випливає, що всі маніпуляції із споровою суспензією потрібно здійснювати після її

інкубування при температурі 30°C протягом більш, ніж 1 години. Лише в цьому випадку гарантується однорідний вихід спор із спорангіїв.

Далі вивільнені спори продовжували набрякати; діаметр окремої спори збільшувався до 2-3 мкм. Після 5-6 годин активного руху, спори втрачали мобільність і починався процес проростання. Проростання спостерігали у воді, в рідкому середовищі E25 та на агаризованому середовищі ISP3. У випадку рідкого середовища, 10^6 спор вносили в 50 мл середовища E25, проростання спостерігали за допомогою світлового мікроскопа після 5 годин інкубування на орбітальному шейкері (30°C, 200 об./хв). Для візуалізації проростання спор та ранніх етапів формування субстратного міцелію на агаризованому середовищі ми наносили краплю ISP3 на предметне скло, на яку інокулювати 10^3 спор. Для уникнення висихання краї покривного шкельця отриманих препаратів заливали парафіном. Для проростання спор ми інкубували отримані зразки протягом 10-12 годин при температурі 30°C, після чого аналізували за допомогою світлової мікроскопії.

Отже, для проростання спори вистачало лише присутності вологи без мінеральних солей чи якихось інших компонентів. Після формування проросткової трубки (рис.3.26 а, б) починав формуватися розгалужений субстратний міцелій (рис.3.26 в-д). Цікаво, що в спорангіях, з яких не відбувся вихід спор, на агаризованому середовищі проростала більшість спор (рис.3.26 е).

3.5.3.2. Морфологічна диференціація *A. teichomyceticus*. Після проростання спор *A. teichomyceticus* формується вегетативний міцелій. За умов культивування в рідкій культурі вегетативний міцелій не фрагментується, для культури характерне формування великих (діаметром > 0,1 мм) гранул із переплетених гіфів. Споруляція за умов зануреної культури не спостерігається в більшості рідких середовищ. Як виняток, поодинокі спорангії можна іноді бачити в старих (більше 7 днів) культурах, вирощених в продукційному середовищі TM1.

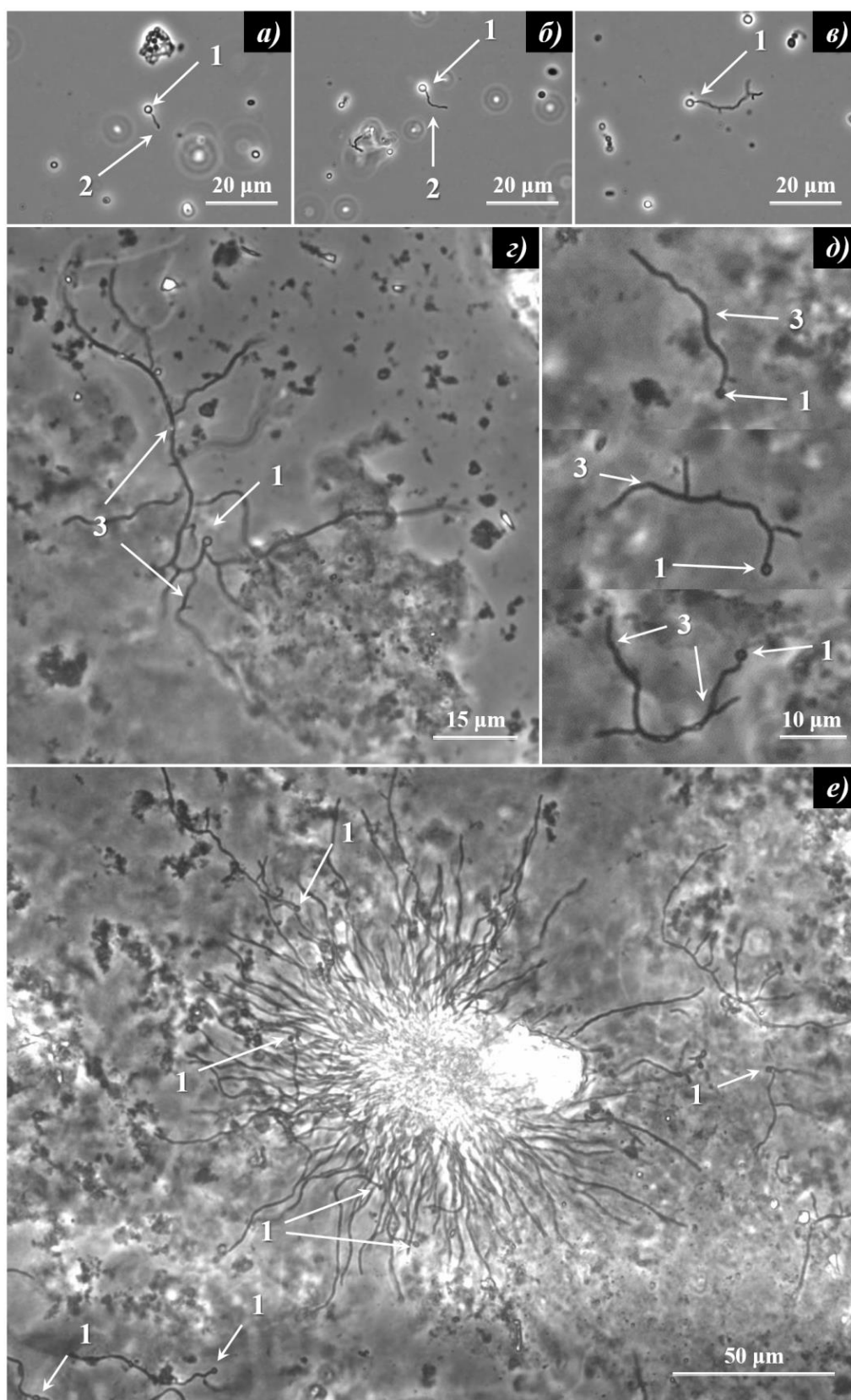


Рис.3.26 Проростання спор *A. teichomyceticus*: *a,б,в*) проростаючі спори (1) із проростковими трубками (2) після 5-6 годин інкубування у рідкому середовищі, *г,д*) пророслі спори (1) формують субстратний міцелій (3) після 10-16 годин росту на ISP3; *е*) проростання цілого спорангію на ISP3 (1).

На агаризованих середовищах ISP3 та CM розвиток вегетативного міцелію тривав протягом першої та другої діб культивування. Формування гіфів повітряного міцелію на цих середовищах починалося на третю добу культивування, при чому цей процес ініціювався в окремих точках субстратного міцелію, як це помітно на рис.3.27, а).

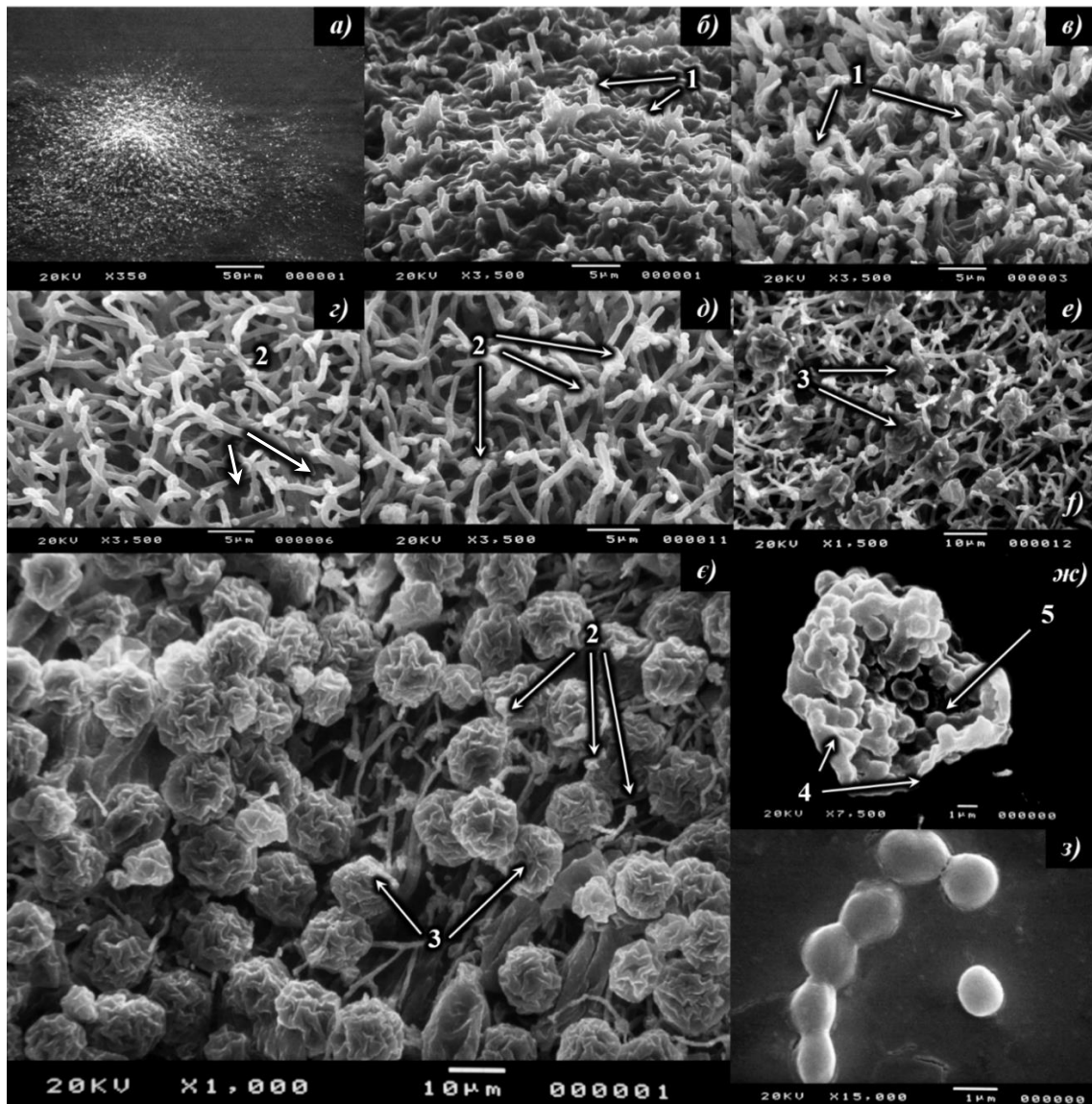


Рис.3.27 Основні етапи розвитку *A. teichomyceticus* на CM-агарі: а), б) початок проростання спорангієносних гіфів (1, 2-а доба культивування); в) ріст спорангієносних гіфів (1, 3-а д.к.); г, д) поява та ріст зародкових спорангіїв (2, 4-5-і д.к.); е) поява дозрілих спорангіїв (3, 6-а д.к.); є) повністю розвинений газон із превалюванням дозрілих спорангіїв (3, 7-а д.к.); ж) зруйнований спорангій, можна розрізнити спорангіальну оболонку (4) та спори (5); з) окремі спори. Фотографії отримано за допомогою СЕМ.

Після проростання гіфів повітряного міцелію на 3 добу вирощування на середовищах ISP3 та CM відбувалося формування спорангіїв. Дозрівання спорангіїв тривало протягом п'ятої – сьомої діб росту культур.

Формування спорангіїв йшло по-різному на середовищах ISP3 та CM: в культурі, що вирощувалася на CM процес дозрівання відбувався повільніше і проходив градуально, фази формування зародкових та зрілих спорангіїв йшли послідовно (рис.3.27). Натомість на середовищі ISP3 на всіх етапах росту можна було спостерігати паралельно зародкові та дозрілі спорангії (рис.3.28). Тому розвиток *A. teichomyceticus* на середовищі CM було нами обрано як модельний випадок морфологічної диференціації цього організму.

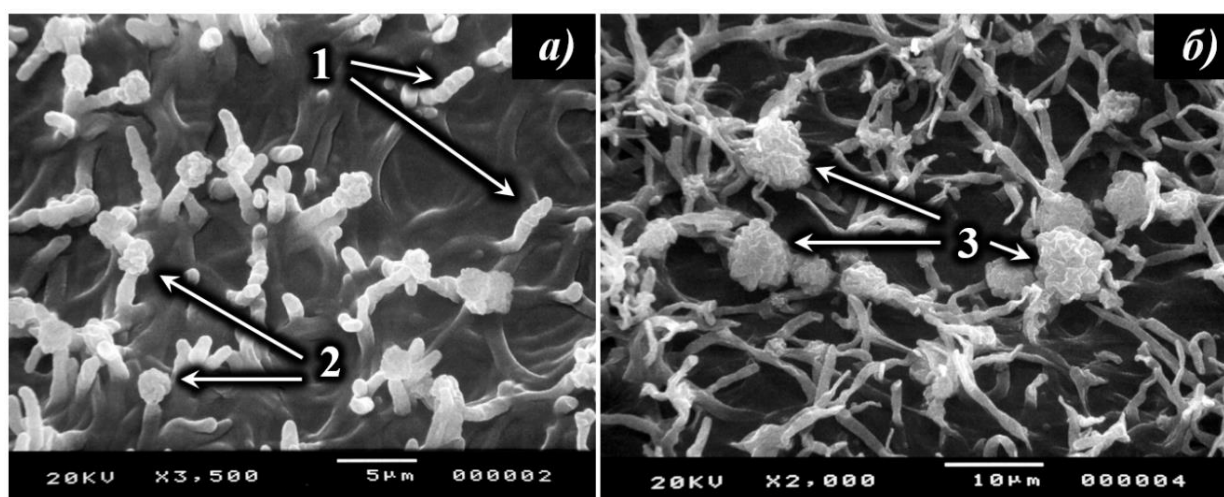


Рис.3.28 Розвиток *A. teichomyceticus* на ISP3: а) на 3-ий день культивування зародкові спорангії присутні на поверхні газону (2), разом із гіфами повітряного міцелію (1); б) вже на 4-ий день культивування на поверхні газону з'являються зрілі спорангії (3).

Враховувавши усі отримані дані, ми узагальнили особливості життєвого циклу *A. teichomyceticus* при культивуванні на агаризованому середовищі CM за температури 30 °C на схемі, зображеній на рис.3.29. Нижче виділено етапи розвитку *A. teichomyceticus* на агаризованому середовищі CM.

- 1) **Проростання спор та формування вегетативного міцелію.** Після того, як спори потрапляють на поверхню поживного середовища, вони проростають

та протягом перших двох діб утворюють вегетативний міцелій (рис.3.29, а-б).

- 2) **Проростання гіфів повітряного міцелію.** Після двох діб культивування гіфи повітряного міцелію з'являються на поверхні вегетативного міцелію. На відміну від повітряних гіфів у стрептоміцетів вони ніколи не галузяться (рис.3.29, в). Протягом третьої доби гіфи повітряного міцелію ростуть у висоту.
- 3) **Формування зародків спорангіїв.** На четвертій добі культивування на кінцях гіфів повітряного міцелію формуються зародки спорангіїв (рис.3.29, г). Фактично, кожна гіфа повітряного міцелію потенційно є спорангієсною.
- 4) **Розвиток спорангіїв.** Протягом четвертої-п'ятої діб культивування зародкові спорангії збільшуються в розмірах (від 1,5-2 мкм, рис.3.29, д, е) на шосту добу перетворюючись на дозрілі сферичні спорангії (>20 мкм, рис.3.29, є). Поки залишається незрозумілим, як саме відбувається формування спор всередині спорангію. Існують роботи, що роблять спробу описати цей процес [77], проте остаточна гіпотеза відсутня.
- 5) **Вихід спор.** Зволоження дозрілих спорангіїв ініціює вивільнення рухливих спор (рис.3.29, ж,з). На цьому життєвий цикл *A. teichomyceticus* замикається.

3.5.3.3. Гени SapB-подібного сурфактанту *A. teichomyceticus*. Ранні етапи росту повітряного міцелію *A. teichomyceticus* сильно нагадували такі ж у стрептоміцетів. Відомо, що у подоланні поверхневого натягу вологої поверхні проростаючими гіфами повітряного міцелію беруть участь гідрофобні білки (гідрофобіни), що містяться в клітинних стінках стрептоміцетів [93]. На початку головну роль у цьому процесі відіграє сурфактант SapB, пізніше чапліни [30] та родліни [21].

Ми вирішили дослідити наявність генів біосинтезу вищезгаданих гідрофобінів в геномі *A. teichomyceticus*. Для цього ми шукали гомологів генів SCO2699 (представник родини чаплінів *S. coelicolor*) та SCO2718 (представник родини родлінів *S. coelicolor*). Встановлено, що гени, які кодують білки із

характерними для родлінів та чаплінів консервативними гідрофобними доменами, в геномі *A. teichomyceticus* відсутні.

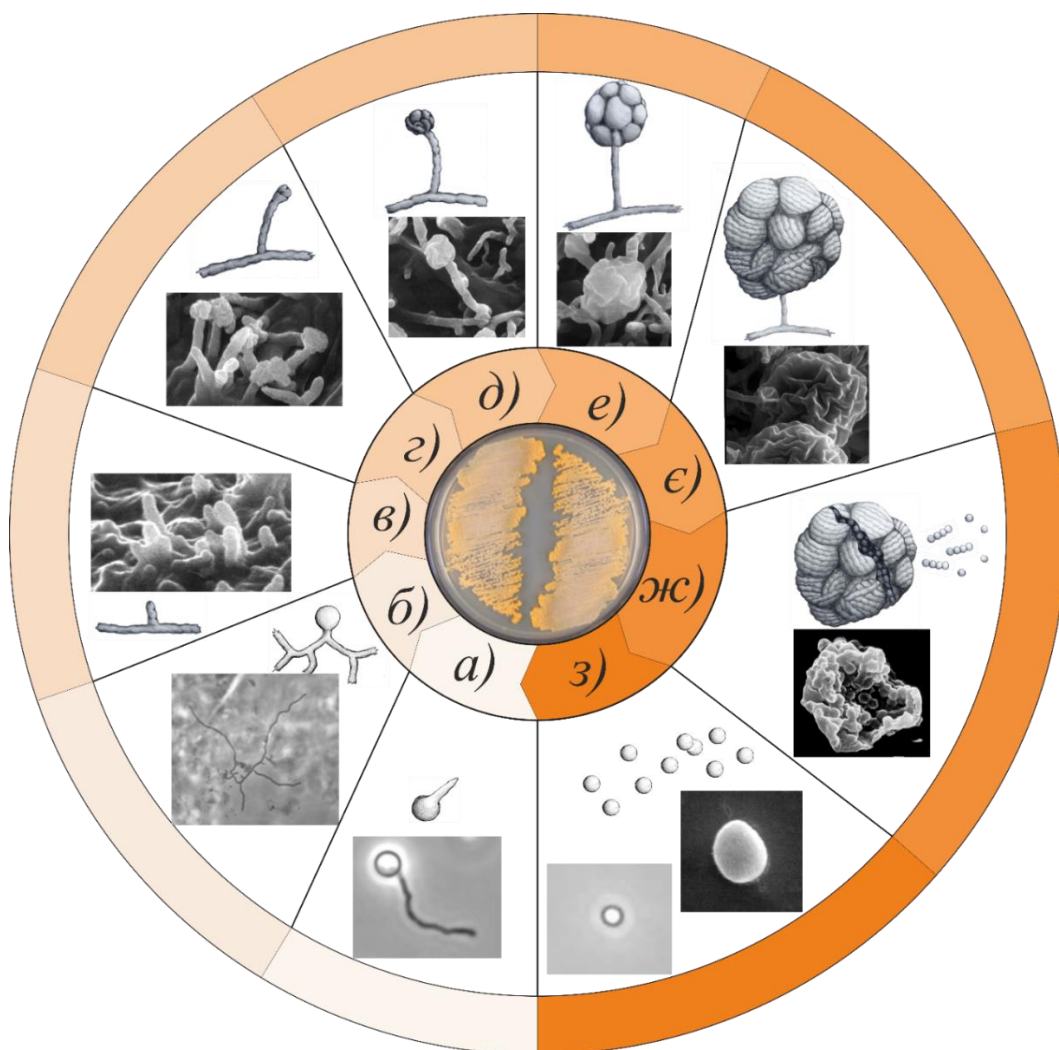


Рис.3.29 Узагальнена схема життєвого циклу *A. teichomyceticus* (коментарі в тексті).

Однак усі гени, необхідні для біосинтезу SapB було знайдено. У стрептоміцетів це один кластер з чотирьох генів *ramCSAB* [68], які транскрибуються з утворення однієї поліцистронної мРНК. У *A. teichomyceticus* знайдено близьких ортологів всіх генів *ram*-кластера з *S. coelicolor* (SCO6681-SCO6685), а саме гени *ATEI_4514-ATEI_4518*. Обидва кластери виявилися абсолютно синтеничними, а їх нуклеотидні послідовності ідентичні на 62,6 %. Дальший аналіз показав, що всі секвовані геноми представників родини *Micromonosporaceae*, представлені в базах даних NCBI, містять *ram*-кластери. Присутність *ram*-подібних кластерів у представників таких віддалених родин як

Micromonosporaceae та *Streptomycetaceae* вказує на стародавність та важливість цих генів.

Для того, щоб перевірити роль виявлених *ramCSAB*-генів у *A. teichomyceticus*, ми порівняли експресію цього кластера в культурах, які активно формували повітряний міцелій (вирощених на ISP3) та таких, що його слабо формували (вирощених на ISP2), за допомогою напівкількісної ПЛР із зворотною транскрипцією. Для цього виділено сумарну РНК із культур *A. teichomyceticus*, що росли на вказаних вище середовищах. Отриману з неї кДНК ми використали для ампліфікації внутрішньої ділянки гена *ramA* за допомогою праймерів *ram_RT_F* та *ram_RT_R* (додаток Б). Ампліфікація бажаного фрагмента відбулася в реакції, де як матрицю використано кДНК, отриману із сумарної РНК із культури, вирощеної на ISP3 (рис.3.30, а, ISP3).

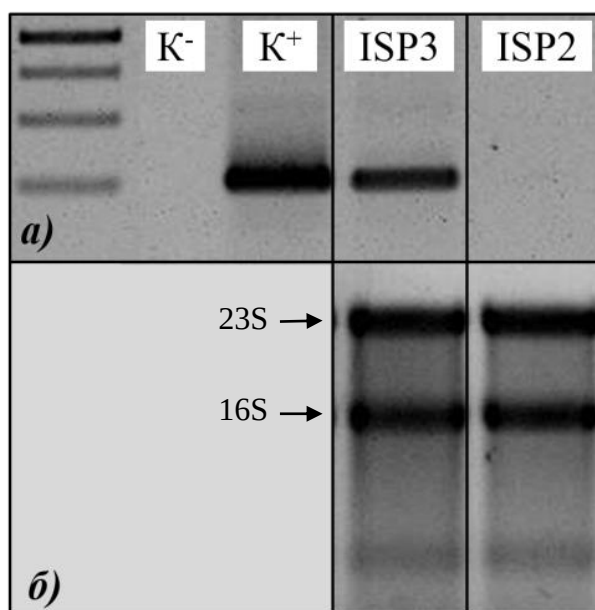


Рис.3.30 Результати аналізу експресії *ram*-кластера в культурах *A. teichomyceticus*, що росли на ISP2 (де не формується розвинений повітряний міцелій та спорангії) та ISP3 (де формується розвинений повітряний міцелій та спорангії): а) ~ 260 п.н. *ramA*, ампліфікована із: сумарної ДНК (K⁺); зразок без додавання хромосомної чи кДНК (K⁻); кДНК, синтезованої на матриці РНК, виділеної з культур, що росли на ISP2 та ISP3; б) відповідні зразки сумарної РНК; верхня та нижня смуги відповідають 23S та 16S РНК.

Отже, у цьому підрозділі нами було вперше описано повний життєвий цикл представника родини *Micromonosporaceae* – *A. teichomyceticus*. Найкращими середовищами, на яких проходить повна морфологічна диференціація, виявилися середовища СМ та ISP3. На них *A. teichomyceticus* добре спорулює, формуючи багато спорангіїв. Життєвий цикл *A. teichomyceticus* значно відрізняється від життєвих циклів, описаних для стрептоміцетів. Цікавою відміною є відсутність у *A. teichomyceticus* таких важливих поверхнево-активних гідрофобних білків як родліни та чапліни. Експериментально доведено [21], що вони відіграють ключову роль у проростанні гіфів повітряного міцелію у стрептоміцетів, а пізніше формують гідрофобне покриття спороносних гіфів та спор. Відсутність в геномі *A. teichomyceticus* генів для біосинтезу таких гідрофобних білків дає підстави для припущення про існування у *A. teichomyceticus* якихось нових, досі невідомих видів гідрофобінів. Найзагадковішим аспектом морфогенезу *A. teichomyceticus* залишається процес формування спор у спорангіях.

Ми також виявили, що середовища ISP2 та Бенета найбільш сприятливі для продукції каротиноїдного пігменту, а на середовищі ISP5 продукувався меланоїдний пігмент. Взагалі, багато представників *Micromonosporales* здатні до продукції каротиноїдів; у *Salinispora tropica* подібне забарвлення обумовлене наявністю каротиноїду сіоксантину. Описано два кластера генів (*terp1*, *terp2*), а також дві окремі відкриті рамки зчитування (*strop_0241* та *strop_2408*), задіяні у біосинтезі сіоксантину [111]. Дослідивши геном *A. teichomyceticus* ми знайшли ортологів генів обох кластерів *S. tropica*. Проте ортологи *strop_0241* та *strop_2408* відсутні. Більше того, у *A. teichomyceticus* організація цих генів відрізнялася від такої у *Salinispora*: гени виявилися згрупованими в три кластери: *crt1.1* та *crt1.2*, що відповідають *terp1*, та *crt2*, що відповідає *terp2* (рис.3.31). Беручи за основу наявний генетичний потенціал, ми спробували передбачити структуру сіоксантиноподібного каротиноїду для *A. teichomyceticus*. Для цього ми порівняли набір генів, продукти яких забезпечують реакції, описані для біосинтезу сіоксантину в *S. tropica* [Richter et al., 2015], з тим набором ортологів, що були знайдені в *A. teichomyceticus*

і за аналогією реконструювали шлях біосинтезу та ймовірну хімічну структуру сіоксантин-подібного каротиноїда *A. teichomyceticus* (рис.3.32).



<i>A. teichomyceticus</i>	Ортолог із <i>S. tropica</i>	Функція
ATEI_1637	strop_3248	CrtD, десатураза
ATEI_1638	strop_3247	CruC, глікозилтрансфераза
ATEI_1639	strop_3246	CruF, гідратаза
ATEI_1640	strop_3245	ацетилтрансфераза
ATEI_1641	strop_3244	CrtA, сфероїденова монооксигеназа



<i>A. teichomyceticus</i>	Ортолог із <i>S. tropica</i>	Функція
ATEI_1609	strop_3251	CrtE, поліпреніл сингетаз
ATEI_1610	strop_3250	метилентетрагідрофолат редуктаза
ATEI_1611	strop_3249	фосфатидилтрансфераза



<i>A. teichomyceticus</i>	Ортолог із <i>S. tropica</i>	Функція
ATEI_0222	strop_4437	регулятор MerR-родини
ATEI_0223	strop_4438	Ipi, ізопентил-дифосфат δ -ізомераза
ATEI_0224	strop_4439	CrtI, фітоєнова дегідрогеназа
ATEI_0225	strop_4440	CrtE, поліпреніл сингетаз
ATEI_0226	strop_4441	CrtB, фітоєнова синтеза

Рис.3.31 Кластери, продукти генів яких ймовірно задіяні в біосинтезі каротиноїдів у *A. teichomyceticus*.

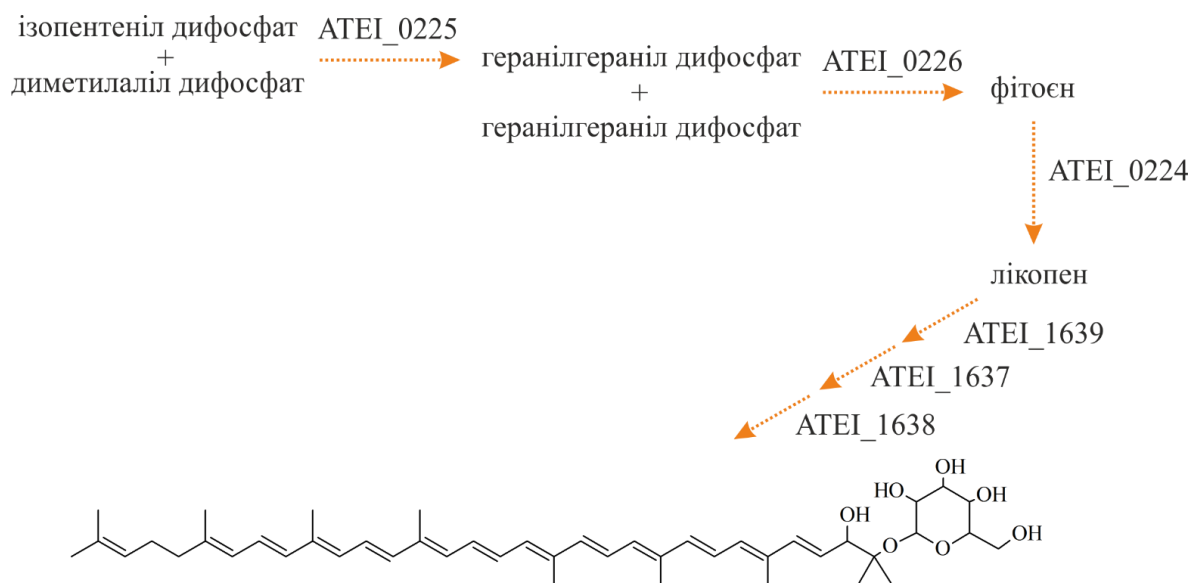


Рис.3.32 Реконструкція ймовірного біосинтетичного шляху та структура сіоксантин-подібного каротиноїду, який ймовірно визначає забарвлення гіфів у *A. teichomyceticus*.

Аналогічно, ми знайшли в геномі *A. teichomyceticus* гени *ATEI_4318-4319*, продукти яких найімовірніше задіяні у біосинтезі меланоїдних пігментів.

Уся отримана інформація необхідна для дальшого аналізу генетичного контролю морфогенезу в *A. teichomyceticus*: знаючи, як відбувається морфогенез референтного штаму дикого типу, опис штамів із відмінностями в морфологічному розвитку не складатиме жодних труднощів.

Матеріали підрозділу опубліковано в [163, 173].

3.6. Глобальна регуляція біосинтезу тейкопланіну та морфогенезу у *A. teichomyceticus*

Такі бактерії, як *Mycobacteria* та *Actinobacteria* репрезентовані організмами, що демонструють різноманітні життєві форми та життєві цикли з чергуванням поколінь [23, 65]; ці процеси є добре регульованими за допомогою багатокомпонентних регуляторних механізмів (серед актинобактерій найбільш дослідженими для стрептоміцетів [93]). Основною життєвою формою стрептоміцетів є багатоклітинний полінуклеоїдний вегетативний міцелій, який диференціюється із утворенням повітряного міцелію, що розвивається в ланцюжки одноклітинних спор [150]; паралельно розпочинається біосинтез вторинних метаболітів. Регуляторні механізми морфогенезу та вторинного метаболізму є взаємопов'язаними.

Незважаючи на те, що глобальні регуляторні механізми морфогенезу та вторинного метаболізму в представників роду *Streptomyces* добре досліджені, дані про аналогічну регуляцію в нестрептоміцетних актинобактерій вкрай обмежені [19]. До початку нашої роботи не було публікації, в яких були б описані глобальні регуляторні механізми у таких актинобактерій, як актинопланети (родина *Micromonosporales*), що утворюють рухомі спори всередині великих спорангієподібних структур.

Гени регуляторних каскадів морфогенезу та вторинного метаболізму є консервативними та присутні в багатьох секвенованих геномах стрептоміцетів [16]. Логічно допустити, що останній спільний предок актинопланет і стрептоміцетів вже мав якісь із цих регуляторних механізмів. Тому в цьому підрозділі ми зосередилися на дослідженні механізмів глобальної регуляції біосинтезу тейкопланіну та морфогенезу в *A. teichomyceticus*. Особливий інтерес представляв пошук позитивних регуляторів біосинтезу тейкопланіну, які можна застосувати для створення штамів-надпродуцентів. Було здійснено пошук у геномі *A. teichomyceticus* найважливіших ортологів стрептоміцетних глобальних регуляторів. Функції деяких із них досліджено за допомогою різних підходів: гетерологічної експресії в модельному

об'єкті генетики актинобактерій – *S. coelicolor*; надекспресії в *A. teichomyceticus*; транскрипційного аналізу тощо.

3.6.1. Пошук генів, що кодують компоненти Bld- та Whi-каскадів у геномі *A. teichomyceticus*

3.6.1.1. Біоінформатична реконструкція мережі глобальних регуляторів у *A. teichomyceticus*. Маючи в розпорядженні чернетки генома *A. teichomyceticus*, ми вирішили реконструювати глобальну регуляторну мережу морфогенезу та вторинного метаболізму цього організму. Для цього було відібрано основні глобальні регулятори та їх структурні гени-мішені, функції яких докладно описано в стрептоміцетів [93]. Амінокислотні послідовності цих білків з *S. coelicolor* використано як зразки для BLAST-пошуку ортологів, кодованих в геномі *A. teichomyceticus*. Ортологію знайдених найподібніших гомологів перевірено за допомогою реципрокного BLAST-пошуку. Виявилося, що далеко не всі білки, описані як глобальні регулятори в стрептоміцетів, мають своїх ортологів в *A. teichomyceticus*. Зокрема, серед компонентів Bld-каскаду в *A. teichomyceticus* знайдено ортологів для негативного транскрипційного регулятора BldD, рибонуклеази AbsB, сігма-фактора BldN, ферментів біосинтезу гідрофобіну SapB (табл. 3.2). Ортолог транскрипційного регулятора BldM не знайдено, як не знайдено і структурних генів, що кодують біосинтез чаплінів та родлінів (Chr, Rhd). Реципрокний BLAST-пошук ортологів AdpA давав, скоріше, невизначені результати. Тому, пошук елементів AdpA-опосередкованої регуляції було здійснено окремо та описано в наступних частинах роботи.

Каскад Whi *A. teichomyceticus* також відрізнявся від стрептоміцетного. Хоча ортологи сігма-фактора WhiG та транскрипційних регуляторів WhiA та WhiB наявні у *A. teichomyceticus*, ортологів WhiH та WhiI не виявлено. Спряжені із Whi-каскадом регуляторні елементи σ^H та SsgB також мали своїх ортологів у *A. teichomyceticus*.

Отже, всі регулятори, що найвище стоять в регуляторній ієрархії (див. підрозділ 1.4 огляду літератури), такі як AbsB, BldD, WhiG мають своїх ортологів

в *A. teichomyceticus* (табл. 3.2). Надалі ми вирішили зосередитися на експериментальних дослідженнях ролі AbsB_{AT}, BldD_{AT}, WhiG_{AT} в контролі морфогенезу та біосинтезу тейкопланіну у *A. teichomyceticus*.

Таблиця 3.2

Ортологи основних задіяних в морфологічній диференціації стрептоміцетів білків, знайдені в *A. teichomyceticus*

	Суб'єкт	Запит (<i>A. teichomyceticus</i>)	Ідентичність, %	Е-значення
Транскрипційні регулятори	BldD (SCO1489)	BldD _{AT}	68,4	1,18e-52
	RamR (SCO6685)	RamR _{AT}	64,8	6,99e-80
	WhiA (SCO1950)	WhiA _{AT}	74	1,22e-115
	WhiB (SCO3034)	WhiB _{AT}	76,1	6,72e-27
	WhiH (SCO5819)	-		
	WhiI (SCO6029)	-		
	SsgR (SCO3925)	-		
	BldM (SCO4768)	-		
	BldN (SCO3323)	BldN _{AT}	67,7	3,47e-73
σ-фактори	WhiG (SCO5621)	WhiG _{AT}	37,6	4,07e-34
	SigH (SCO5243)	SigH _{AT}	55,1	3,66e-71
	RamCSAB (SCO6681-4)	+		
гідрофобіни	Chp-genes	-		
	Rhd-genes	-		
Інші	AbsB (SCO5572)	AbsB _{AT}	64,8	6,99e-80
	SsgA (SCO3926)	-		
	SsgB (SCO1541)	SsgB _{AT}	51,1	2,29e-31

3.6.1.2. Пошук *in silico* елементів AdpA-опосередкованої регуляції в *A. teichomyceticus*. Одним з ключових позитивних регуляторів як морфогенезу, так і вторинного метаболізму в стрептоміцетів є транскрипційний регулятор AraC/XylS-типу AdpA [16]. Цей глобальний регулятор із величезним регулоном є привабливим об'єктом генно-інженерних маніпуляцій з метою створення штамів-надпродуцентів антибіотиків [89, 148]. До початку нашої роботи не було жодних даних, котрі б підтверджували чи спростовували наявність аналогічних регуляторних механізмів у інших актинобактерій. Ми поставили за мету дослідити, чи присутня AdpA-опосередкована регуляція в об'єкті наших досліджень – *A. teichomyceticus*.

Пошук ТТА-вмісного ортолога AdpA у *A. teichomyceticus*. Пошук ортолога AdpA в *A. teichomyceticus* поставив нас перед певними труднощами: звичайний BLAST, в якому ми як зразок для пошуку використовували послідовності класичних AdpA з *S. griseus* та *S. coelicolor*, видавав нам ряд дуже подібних гомологів (хітів) з *A. teichomyceticus*. Три з них названі AdpA_{AT80} (Sc80), AdpA_{AT3} (Sc3) та AdpA_{AT19} (Sc19) мали найбільший відсоток ідентичності (Табл. 3.3). Тут варто роз'яснити назви, які отримали гомологи AdpA з *A. teichomyceticus*. Гомолог, знайдений в певному контігу генома *A. teichomyceticus*, отримував назву за його номером (Scaffold №80 – Sc80 і т.д.). У фінальній збірці генома *A. teichomyceticus* досліджені в роботі гени *adpA*_{AT80}, *adpA*_{AT3} та *adpA*_{AT19} мають номери *ATEI_1117*, *ATEI_0967* та *ATEI_5999* відповідно. Першим хітом (а отже найбільш подібним) із них був AdpA_{AT80}, що давало деякі підстави стверджувати про його ортологію до AdpA з *S. griseus* та *S. coelicolor*.

Таблиця 3.3

Результати прямого пошуку гомологів AdpAgr в *A. teichomyceticus*

Суб'єкт	Запит (<i>A. teichomyceticus</i>)	Ідентичність, %	Е-значення
AdpAgr	Sc80	48.9	1.19e-89
	Sc3	49.7	5.05e-79
	Sc19	43.2	1.78e-77

Однак, при використанні послідовностей AdpA із інших стрептоміцетів, першими хітами (а, отже, і ймовірними ортологами AdpA) ставали також і AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19}. Далі було здійснено реципроний BLAST-пошук із використанням послідовностей AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19} в *S. griseus*. Виявилося, що в жодному випадку AdpA не був першим хітом (Табл. 3.4). Отже, реципроний BLAST, що є класичним підходом для виявлення ортології між двома амінокислотними послідовностями, не підтверджував ортології AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19} з AdpA в *S. griseus* та й *S. coelicolor* також (дані не показано).

Таблиця 3.4

Результати перевірки ортології AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19} з AdpA в *S. griseus*

Суб'єкт	Хіт, №	Запит (<i>S. griseus</i>)	Ідентичність, %	Е-значення
Sc80	1.	(?)AraC-подібний регулятор	55	3e-97
	2.	AdpA	49	2e-93
Sc3	1.	(?)AraC- подібний регулятор	57	1e-111
	6.	AdpA	50	2e-81
Sc19	1.	(?)AraC- подібний регулятор	56	6e-118
	4.	AdpA	45	2e-80

Далі ми спробували застосувати ще один підхід для пошуку ортолога AdpA в *A. teichomyceticus*. Для цього було відібрано групу AraC/XylS-регуляторів *S. coelicolor*, найподібніших до AdpA (із AdpA включно). Потім ми знайшли їх ортологів, що кодовані у вибірці стрептоміцетних геномів, зокрема, геномів *S. avermitilis*, *S. venezuelae*, *S. scabiei*, *S. griseus*, *S. lividans* та *S. clavuligerus* за допомогою реципронного BLAST, а також за допомогою пошуку ортологів в StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). У результаті сформовано низку груп ортологів (табл. 3.5), що включали групу ортологів AdpA, присутніх у всіх стрептоміцетних геномах, та групи ортологів інших AraC/XylS-регуляторів із невідомими функціями, які не конче присутні у всіх стрептоміцетних геномах.

Коли ми додали до цих груп ортології AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19}, то виявилося, що їх послідовності є насправді ортологами певних AraC/XylS-регуляторів, що кодовані в геномах стрептоміцетів, але аж ніяк не ортологами AdpA.

Більше того, у генах, що кодують AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpA_{AT19} в *A. teichomyceticus*, не виявилося ТТА-кодонів. Не було знайдено ТТА-кодонів і в генах інших AraC/XylS-регуляторів *A. teichomyceticus*, менш подібних на AdpA. Отже, ми не виявили ТТА-вмісного ортолога *adpA* у *A. teichomyceticus*.

Таблиця 3.5

Групи ортології AraC-подібних регуляторів в стрептоміцетів та *A. teichomyceticus*

<i>S. coelicolor</i>	<i>S. avermitilis</i>	<i>S. venezuelae</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>S. griseus</i>	<i>S. lividans</i>	<i>S. clavuligerus</i>	<i>A. teichomyceticus</i>
2792(AdpA)	5621	2580	57831	4742	3139	1957	-
5224	-	-	30291	2301	5513	-	Sc19
3804	-	-	-	-	4054	-	-
4413	3832	4240	-	3046	4651	3341	Sc3
3335	-	3196	-		3678	-	-
5416	7454	-	16001		5685	-	-
-	-	0861	-	6938	-	-	Sc80

Пошук генів, пов'язаних із авторегуляторами γ -бутиролактонної природи в *A. teichomyceticus*. Принаймні у двох випадках, експресія *adpA* є залежною від наявності авторегуляторних сполук γ -бутиролактонної природи – 2-ізокапрілоіл-3R-гидроксиметил- γ -бутиролактона (А-фактора) у *S. griseus* [55] та SCB1 ((2R,3R,1'R)-2-(1'-гидрокси-6-метилгептил)-3-гидроксиметилбутанолід) у *S. coelicolor* [82,133]). Дані деяких авторів [20] вказують на те, що *A. teichomyceticus* ймовірно здатний до синтезу чи навіть до розпізнавання SCB1 та (3S,4R)-3-(1-гидроксигексил)-4-(гидроксиметил)оксолан-2-ону (вірджиніє-

бутанолід). Однак, дані щодо А-фактора відсутні. Проаналізувавши геном *A. teichomyceticus* ми виявили, що ортологи генів, які кодують ключовий фермент біосинтезу А-фактора – AfsA, а також рецептор, що розпізнає А-фактор – AgrA – справді відсутні. Проте, не виявилося також ортологів генів, що кодують біосинтетичні ферменти і рецептори інших авторегуляторів, а саме: ScbA/ScbR1-2 (SCB1 з *S. coelicolor*) та BarA/BarX (вірджиніє-бутанолід з *S. virginiae*). Отже, із отриманих даних можна зробити висновок, що *A. teichomyceticus* скоріше за все не володіє генетичним потенціалом для біосинтезу цих, подібних до стрептоміцетних, авторегуляторних сполук. Ці дані біоінформатичного аналізу розходять із даними, отриманими в попередніх експериментах *in vivo* [20], а отже можна припускати, що біосинтез певних авторегуляторів таки відбувається в *A. teichomyceticus*. Однак, якщо вони таки синтезуються *A. teichomyceticus*, це повинно відбуватися із використанням цілком інших біосинтетичних механізмів аніж у стрептоміцетів, а це є малоімовірним.

Сайти зв'язування AdpA в промоторно-операторній ділянці гена UUA-тРНК *A. teichomyceticus*. У геномі *A. teichomyceticus* присутній лише один ген-гомолог *bldA* стрептоміцетів, що кодує лейцинову тРНК, здатну розпізнавати кодон UUA. Відомо [49], що експресія *bldA* у *S. coelicolor* та *S. griseus* позитивно регулюється AdpA. Імовірні сайти зв'язування AdpA виявлено в промоторно-операторних ділянках *bldA* *S. coelicolor* та *bldAgr* *S. griseus*. Ми вирішили перевірити, чи наявні такі сайти в промоторно-операторній ділянці гена UUA-тРНК *A. teichomyceticus*. Для цього ми побудували вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів UUA-тРНК *A. teichomyceticus* та *S. griseus* разом з їх промоторно-операторними ділянками (рис.3.33). Із отриманого попарного вирівнювання стало очевидним, що в промоторно-операторній ділянці гена UUA-тРНК *A. teichomyceticus* не прослідковуються сайти зв'язування AdpA, консервативні для промоторно-операторних ділянок *bldA*-генів стрептоміцетів [49].

Положення ТТА-кодонів відносно старт-кодонів відкритих рамок зчитування в геномі *A. teichomyceticus*. Важливою особливістю організації

геномів організмів, що мають AdpA-опосередковану регуляцію, є відносно внутрішньогенне розташування ТТА-кодонів у генах, що їх містять. Можна висунути припущення, що біологічно доцільним є розміщення ТТА-кодона на початку гена. Так як кодон ТТА фактично виступає посттранскрипційним регуляторним елементом, і у випадку відсутності відповідної тРНК не дозволяє прочитувати іРНК, для клітини енергетично більш вигідним є термінація трансляції на її ранніх етапах. Подібна тенденція чітко прослідковується в геномах стрептоміцетів, для яких є характерною AdpA-опосередкована регуляція [36].

Ми проаналізували особливості вживання рідкісного ТТА-кодону у геномах *S. coelicolor* та *A. teichomyceticus* порівняно з іншими, більш поширеними, лейциновими кодонами за допомогою web-сервера ТТА-Lynx [171].

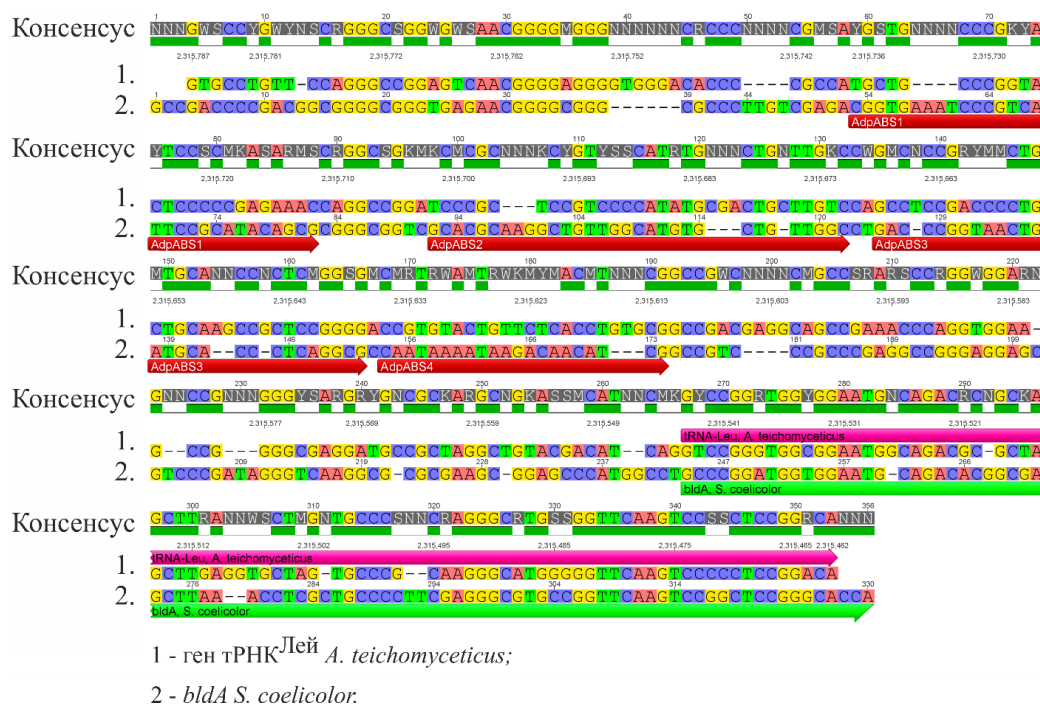


Рис.3.33 Попарне вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів, що кодують лейцинові тРНК-гомологи BldA у *A. teichomyceticus* та *S. coelicolor* (разом із промоторно-операторними ділянками). Стрілками червоного кольору позначено AdpABS1-4 показують послідовності, що зв'язуються білком AdpA у стрептоміцетів; помітно, що ці ділянки мають вкрай низьку гомологію із послідовністю з *A. teichomyceticus*.

Із отриманих графіків залежності кумулятивної частоти вживання кодонів від їх відносного внутрішньогенного положення добре видно, що у геномі *S. coelicolor* ТТА-кодон частіше розміщений на початку генів (як і очікувалося, рис.3.34). Інші рідкісні кодони, такі як TTG, СТА, СТТ, СТС, СТG у *S. coelicolor* зустрічалися рівномірно по всій довжині відкритих рамок зчитування.

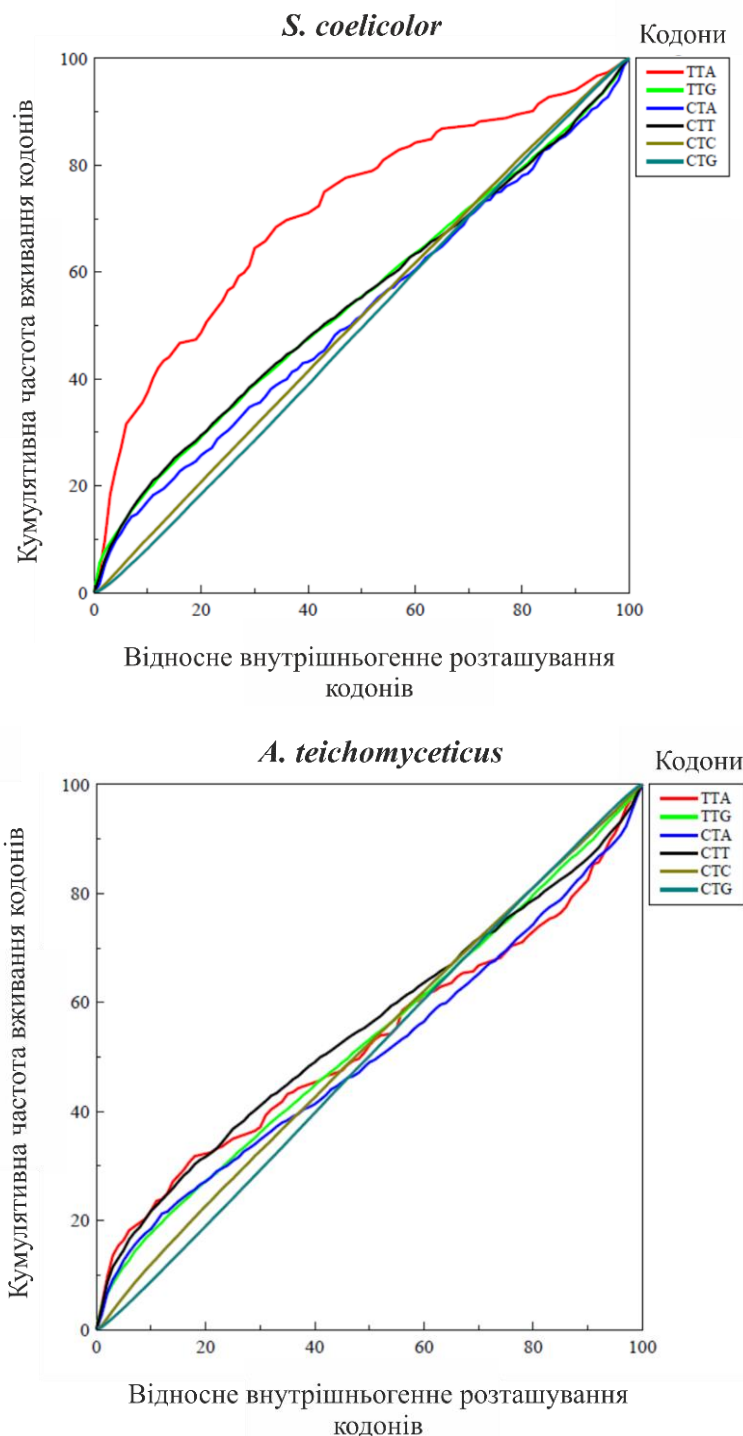


Рис.3.34 Залежність частоти вживання ТТА-кодону а також інших, менш рідкісних, лейцинових кодонів від їх внутрішньогенного розташування в геномах *S. coelicolor* та *A. teichomyceticus*.

На противагу цьому, така тенденція не характерна для генома *A. teichomyceticus*, де ТТА-кодон розміщений рівномірно по всій довжині відкритих рамок зчитування (рис.3.34).

3.6.2. Дослідження AdpA-опосередкованої регуляції в *A. teichomyceticus* *in vitro* та *in vivo*

3.6.2.1. ДНК-зв'язувальні властивості AdpA-гомологів *A. teichomyceticus*.

Як вже зазначалося, відомою є послідовність ДНК, із якою зв'язується AdpA. Класичний сайт зв'язування регулятора AdpA у *S. griseus* розміщений у промоторно-операторній ділянці гена, що кодує шлях-специфічний регулятор біосинтезу стрептоміцину StrR [110]. Ми вирішили дослідити, чи здатні AdpA_{AT19}, AdpA_{AT80} та AdpA_{AT3} взаємодіяти *in vitro* з промоторно-операторною ділянкою гена *strR*. Як позитивний контроль використано AdpA із *S. griseus* (AdpAgr).

Для цього здійснено гетерологічну надекспресію білків AdpA_{AT19}, AdpA_{AT80}, AdpA_{AT3} та AdpAgr в клітинах *E. coli*. Нуклеотидні послідовності відповідних генів ампліфіковано з хромосомної ДНК *A. teichomyceticus* за допомогою відповідних пар праймерів (Sc19expF/R, Sc3expF/R, Sc80expF/R, AdpAGRF/R). Усі амплікони клоновано у XhoI- та NdeI-сайти векторної плазмиди для білкової експресії pET24b(+) так, щоб послідовності генів опинилися під контролем T7 IPTG-індуцибельного промотора, та мали HIS-tag на N-кінці (рис.3.35).

Після застосування різних штамів-господарів *E. coli* та різних умов експресії отримати білки з *A. teichomyceticus* не вдалося, хоча AdpAgr експресувався за усіх використаних умов, зокрема й тих, що описані в літературі [89] (рис.3.36). Слід зазначити, що в літературі є дані, які свідчать про те, що регуляторні білки AraC/XylS-родини надзвичайно проблемні для гетерологічної експресії в *E. coli* [115].

Одним із підходів, що може гарантувати експресію проблемних білків є злиття послідовностей їх генів з генами, що легко експресуються в *E. coli*. Зокрема, це може бути злиття з геном *malE*, який кодує мальтозо-зв'язувальний білок *E. coli* [130]. Тому ми вирішили використати плазмиду pTST101 [130], на основі якої було

сконструйовано низку векторів, в яких з послідовністю гена *malE* злито послідовності, що кодують N-термінальні ділянки AdpAgr, AdpA_{AT19}, AdpA_{AT80} та AdpA_{AT3}. У свою чергу, ці N-термінальні ділянки містять ДНК-зв'язувальні домени.

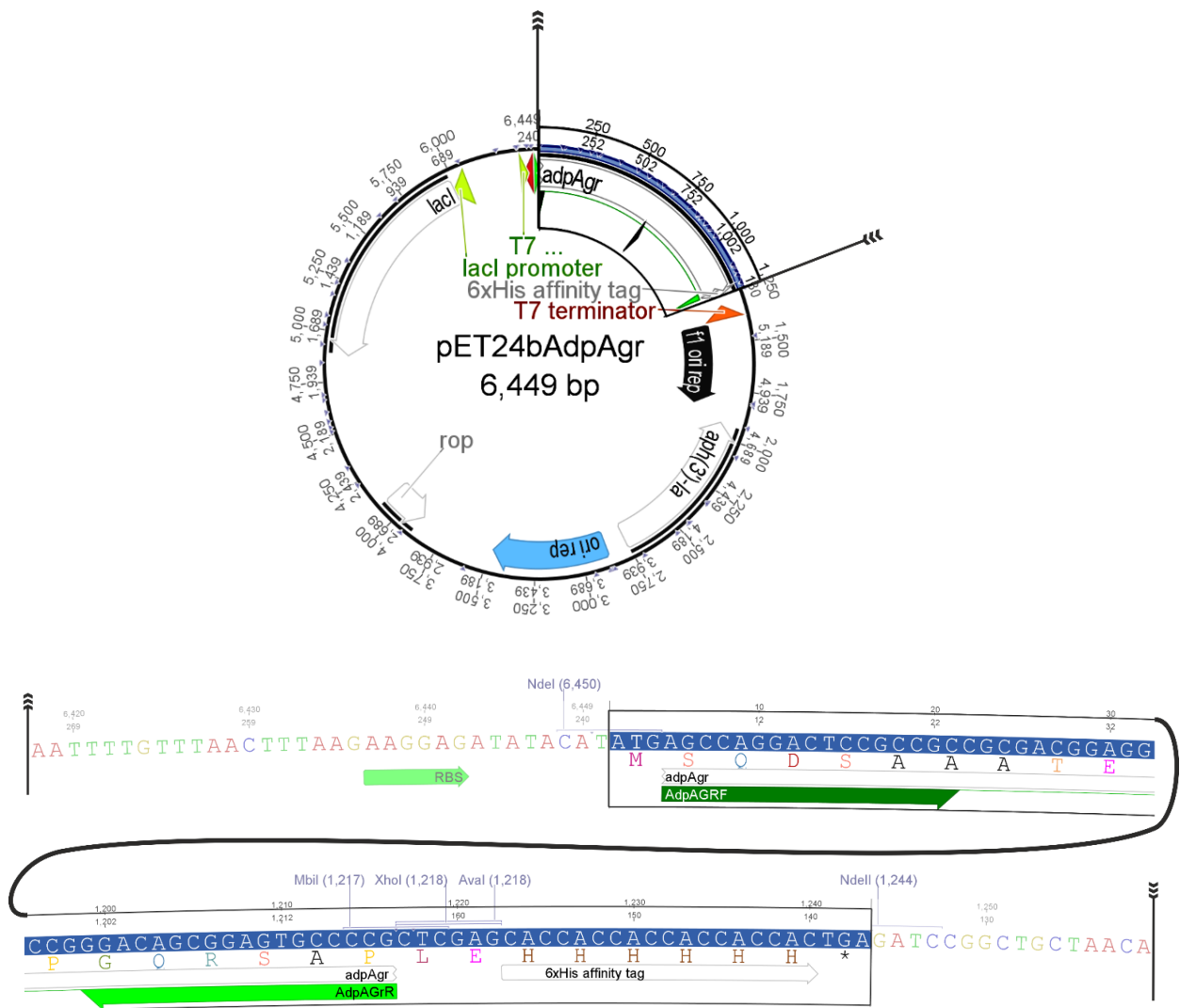


Рис.3.35 Будова рекомбінантної плазмиди pET24bAdpAGR, що використана для гетерологічної експресії білка AdpAgr, де: T7... - промотор гена РНК-полімерази фага T7; T7 terminator – термінатор гена РНК-полімерази фага T7; 6xHis affinity tag – послідовність, що кодує HIS-tag; f1 ori rep – точка початку реплікації фага F1; *aph(3')-Ia* – ген аміноглікозид-фосфотрансферази, що забезпечує стійкість до канаміцину; *ori rep* – точка початку реплікації плазмиди pBR322; *rop* – ген, що кодує Rop-білок; *lacI/lacI* promoter – ген репресора *lac*-оперону та його промотор; *adpAgr* – ген AdpAgr; RBS – сайт зв'язування рибосоми; AdpAgrF/R – пара примерів для ампліфікації послідовності гена *adpAgr*. Для клонування кодуючих послідовностей *adpA*_{AT19}, *adpA*_{AT80}, *adpA*_{AT3} використано аналогічну стратегію.

Для цього ділянки, що кодують ДНК-зв'язувальні домени відповідних білків ампліфіковано із використанням пар праймерів malExSC19DBD_EXP_F/R, malExSC80DBD_EXP_F/R, malExSC3DBD_EXP_F/R та malExAdpADBBD_EXP_F/R. Амплікони клоновано по BamHI- та HindIII-сайтам у вектор pTST101 як показано на рис.3.37.

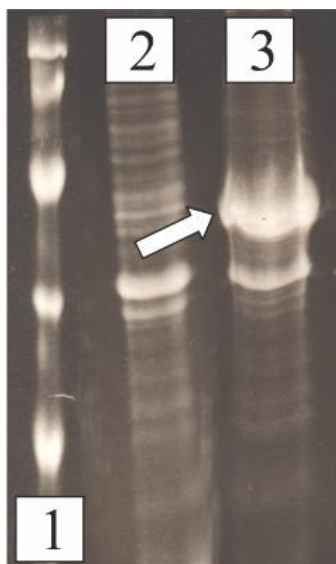


Рис. 3.36 Електрофореграма, що показує експресію білка AdpAgr-6His в *E. coli*. 1 – маркер молекулярної ваги Pierce™ Prestained Protein MW Marker 20-120 кДа (ThermoFisher Scientific); 2 – сумарний білок неіндукованої *E. coli* Rosetta 2 pET24bAdpAGR, 3 – сумарний білок індукованої *E. coli* Rosetta 2 pET24bAdpAGR, помітно появу смуги розміром 44 кДа, що відповідає білку AdpAgr-6His (показано стрілкою).

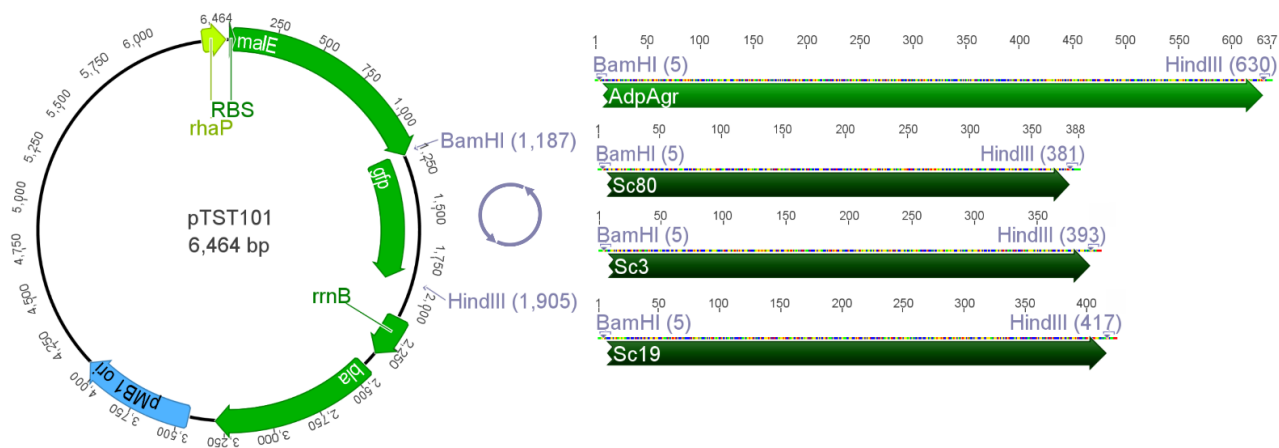


Рис.3.37 Будова плазмиди pTST101 та схема заміщення послідовності, що кодує GFP на послідовності, що кодують ДНК-зв'язувальні домени AdpAgr, AdpAAT19, AdpAAT80 та AdpAAT3. Умовні позначення: rhaP – рамнозо-індуцибельний промотор; RBS – сайт зв'язування рибосоми; malE – ген мальтозо-зв'язувального білка; gfp – послідовність, що кодує GFP; rrnB – термінатор гена 16S РНК *E.coli*; bla – ген стійкості до ампіциліну; pMB1 ori – точка початку реплікації плазмиди pMB1.

Отримані плазміди трансформовано в *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Ген *malE* у векторі pTST101 міститься під контролем рамнозо-індуцибельного промотора, тому експресія рекомбінантних білків індукувалася за допомогою додавання до культуральної рідини L-рамнози. Для індукції ми використовували L-рамнозу в концентрації 0,2 М та додавали її у момент, коли культура досягала значення оптичної густини 0,6, як було описано Stumpp та співавторами [130]. Індуковану культуру інкубували 4-6 годин. Появу фракцій рекомбінантних білків в сумарному протеїні спостерігали за допомогою вертикального електрофорезу в ДСН-ПААГ. За зазначених умов вдалося отримати експресію рекомбінантних білків MalE-Sc19(207-333 aa), MalE-AdpAgr(246-405 aa), MalE-Sc3(200-327 aa), MalE-Sc80(199-324 aa). Відповідні фракції були зв'язані на амілозних смолах (NEB) та елюйовані з них розчином мальтози відповідно до рекомендацій виробника. У результаті вдалося отримати досить чисті фракції рекомбінантних білків (рис.3.38).

Далі досліджено ДНК-зв'язувальні властивості отриманих рекомбінантних білків за допомогою EMSA (аналізу зміни електрофоретичної рухливості). Як субстрат використовували промоторно-операторні ділянки гена *strR*, власні промоторні ділянки генів *adpA_{AT19}*, *adpA_{AT80}* та *adpA_{AT3}*; як негативний контроль використовували промоторно-операторну ділянку гена *bldD*. Усі ці фрагменти ДНК ампліфіковано з використанням Су5-мічених праймерів, що дало змогу виявити їх за допомогою візуалізатора Typhoon 9400 (GE Healthcare Life Sciences). Загальна процедура експериментів аналізу зміни електрофоретичної рухливості описана в пункті 2.3.15 матеріалів та методів, послідовності праймерів перелічено в додатку Б, таблиця Б.3.

Виявилося, що рекомбінантний білок, який містить ДНК-зв'язувальний домен AdpAgr (MalE-dbdAdpA) здатний специфічно взаємодіяти з промоторною ділянкою *strR* (як і очікувалося). На противагу цьому, рекомбінантні білки MalE-Sc19 (207-333 ак.), MalE-Sc3 (200-327 ак.) та MalE-Sc80 (199-324 ак.) не зв'язували промоторну ділянку *strR in vitro* (рис.3.39). Не помічено зв'язування рекомбінантними білками і власних промоторно-операторних ділянок (дані не наведено).

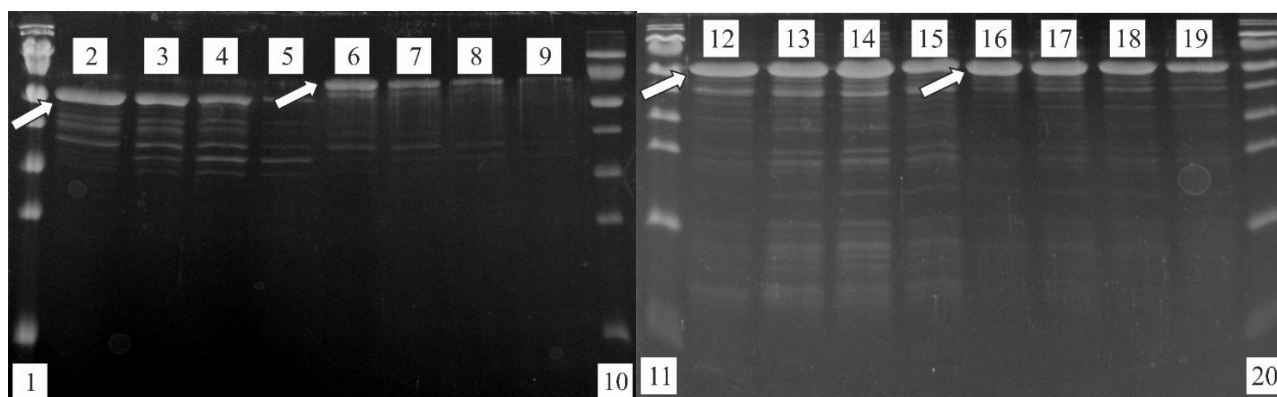


Рис.3.38 Електрофореграми елюатів рекомбінантних білків після першої-четвертої промивок: 2, 3, 4, 5) MalE-Sc19 (50 кДа); 6, 7, 8, 9) MalE-AdpAgr (60 кДа); 12, 13, 14, 15) MalE-Sc3 (50 кДа); 16, 17, 18, 19) MalE-Sc80 (50кДа); 1, 10, 11, 20) маркер молекулярної ваги PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 до 180 кДа. Стрілками показано фракції, що відповідають отриманим рекомбінантним білкам.

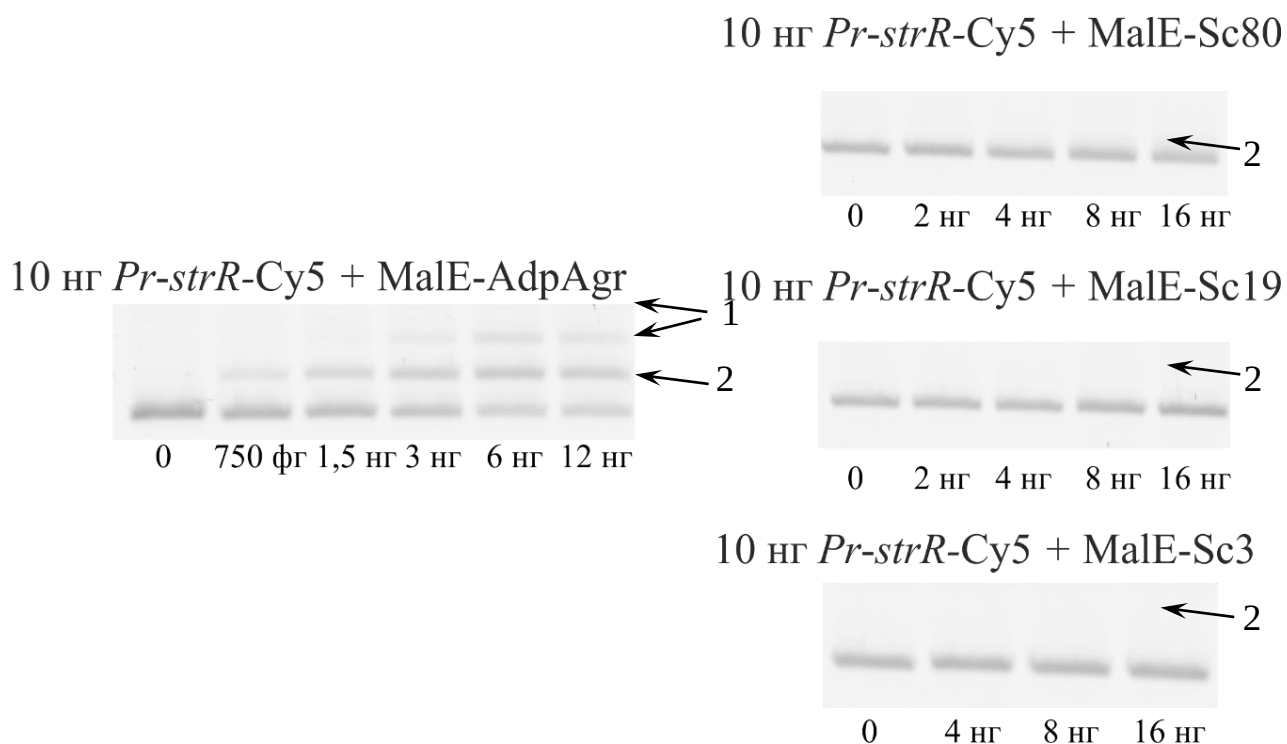


Рис.3.39 Результати аналізу зміни електрофоретичної рухливості промоторної ділянки *strR*-Cy5 (10 нг) за присутності елюатів, що містили рекомбінантні MalE-Sc19, MalE-AdpAgr, MalE-Sc3, MalE-Sc80. Зміна електрофоретичної рухливості, яка вказувала на утворення ДНК-білкових комплексів (1) спостерігалася лише при додаванні MalE-AdpAgr; в інших випадках фрагменти ДНК не були зв'язаними (2).

Отже, можна висунути припущення, що ДНК-зв'язувальні властивості AdpA-гомологів *A. teichomyceticus* відрізняються від таких властивостей AdpA. Однак, ці дані все ж не дають однозначної відповіді про ДНК-зв'язувальні властивості AdpA_{AT19}, AdpA_{AT80} та AdpA_{AT3}, оскільки неспроможність зв'язувати власні промоторні ділянки може бути також наслідком неправильного фолдингу рекомбінантних білків, хоча рекомбінантний MalE-AdpAgr таки володів передбаченою активністю.

3.6.2.2. Гетерологічна експресія *adpA*-гомологів *A. teichomyceticus* в клітинах стрептоміцетів. Для того, щоб з'ясувати, чи AdpA_{AT19}, AdpA_{AT80} та AdpA_{AT3} подібні за своїми функціями до AdpAgr, ми вирішили експресувати відповідні гени у модельних штаммах роду *Streptomyces*, таких як *S. coelicolor* та *S. griseus*. Відомо, що надекспресія в них генів *adpA* часто має позитивний вплив на морфогенез та синтез антибіотиків [89, 148]. Ми також спробували комплементувати генами *adpA*_{AT19}, *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3} Bld-фенотип *S. griseus* $\Delta adpA$ [100].

Гетерологічна експресія *adpA*_{AT19} в *S. coelicolor* M145. Для надекспресії гена *adpA*_{AT19} сконструйовано плазмиду рKC1139adpAAT19. Для цього за допомогою ПЛР з використанням полімерази Pfu з хромосомної ДНК *A. teichomyceticus* ампліфіковано фрагмент ДНК розміром 1,4 т.п.н., що містив досліджуваний ген та його промоторно-операторну ділянку. Для ПЛР використано пару праймерів Sc19_for/rev. Елюйований амплікон клоновано у EcoRV-сайт вектора рKC1139. Отриману плазмиду рKC1139Sc19 (рис.3.40) уведено в *S. coelicolor* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli*.

Спочатку ми дослідили особливості морфології штамів *S. coelicolor* рKC1139Sc19⁺. Виявилося, що гетерологічна експресія гена *adpA*_{AT19} сильно впливає на споруляцію *S. coelicolor* на повноцінних агаризованих середовищах. На середовищах R5 та MYM штами *S. coelicolor* рKC1139Sc19⁺ мають пришвидшену споруляцію: вже наприкінці другої доби росту весь газон «вибухоподібно» утворює повітряний міцелій. У той же час штам дикого типу

на цих середовищах починає спорулювати далеко не так інтенсивно лише на четверту-п'яту добу росту (рис.3.41).

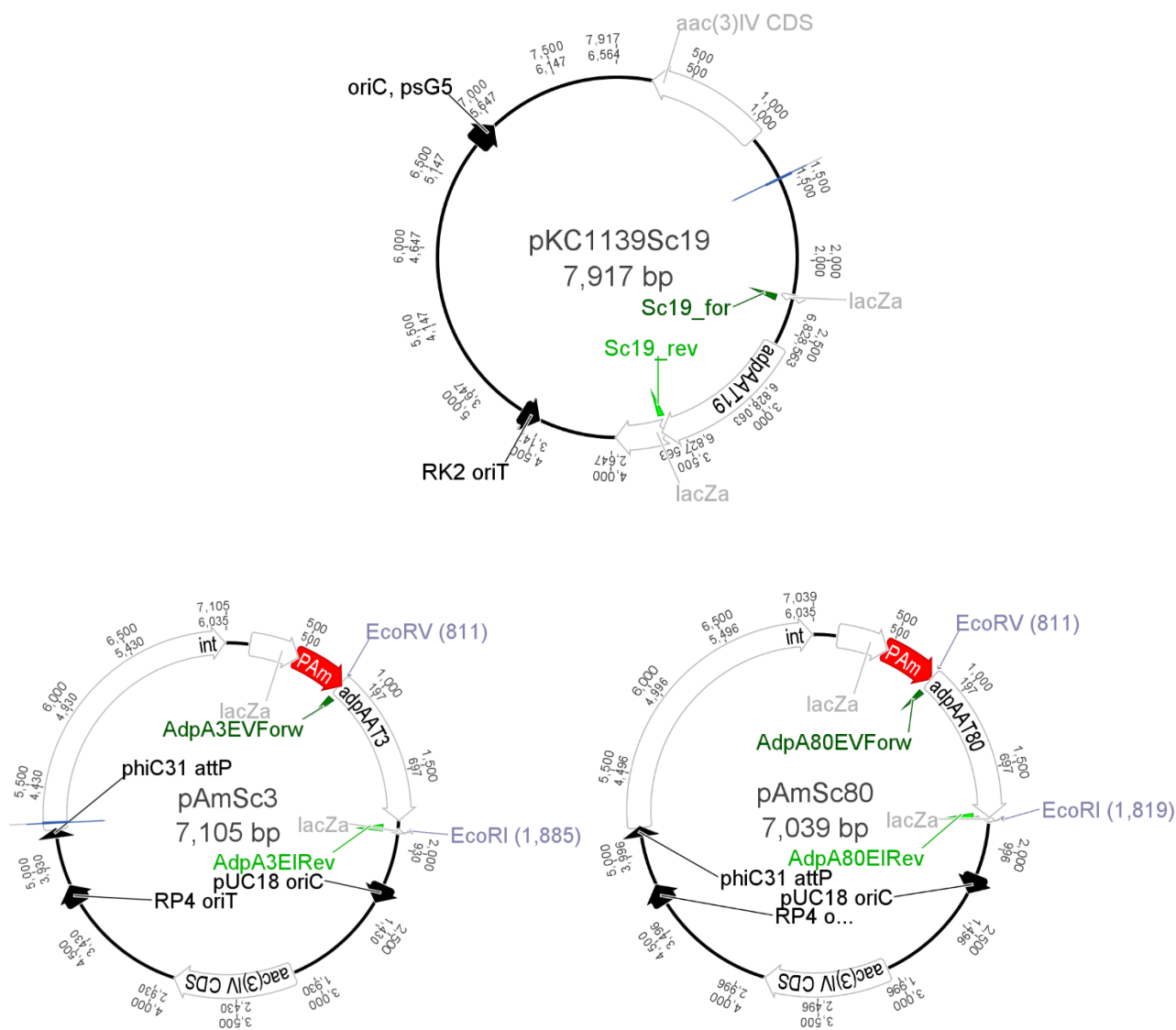


Рис.3.40 Будова рекомбінантних плазмід pKC1139Sc19, pAmSc3, pAmSc80. Умовні позначення див. на рис. 3.1, 3.12.

Дослідження мікроморфології поверхні газонів за допомогою сканувальної електронної мікроскопії показало, що на другу добу поверхня газонів у *S. coelicolor* pKC1139Sc19⁺ повністю вкрита розвиненим повітряним міцелієм, що починає спіралізовуватися, натомість на поверхні газону штаму дикого типу виникають лише поодинокі гіфи повітряного міцелію. На четверту добу культивування можна спостерігати повністю диференційовані гіфи повітряного міцелію у *S. coelicolor* pKC1139Sc19 із сформованими ланцюжками спор, тоді як

штам дикого типу має добре розвинені гіфи повітряного міцелію, проте формування спор лише розпочинається (рис.3.41).

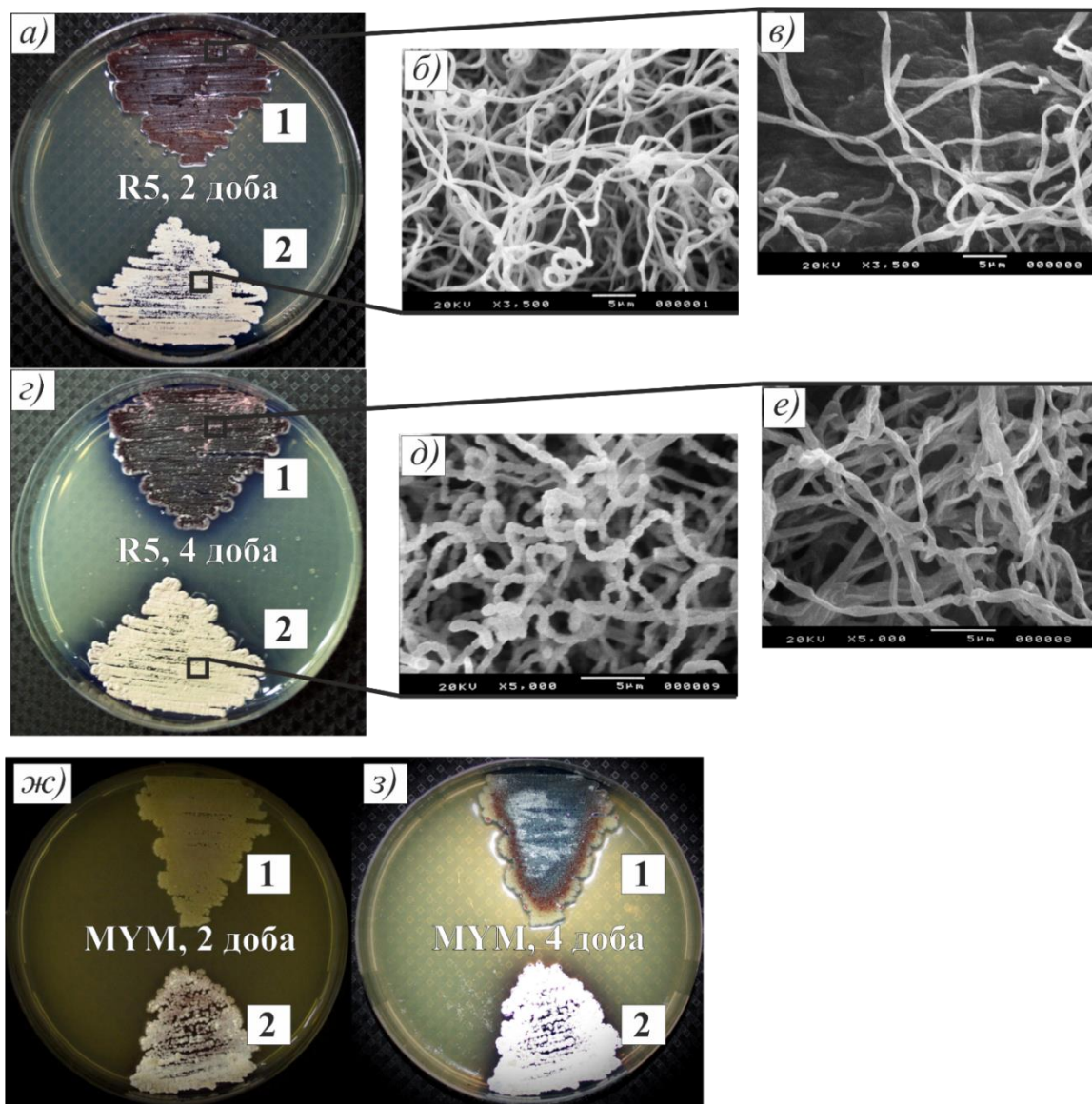


Рис.3.41 Відмінності в морфогенезі між *S. coelicolor* M145 (1) та *S. coelicolor* pKC1139Sc19 (2) за умов вирощування на середовищах R5 (а, з) та MYM (ж, з). Зображення, отримані за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (б, в, д, е), показують мікроморфологію газонів на відповідних стадіях росту.

Штами *S. coelicolor* pKC1139Sc19 також продукували помітно більше актинородину на агаризованих середовищах. У рідкому середовищі YMPG штами із надекспресією гена *adrA*_{AT19} продукували актинородин в кількості $0,403 \pm 0,06$ мМоль/мг сухої біомаси, що в десять разів перевищує значення, отримане для штаму дикого типу ($0,041 \pm 0,023$ мМоль/мг сухої біомаси).

Гетерологічна експресія *adpA*_{AT80}, *adpA*_{AT3} в *S. coelicolor* M145. Очікуючи результати, подібні до отриманих для *adpA*_{AT19}, ми надекспресували в *S. coelicolor* M145 також і гени *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3}. У цьому випадку для надекспресії використано інтегративний вектор pSETPAm, особливості якого описані у підрозділі 3.1. Фрагменти ДНК, що містили послідовності генів *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3} ампліфіковано з хромосомної ДНК *A. teichomyceticus* за допомогою пар праймерів AdpA3EVForw/EIRev та AdpA80EVForw/EIRev. Елюйовані амплікони розщеплювали у EcoRV- та EcoRI-сайтах та клонували в pSETPAm за цими ж сайтами. Отримані плазмиди pSETPAmSc80 та pSETPAmSc3 перенесено в клітини *S. coelicolor* M145 за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli*, транскон'юганти відбиралися як стійкі до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл.

Надекспресія *adpA*_{AT80} і *adpA*_{AT3} не мала помітного впливу на морфологію отриманих штамів (рис.3.42). Лише для штаму, в якому надекспресовано *adpA*_{AT80}, виявлено відмінності в рівні продукції актинородину в рідкому середовищі YMPG. Він продукував удвічі більше актинородину, ніж штам дикого типу ($0,112 \pm 0,03$ мМоль/мг сухої біомаси).

Спроба комплементції *S. griseus* $\Delta adpA$ генами *adpA*_{AT19}, *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3}. Володіючи штамом *S. griseus* $\Delta adpA$, що має чіткий Bld-фенотип [101], ми вирішили здійснити спробу комплементції Bld-фенотипу за допомогою AdpA-подібних регуляторів з *A. teichomyceticus*.

Для цього ми перенесли рекомбінантні плазмиди pKC1139Sc19, pSETPAmSc80 та pSETPAmSc3 в клітини *S. griseus* DSM-40236 та $\Delta adpA$ і дослідили здатність отриманих похідних до формування спор та біосинтезу стрептоміцину. Виявилось, що експресія генів *adpA*_{AT19}, *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3} не

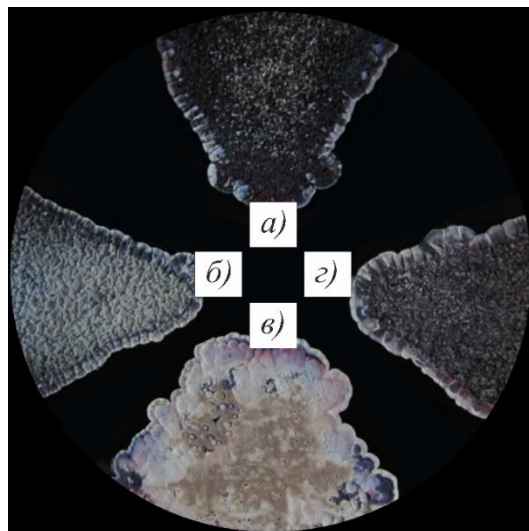


Рис.3.42 Пікт *S. coelicolor* M145 (а), *adpA*_{AT80}⁺ (б), pKC1139Sc19 (в) та *adpA*_{AT3}⁺ (г) на середовищі R5 (6 доба)

комплементує Bld-фенотип у *S. griseus* $\Delta adpA$. Не чинила вона і помітного впливу на морфологію дикого типу *S. griseus* DSM-40236 (рис.3.43).

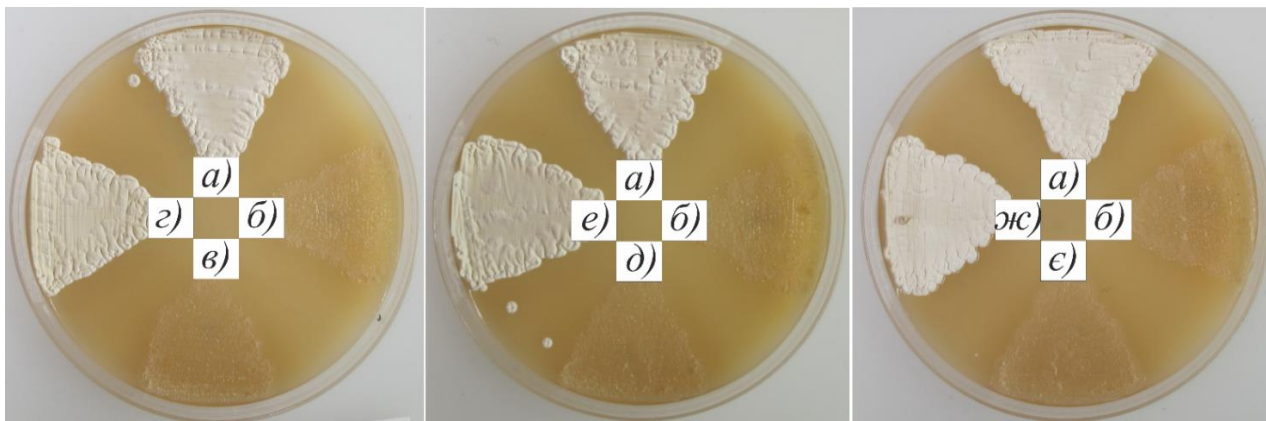


Рис. 3.43 Ріст штамів *S. griseus*: а) DSM-40236; б) $\Delta adpA$; в) $\Delta adpA adpA_{AT80}^{+}$; г) DSM-40236 $adpA_{AT80}^{+}$; д) $\Delta adpA adpA_{AT3}^{+}$; е) DSM-40236 $adpA_{AT3}^{+}$; є) $\Delta adpA$ pKC1139Sc19; ж) DSM-40236 pKC1139Sc19 на середовищі СМ на 5 добу культивування.

Отримані результати корелюють із попередніми даними, які показують, що AdpAAT19, AdpAAT80 та AdpAAT3 найімовірніше не здатні до взаємодії з AdpA-зв'язувальними сайтами, а отже не спроможні запускати транскрипцію генів-мішеней власного AdpA у *S. griseus* (наприклад *strR*).

3.6.2.3. Вплив надекспресії *adpA*-гомологів *A. teichomyceticus* на рівень синтезу тейкопланіну. Отже, гомологи AdpA при їх гетерологічній експресії в *S. coelicolor* давали цікаві ефекти, зокрема мали позитивний вплив на біосинтез актинородину. Для того, щоби з'ясувати, яку роль відіграють вони в штамі-господарі, ми вирішили надекспресувати всі відповідні гени в *A. teichomyceticus*. З цією метою використано рекомбінантні плазміди pKC1139Sc19, pSETPAmSc80 та pSETPAmSc3, отримані попередньо. Їх перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli*. Рекомбінантні штами *A. teichomyceticus adpA_{AT80}^{+} adpA_{AT3}^{+} та pKC1139Sc19⁺ було перевірено за допомогою ПЛР.*

Спочатку ми дослідили вплив надекспресій на морфологію отриманих штамів. Для цього використано два середовища, ISP2 та ISP3. Із даних пункту 3.5.1 відомо, що *A. teichomyceticus* формує розвинений вегетативний міцелій на ISP2, і активно утворює спорангії на ISP3. Виявилося, що рекомбінантні штами *A. teichomyceticus* $adpA_{AT80}^{+}$, $adpA_{AT3}^{+}$, $pKC1139Sc19^{+}$ не відрізняються за своєю морфологією від штаму дикого типу впродовж усього періоду вирощування на середовищах ISP2 та ISP3 (рис.3.44).

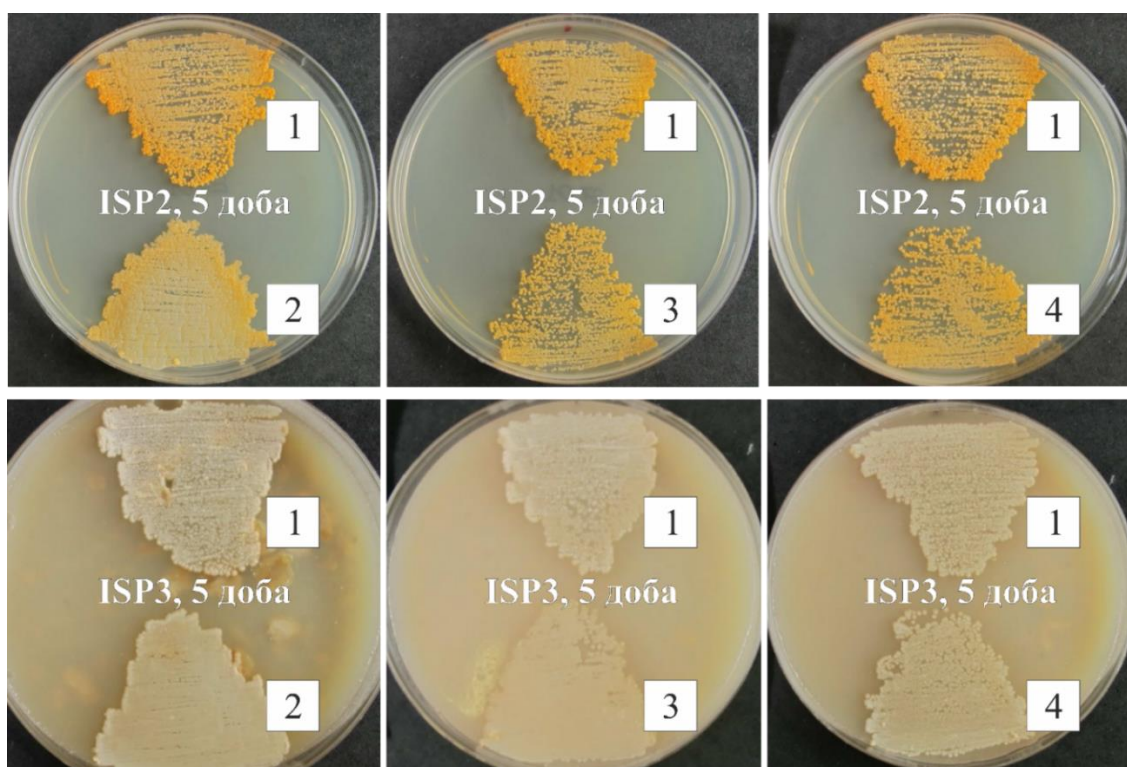


Рис.3.44 Ріст на середовищах ISP2 та ISP3 штамів *A. teichomyceticus* $pKC1139Sc19^{+}$ (2), $adpA_{AT80}^{+}$ (3), $adpA_{AT3}^{+}$ (4), та штаму дикого типу (1).

Хоча надекспресія генів, що кодують гомологи *AdpA* за використаних умов, не впливала на морфологію рекомбінантних штамів, ми все ж виявили її вплив на синтез тейкопланіну. При надекспресії генів $adpA_{AT80}$ та $adpA_{AT3}$ спостерігається значне збільшення рівня синтезу тейкопланіну рекомбінантними штамми. Штам $adpA_{AT80}^{+}$ синтезував в середньому в 6-7 разів більше тейкопланіну, ніж штам дикого типу (рис.3.45). У випадку $adpA_{AT3}$, позитивний вплив надекспресії був не таким значним, однак $adpA_{AT3}^{+}$ продукував в 4-5 разів більше тейкопланіну ніж дикий тип (рис.3.45). Не виявлено впливу надекспресії

гена *adpA*_{AT19} на синтез тейкопланіну. Отже, отримані дані свідчать про те, що гомологи AdpA очевидно не задіяні в глобальній регуляції морфогенезу у *A. teichomyceticus*, хоча їх надекспресія має позитивний вплив на біосинтез тейкопланіну.

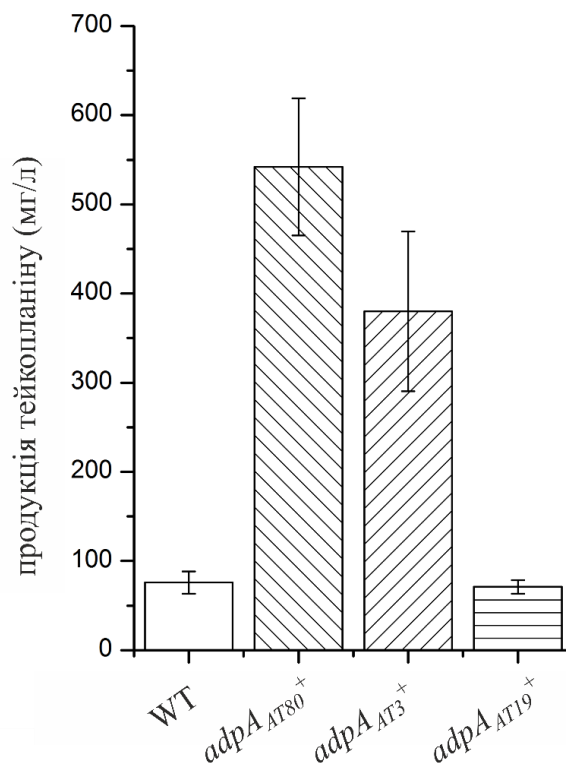


Рис.3.45 Порівняння рівнів синтезу тейкопланіну штамми, в яких було надекспресовано гомологи AdpA, і штамом *A. teichomyceticus* дикого типу.

Далі ми дослідили чи взагалі експресуються гени *adpA*_{AT19}, *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3} в спорулюючих газонах *A. teichomyceticus* порівняно із експресією *SCO2792* (*adpA*) в *S. coelicolor* за подібних умов культивування методом напівкількісної ПЛР із зворотною транскрипцією. Якщо продукти цих генів є ключовими для регуляції морфогенезу, можна очікувати їх посиленої експресії в спорулюючих газонах. Виявилось, що *SCO2792* експресується в спорулюючих чотириденних культурах *S. coelicolor*, що вирощувалися на середовищі СМ (рис.3.46, а). На противагу цьому, спостерігали лише слабку експресію *adpA*_{AT19} в спорулюючих чотириденних культурах *A. teichomyceticus*, вирощених на середовищі ISP3 (рис.3.46, з). Не спостерігали експресії генів *adpA*_{AT80} та *adpA*_{AT3} (рис.3.46, б, в). Загалом, малоймовірно, що гени, які не експресувалися в

спорулюючих культурах *A. teichomyceticus* були б ключовими для регуляції морфогенезу.

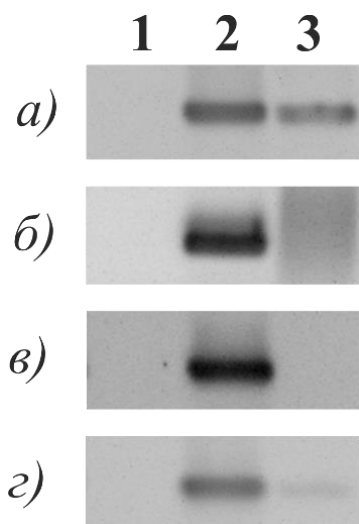


Рис.3.46 Результати РТ-ПЛР аналізу експресії генів а) *SCO2792* в чотириденних культурах *S. coelicolor* на SM; б) *adpA_{AT80}*, в) *adpA_{AT3}* г) *adpA_{AT19}* в чотириденних культурах *A. teichomyceticus* на ISP3. Ампліфікація відбувалась із відповідної кДНК за допомогою пар праймерів: *SCO2792_RT_F/R*, *Sc80_RT_F/R*, *Sc3_RT_F/R*, *Sc19_RT_F/R* (3). Негативним і позитивним контролем були ПЛР з сумарної РНК (1) та сумарної ДНК (2) відповідно.

Підсумовуючи результати цього пункту, необхідно відзначити, що гомологи *AdpA* в *A. teichomyceticus* володіють деякими властивостями позитивних глобальних регуляторів; зокрема надекспресія *adpA_{AT80}* та *adpA_{AT3}* призводить до збільшення рівня синтезу тейкопланіну. Однак, інші факти свідчать про те, що ці гомологи не володіють основними властивостями, описаними для *AdpA*-регуляторів стрептоміцетів: вони не здатні зв'язувати типовий операторний сайт *AdpA*, описаний для стрептоміцетів, не здатні комплементувати *S. griseus ΔadpA*, не експресуються в спорулюючих культурах *A. teichomyceticus*, а біоінформатичний аналіз вказує на відсутність інших важливих компонентів *AdpA*-опосередкованої системи регуляції в *A. teichomyceticus*.

3.6.3. Роль генів глобальних негативних регуляторів *bldD* та *absB* в регуляції морфогенезу та вторинного метаболізму *A. teichomyceticus*

3.6.3.1. Функції гена *bldD_{AT}* в *A. teichomyceticus*.

Влив надекспресії *bldD_{AT}* на морфологію *A. teichomyceticus*. У стрептоміцетів *BldD* відіграє роль глобального репресора ранніх етапів споруляції та біосинтезу антибіотиків. Він має свого ортолога у *A. teichomyceticus*

– BldD_{AT}. Амінокислотна послідовність BldD_{AT} на 68,4% ідентична до амінокислотної послідовності BldD *S. coelicolor*. Маючи за мету дослідити, чи функції BldD_{AT} у спорангієутворюючого актиноміцета *A. teichomyceticus* є подібними, ми вирішили спершу надекспресувати ген *bldD*_{AT} в *A. teichomyceticus*.

Для цього сконструювали рекомбінантну плазмиду на основі вектора pSETPAm (див. 3.1.1), в якому ген *bldD*_{AT} помістили під контроль сильного апраміцинового промотора *aac(3)IVp*. Ген *bldD*_{AT} ампліфіковано з хромосомної ДНК *A. teichomyceticus* за допомогою Pfu-полімерази із використанням пари праймерів BldDAcriFor/Rev. Амплікон клонували у вектор pSETPAm, використавши EcoRI- та EcoRV-сайти. Отриману плазмиду pAmbldDAT (рис.3.47) перенесено в клітини *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 pUZ8002. Транскон'юганти відібрано як стійкі до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл. Їх перевірено за допомогою ПЛР, ампліфікуючи ген стійкості до апраміцину (*aac(3)IV*), що міститься в сконструйованій плазміді.

Надекспресія гена *bldD*_{AT} мала помітний вплив на морфологію *A. teichomyceticus*. Транскон'югантні штами *A. teichomyceticus bldD*_{AT}⁺ характеризувалися проявом Bld-фенотипу: нездатністю до формування нормального споруючого газону впродовж всього періоду росту на середовищах ISP3 та CM (рис.3.48). Дослідження мікроморфології газону за допомогою сканувальної електронної мікроскопії показали, що розвиток спорангіїв заблокований на стадії проростання спорангіофорів: поверхня вегетативного міцелію вкрита зародковими спорангієносними гіфами (рис.3.48, в).

Далі ми дослідили вплив надекспресії *bldD*_{AT} на синтез тейкопланіну. На відміну від описаних випадків у стрептоміцетів [89], де збільшення дози негативного регулятора *bldD* призводило до зменшення рівня синтезу антибіотиків, *A. teichomyceticus bldD*_{AT}⁺ продукував тейкопланін на такому ж рівні, що і штам дикого типу.

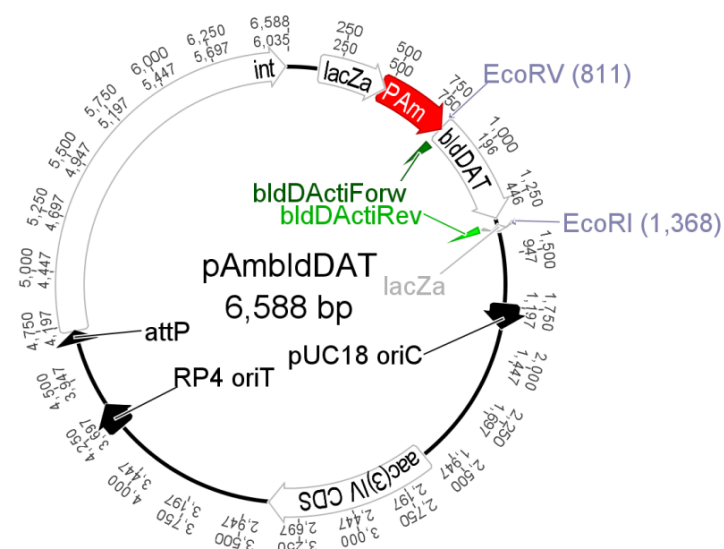


Рис.3.47 Будова плазмиди рAmbldDAT що була використана для надекспресії гена *bldD*_{AT}. Розшифрування умовних позначень див. на рис.3.3.5.

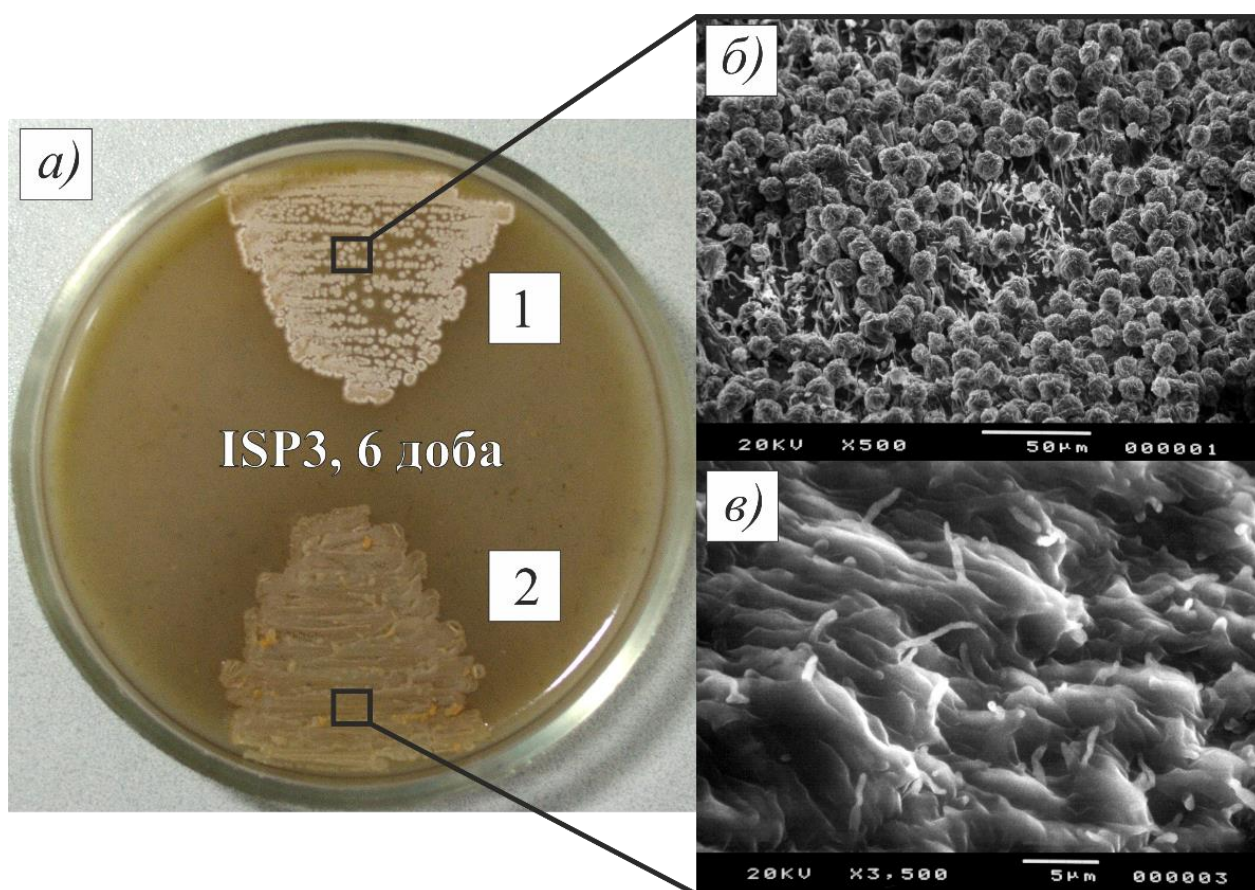


Рис.3.48 Відмінності в морфології штамів *A. teichomyceticus* дикого типу (1); та таму *bldD*_{AT}⁺ (2); а – газони штамів на середовищі ISP3 на 6 добу культивування; б і в – мікрофотографії поверхонь газонів відповідних штамів, зроблені за допомогою сканувальної електронної мікроскопії.

Відмінності в транскрипції деяких потенційних глобальних регуляторів у *A. teichomyceticus* *bldD*_{AT}⁺ в порівнянні із диким типом. Серед генів *A. teichomyceticus*, продукти яких виявилися ортологами ключових морфогенів стрептоміцетів, є багато потенційних мішеней негативного транскрипційного регулятора *bldD*_{AT}⁺. Це, зокрема, гени *sigH*, *whiG*, *bldN*, *whiB*, *ramR*. Можливо, що у штамі *A. teichomyceticus* *bldD*_{AT}⁺ внаслідок надекспресії негативного регулятора транскрипція цих морфогенів є зниженою. Ми вирішили дослідити це, порівнявши транскрипцію генів *sigH*_{AT}, *whiG*_{AT}, *bldN*_{AT}, *whiB*_{AT} та *ram*-кластера у *A. teichomyceticus* *bldD*_{AT}⁺ та в штамі дикого типу, за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією. Сумарна РНК була виділена з культур, вирощених на целофанових дисках, що впродовж чотирьох діб росли на середовищі ISP3 і перетворена на кДНК (як описано в 2.3.4 та 2.3.7). Послідовності праймерів *absB*_RT_F/R, *bldD*_RT_F/R, *ram*_RT_F/R, *bldN*_RT_F/R, *whiG*_RT_F/R, *whiB*_RT_F/R, *sigH*_RT_F/R, використаних для РТ-ПЛР аналізу, подано в додатку Б, таблиця Б.3.

Виявилося, що всі обрані морфогени сильно експресуються в використаних культурах (рис.3.49). Інша картина спостерігалася у *A. teichomyceticus* *bldD*_{AT}⁺. У нього експресія таких морфогенів, як *sigH*_{AT}, *whiG*_{AT}, *bldN*_{AT} та *ram*-кластера помітно знижена. Натомість експресія морфогена *whiB*_{AT} залишалася незмінною у штамів із надекспресією *bldD*_{AT}⁺. Ці дані свідчать, що морфологічні зміни у штаму *bldD*_{AT}⁺ мають вагомі причини: транскрипція більшості основних морфогенів є порушеною.

ДНК-зв'язувальні властивості білка BldD_{AT}. Дані транскрипційного аналізу опосередковано вказують на деякі ймовірні мішені BldD_{AT} в *A. teichomyceticus*. Прямі взаємодії BldD_{AT} із морфогенами *sigH*_{AT}, *whiG*_{AT}, *bldN*_{AT} ми вирішили перевірити, дослідивши чи відбувається зв'язування їх промоторно-операторних ділянок з білком BldD_{AT} за допомогою аналізу зміни електрофоретичної рухливості. Так як у стрептоміцетів BldD є авторегулятором [33], ми також дослідили, чи здатний BldD_{AT} зв'язувати власну промоторно-операторну ділянку.

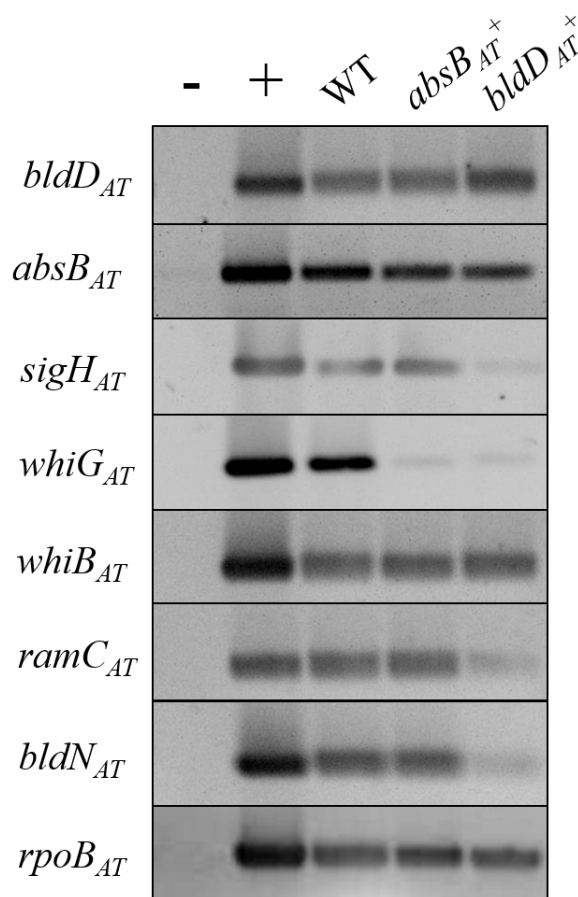


Рис.3.49 Експресія головних морфогенів та внутрішнього контролю *rpoB* у штаммах *A. teichomyceticus bldD_{AT}⁺* та *absB_{AT}⁺* у порівнянні із диким типом (ПЛР із кДНК синтезованою на основі сумарної РНК відповідних штамів, виділеної на 4 добу росту на середовищі ISP3). Негативний контроль (-) – ПЛР без додавання хромосомної чи кДНК; позитивний контроль (+) – ПЛР із додаванням хромосомної ДНК.

Для цього спершу було надекспресовано білок BldD_{AT} в *E. coli*. Відкрити рамку зчитування, що кодує BldD_{AT}, ампліфіковано із хромосоми *A. teichomyceticus* за допомогою полімерази Phusion (ThermoFisher Scientific) із використанням пари праймерів BldDexpF/R. Амлікон клоновано в NdeI- та NotI- сайти плазміди рЕТ24-а(+), яка містить IPTG-індуцибельний промотор, під контролем якого і знаходиться ген бажаного білка У результаті з ділянкою гена *bldDAT*, що кодує N-кінцеву послідовність білка, була злита послідовність, в якій закодований 6-His-tag. Отриману плазмиду рЕТBldDAT перевірено за допомогою секвенування та трансформовано в *E. coli* BL21(DE3). Спостерігали експресію

білка BldD_{AT}-6HIS, що перебував як в розчинній, так і в нерозчинній фракціях (рис.3.50).

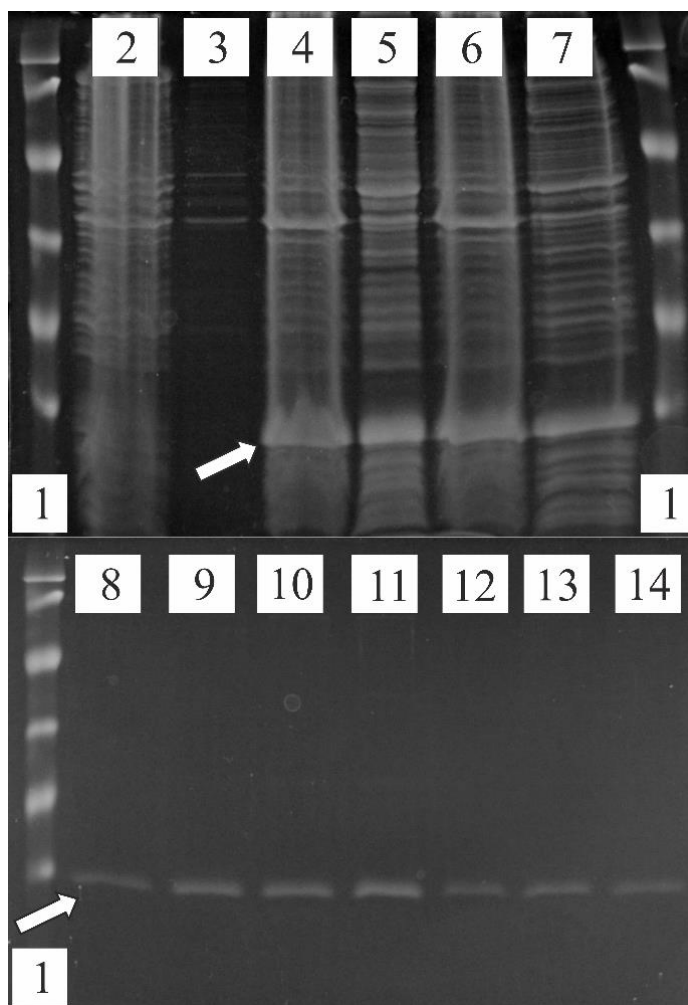


Рис.3.50 Електрофореграма фракцій сумарного білка неіндукованих (2 – нерозчинний білок, 3 – розчинний білок) та індукованих (4, 6 – нерозчинний білок, 3 та 14 год після індукції; 5,7 – розчинний білок, 3 та 14 год після індукції) культур *E. coli* BL21(DE3) pETBldDAT, а також елюйованого BldD_{AT}-6HIS (8-14, почергові промивки). Стрілками показані смуги із молекулярною масою 20 кДа, що відповідають BldD_{AT}-6HIS. Під номером маркер молекулярної ваги 1 Pierce™ Prestained Protein MW Marker 20-120 кДа (ThermoFisher Scientific).

Найоптимальнішими умовами експресії були такі: прекультура клітин *E. coli* вирощувалася до оптичної густини 0,4-0,6, після чого для індукції експресії BldD_{AT} вносили IPTG в концентрації 0,4 мМоль. Клітини відібрано на 3 і на 14 годину після індукції та зруйновано з використанням ультразвукового

гомогенізатора. Розчинну та нерозчинну білкові фракції візуалізовували за допомогою вертикального електрофорезу в ДСН-ПААГ. Смугою, що відповідала BldD_{AT}, мала молекулярну масу приблизно 20 кДа і була присутня як в розчинній, так і в нерозчинній білкових фракціях, але відсутня в зразку сумарного білку неіндукованої *E. coli* BL21(DE3) рЕТBldDAT. Ми дослідили його ДНК-зв'язувальні властивості очищеного білка BldD_{AT}-6HIS за допомогою аналізу зміни електрофоретичної рухливості певних операторно-промоторних ділянок генів у його присутності.

Виявилося, що BldD_{AT}-6HIS не взаємодіє із промоторно-операторною ділянкою гена *strR* *S. griseus*, що був обраний як негативний контроль, в жодних концентраціях. Натомість, білок-нуклеїнові комплекси утворювалися при додавання BldD_{AT}-6HIS до ділянок, що містили промоторно-операторні ділянки генів *bldD*_{AT}, *sigH*_{AT}, *whiG*_{AT}, починаючи із концентрації 25 нг білка (рис.3.51).

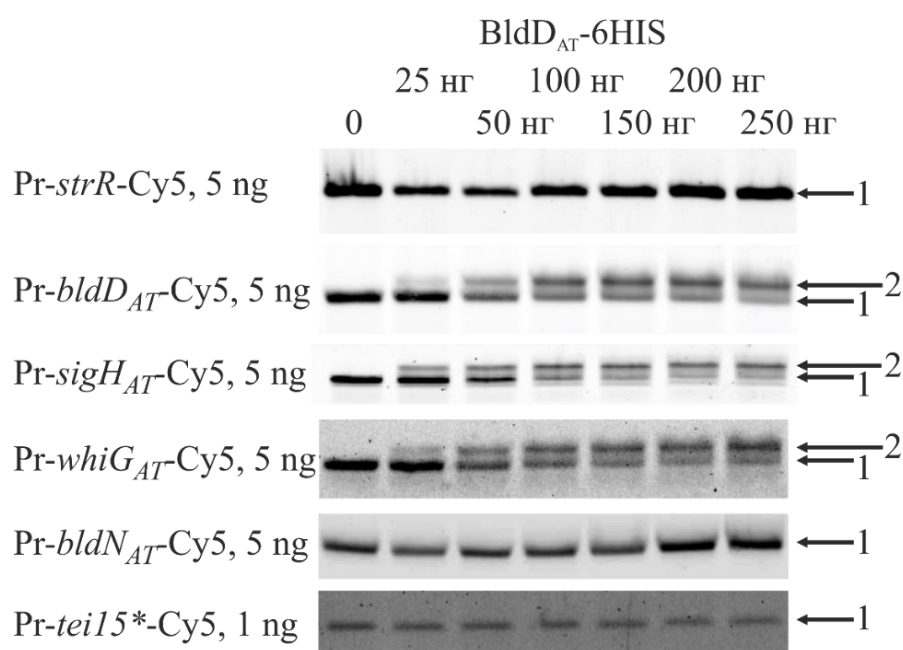


Рис.3.51. Результати аналізу зміни електрофоретичної рухливості промоторно-операторних ділянок генів *strR*, *bldD*_{AT}, *sigH*_{AT}, *whiG*_{AT}, *bldN*_{AT}, *tei15** у присутності зростаючих концентрацій BldD_{AT}-6HIS. ДНК залишалася не зв'язаною (1) у випадках промоторно-операторних ділянок *strR*, *bldN*_{AT} та *tei15**. Для промоторно-операторних ділянок *bldD*_{AT}, *sigH*_{AT} та *whiG*_{AT} спостерігалось утворення нуклеопротейнових комплексів (2).

Зв'язування білком промоторно-операторної ділянки гена *bldN_{AT}* не спостерігали. Не зв'язувався білок BldD_{AT}-6HIS з промоторно-операторною ділянкою гена шлях-специфічного регулятора біосинтезу тейкопланіну – *tei15**.

Отже, дослідження ДНК-зв'язувальних властивостей BldD_{AT} показало, що цей білок здатний зв'язувати *in vitro* промоторно-операторні ділянки ділянки деяких генів ймовірних глобальних регуляторів морфогенезу в *A. teichomyceticus*. Отримані дані доповнюють результати аналізу експресії цих генів в штаммах *bldD_{AT}⁺* і дають змогу зробити висновок про те, що ці гени є безпосередніми мішенями BldD_{AT} в *A. teichomyceticus*.

Гетерологічна експресія *bldD_{AT}* в *S. coelicolor* M145. Амінокислотні послідовності BldD_{AT} та BldD *S. coelicolor* ідентичні майже на 70% (табл. 3.2). Для того, щоби глибше дослідити спільні функціональні аспекти BldD_{AT} до його стрептоміцетних ортологів, ми вирішили експресувати ген *bldD_{AT}* в клітинах *S. coelicolor* M145. Для цього ми перенесли в *S. coelicolor* M145 вектор pAmbldDAT за допомогою міжродової кон'югації з *E.coli* ET12567 pUZ8002. Отримані транскон'югантні штами було перевірено за допомогою ПЛР.

Виявилося, що *S. coelicolor bldD_{AT}⁺* не здатний до нормального формування повітряного міцелію та спор як на багатих середовищах (R5, YMPG), так і на мінімальному (MM) агаризованому середовищі (рис.3.52). Синтез властивих *S. coelicolor* пігментованих антибіотиків актинородину та ундецилпродигіозину також був помітно меншим, або не спостерігався взагалі.

Цікаво, що на середовищі YMPG штам *S. coelicolor bldD_{AT}⁺* спроможний частково долати репресію морфогенезу і в окремих ділянках газону спостерігалось відновлення споруляції та синтезу пігментованих сполук (рис.3.52, а).

Проте, при аналізі мікоморфології газонів *S. coelicolor bldD_{AT}⁺* на середовищі на YMPG за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (рис.3.52, в) було помічено, що гіфи повітряного міцелію у місцях із відновленням споруляції все одно є рідкісними, а спори формуються нерегулярно, той час як штам дикого типу формує велику кількість спор.

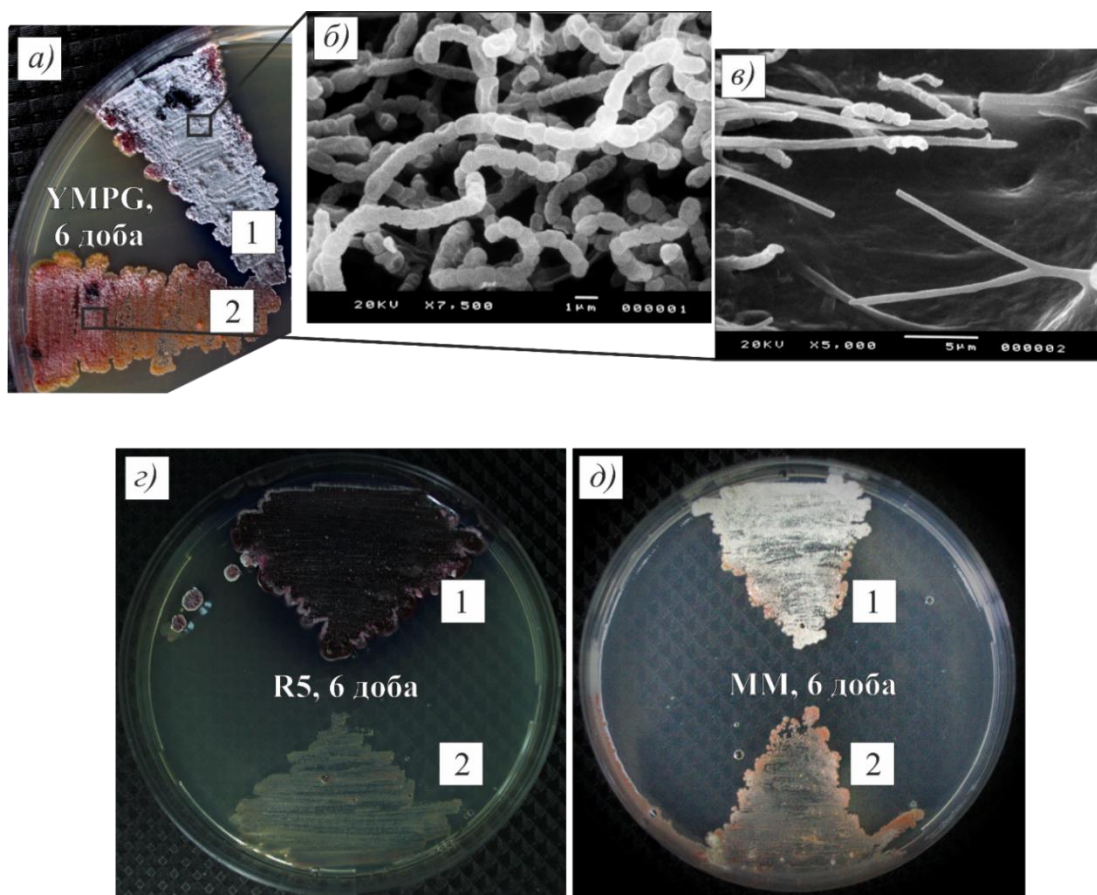


Рис. 3.52 Відмінності в морфології штамів *S. coelicolor* дикого типу (1) та $bldD_{AT}^{+}$ (2) при рості на різних агаризованих середовищах (а, г, д), та мікрофотографії відповідних ділянок газонів (б, в).

Зважаючи на те, що експресія $bldD_{AT}$ призводила до пригнічення росту повітряного міцелію і утворення спор у представника такої віддаленої родини як *Streptomycetaceae*, стає очевидною консервативність ролі BldD в глобальній регуляції актинобактерій. Отже, не дивлячись на те, що BldD_{AT} походить із віддаленої від стрептоміцетів родини актинобактерій, він зберігає у них свою функціональність.

3.6.3.2. Роль AbsB_{AT} у формуванні спорангіїв *A. teichomyceticus*.

Влив надекспресії $absB_{AT}$ на морфологію *A. teichomyceticus*. РНК-аза третього типу AbsB_{AT} ідентична на 65% за амінокислотною послідовністю зі своїм ортологом в *S. coelicolor* – AbsBc. Єдиною достовірною мішенню AbsB в регуляторному каскаді морфогенезу стрептоміцетів є мРНК позитивного

регулятора AdpA [56, 158]. Згідно із отриманими нами попередніми даними (поданими в пункті 3.6.2) видається малоімовірною присутність ортолога AdpA у цьому штамі. Отже, теоретично AbsB_{AT} не повинен був би мати серед своїх субстратів мРНК глобальних регуляторів морфогенезу та вторинного метаболізму *A. teichomyceticus*. Попри це, ми все ж вирішили надекспресувати ген *absB*_{AT} в *A. teichomyceticus*, та дослідити, чи матиме надекспресія вплив на морфогенез та біосинтез тейкопланіну.

Надекспресію було здійснено на векторі pSETPAm, під контролем апраміцинового промотора. Хромосомну ділянку, що містила послідовність гена *absB*_{AT} ампліфіковано за допомогою полімерази Pfu із використанням пари праймерів AbsBActiForw/Rev. Амплікон клонували у EcoRV- та EcoRI-сайти плазмиди pSETPAm. Будову отриманої плазмиди pAmabsBAT (рис.3.53) перевірено за допомогою рестрикційного картування. Її перенесено в клітини *A. teichomyceticus* за допомогою міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 pUZ8002. Транскон'юганти відбиралися як апраміцин-стійкі в концентрації 50 мкг/мл. Їх було перевірено за допомогою ПЛР, ампліфікуючи ген стійкості до апраміцину з pSETPAm.

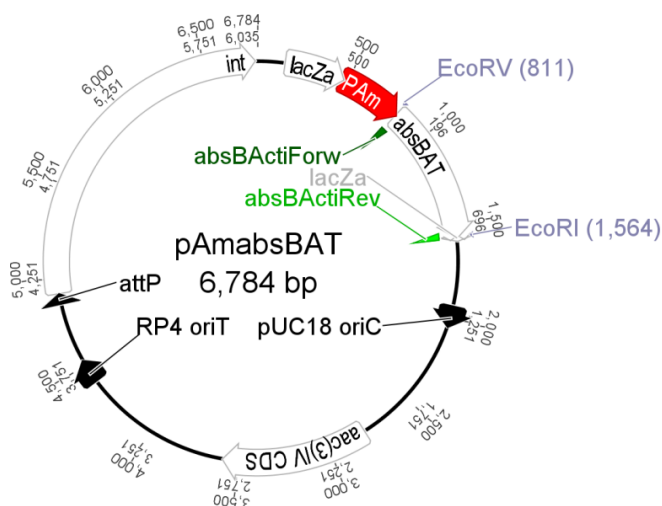


Рис.3.53 Будова плазмиди pAmabsBAT, що була використана для надекспресії гена *absB*_{AT}. Розшифрування умовних позначень див. на рис.3.1.

Як і у випадку надекспресії гена *bldD*_{AT}, спостерігалися помітні відмінності у морфології транскон'югантних штамів порівняно з штамом дикого типу. На

агаризованих середовищах ISP3 та СМ штами *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺* не формували нормального споруючого газону. Хоча на макроскопічному рівні цей фенотип нічим не відрізнявся від фенотипу *A. teichomyceticus bldD_{AT}⁺*, сканувальна електронна мікроскопія показала, що ці фенотипи різні. Ми спостерігали добре розвинені спорангієносні гіфи у *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺*, проте на кінцях лише деяких із них були спорангії (рис.3.54).

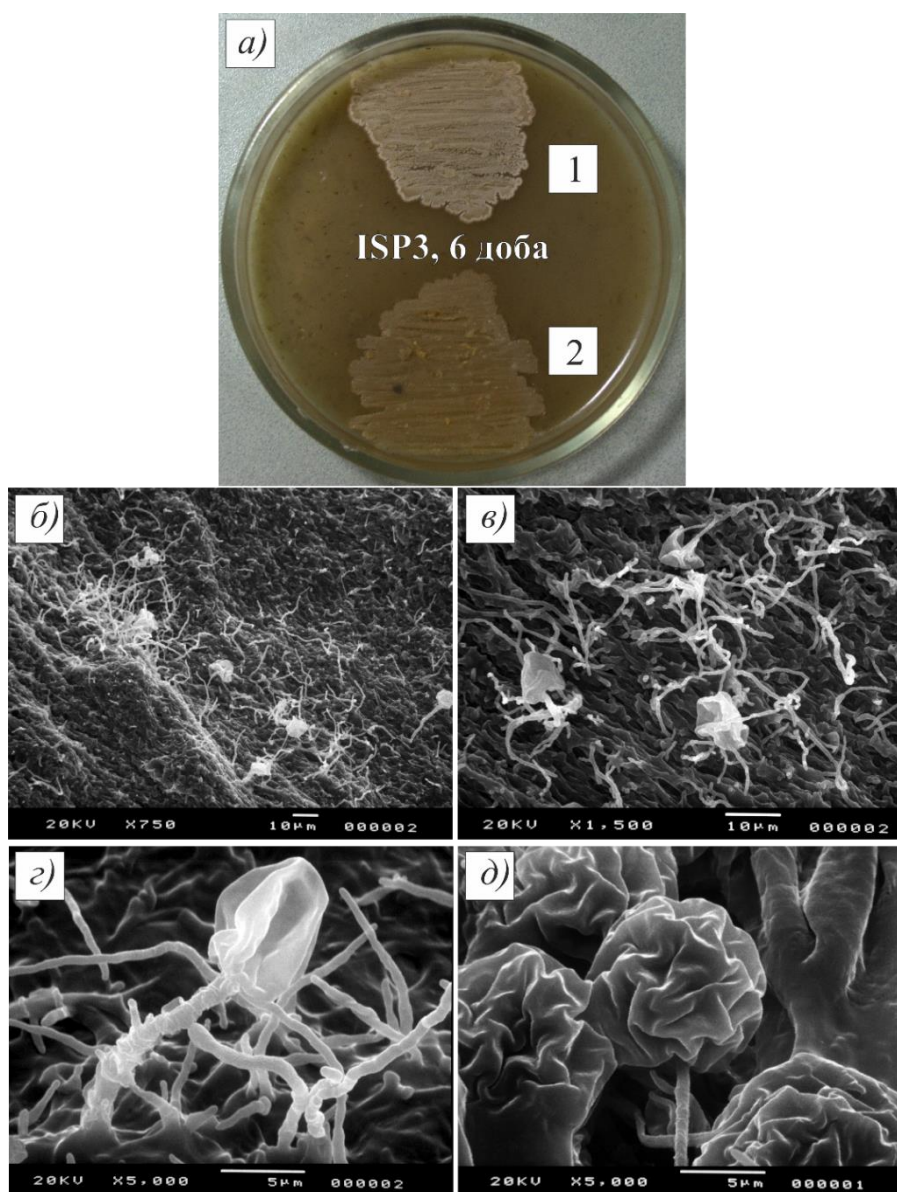


Рис.3.54 Морфологія штамів *A. teichomyceticus* дикого типу (1) та *absB_{AT}⁺* (2): а) вигляд газонів на середовищі ISP3 на 6 добу культивування; б), в) поверхня газону штаму *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺*; г) типовий недорозвинений спорангій *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺*, д) типовий спорангій штаму дикого типу.

Більше того, розвиток цих спорангіїв був порушеним. Спорангії, імовірно, були представлені пустими оболонками і не містили спор всередині (рис.3.54, г).

У змивах із газонів *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺* не було помічено рухливих спор, що завжди присутні в змивах з газонів штаму дикого типу.

У свою чергу, надекспресія *absB_{AT}* не впливала на рівень синтезу тейкопланіну порівняно з штамом дикого типу.

Вплив надекспресії *absB_{AT}* на експресію гена *whiG_{AT}*. Аналогічно до *bldD_{AT}*, ми дослідили чи надекспресія *absB_{AT}* впливає на транскрипцію інших можливих морфогенів, а саме: *sigH_{AT}*, *whiG_{AT}*, *bldN_{AT}*, *whiB_{AT}* та *ramR_{AT}* у *A. teichomyceticus bldD_{AT}⁺*. Виявилося, що лише експресія *whiG_{AT}* була помітно зниженою у *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺* (рис.3.49).

У стрептоміцетів *whiG_{AT}* кодує сігма-фактор, що відповідає за транскрипцію інших *whi*-генів [69], і, як наслідок, є ключовим для нормальної диференціації повітряного міцелію в ланцюжки спор. Необхідно відмітити, що морфологія *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺* була порушена саме на цьому етапі: спорангієносні гіфи не розвивалися у нормальні спорангії. Характерним для Bld-фенотипу стрептоміцетів є блокування морфологічного розвитку на стадії проростання гіфів повітряного міцелію, що ми спостерігали для штамів *A. teichomyceticus bldD_{AT}⁺*, а для Whi-фенотипу – блокування дальшої диференціації гіфів повітряного міцелію. Враховуючи усе вищезазначене, доцільно вважати фенотип, що було виявлено *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺*, аналогічним до Whi-фенотипу стрептоміцетів.

Так як від WhiG у стрептоміцетів безпосередньо залежить експресія таких морфогенів як *whiA*, *whiI* та *whiH*, його надекспресія у *S. coelicolor* приводила до появи ектопічної споруляції [18], в якій спори утворювалися навіть із гіфів субстратного міцелію. Якщо допускати, що *whiG_{AT}* також задіяний у формуванні спорангіїв, було цікавим надекспресувати *whiG_{AT}* в *A. teichomyceticus*. Згідно із початковою гіпотезою, ми очікували спостерігати гіперспоруляцію у рекомбінантних штамів, або запуск споруляції на середовищах, для яких вона не властива. Ми здійснили надекспресію із використанням вектора pSETpAm, аналогічно до надекспресії *absB_{AT}*. Для цього хромосомну ділянку *A. teichomyceticus*, що містила ген *whiG_{AT}* ампліфіковано за допомогою полімерази

Phusion (ThermoFisher Scientific) із використанням пари праймерів WhiG_F/R. Амплікон розміром приблизно 920 п.н. було елюйовано та клоновано в EcoRI- та EcoRV- сайти вектора pSETPAm Сконструйовану плазмиду pAmwhiGAT (рис. 3.55) перевірено за допомогою рестрикційного картування і перенесено в *A. teichomyceticus* за допомогою кон'югації з *E. coli* ET12567 pUZ8002. Відібрані стійкі до апраміцину транскон'юганти перевірено за допомогою ПЛР, ампліфікуючи маркер стійкості до апраміцину.

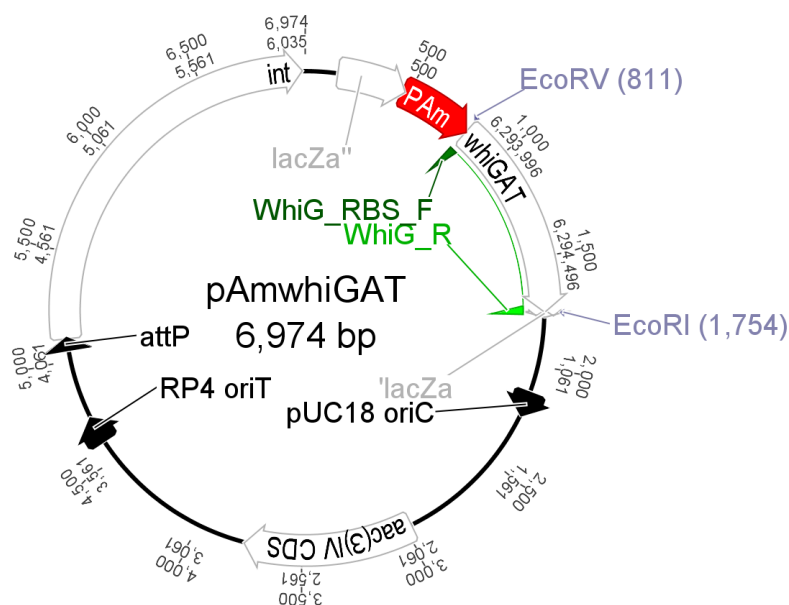


Рис.3.55 Будова плазмиди pAmwhiGAT, що була використана для надекспресії гена *whiG_{AT}*. Розшифрування умовних позначень див. на рис.3.1.

У отриманих штамів *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* ми досліджували лише морфологію. Виявилося, що штамам *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* не властива ектопічна споруляція, зокрема споруляція не відбувалася за умов культивування в рідкій культурі. Більше того, в них було заблоковане формування спорангіїв на таких середовищах як ISP3 та CM, де штам дикого типу добре спорулює. Дослідження мікроморфології штамів *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* дало результати, подібні до отриманих раніше для *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺*: спорангієносні гіфи добре розвинуті, проте спорангії не утворювалися взагалі, або були недорозвинуті (рис.3.56). Ці результати розходяться із очікуваними і не подібні на описані попередньо для *S. coelicolor*.

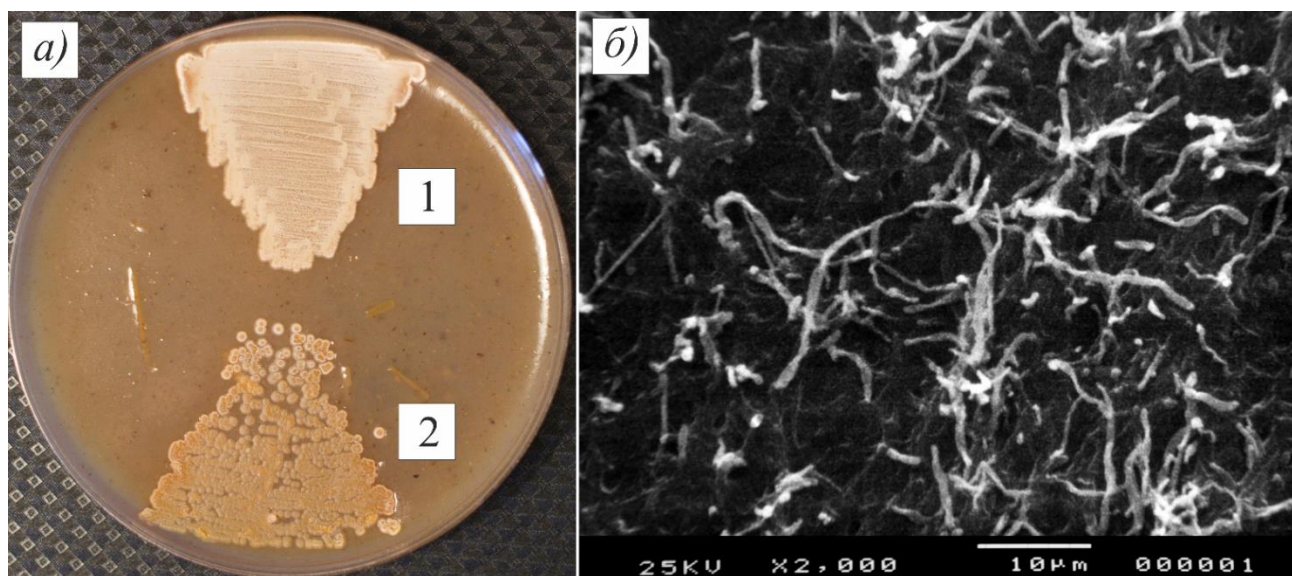


Рис.3.56 Морфологія штамів *A. teichomyceticus* WT (1) та *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* (2) при вирощуванні на середовищі ISP3 на шостий день культивування (а) та мікрофотографія ділянки газону *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* (б).

Гетерологічна експресія гена *absB_{AT}* в різних штаммах *S. coelicolor*. Імовірно, що білок AbsB_{AT} може діяти у клітинах стрептоміцетів подібно до їх власних AbsB, близьким ортологом яких він є. Попри надекспресії *absB_{AT}* у *S. coelicolor* можна чекати порушення нормального морфогенезу. Подібні ефекти свідчатимуть про консервативність регуляторних функцій AbsB у актинобактерій та проливатимуть світло на еволюцію регуляторних механізмів в цих організмів. Із метою це дослідити, ми перенесли плазмиду pAmabsB_{AT} в штам *S. coelicolor* M145 та M1152.

Загалом, ефекти гетерологічної експресії *absB_{AT}* скоріше залежали від середовища вирощування та генетичного фону штамів *S. coelicolor*, в яких було здійснено експресію. На всіх досліджених агаризованих середовищах штам *S. coelicolor* M145 *absB_{AT}⁺* формували повітряний міцелій подібно до дикого типу. Лише на багатому середовищі R5 надекспресія мала помітний вплив на забарвлення повітряного міцелію, який ставав яскраво-рожевим (рис.3.57). Це, скоріше за все, можна пояснити появою забарвлених антибіотиків актинородину та ундецилпродигіозину в гіфах повітряного міцелію або відсутністю сірого спорового пігменту. Надекспресія *absB_{AT}* в *S. coelicolor* M1152, що не продукує

жодних антибіотиків, призводила в свою чергу до прояву Whi-фенотипу на середовищі CM (рис.3.57); на багатих середовищах, зокрема на YMPG, розвиток *S. coelicolor* M1152 $absB_{AT}^+$ був повністю заблокований на етапі проростання повітряного міцелію (рис.3.57). Загалом, ці дані добре корелюють із даними транскрипційного аналізу в *A. teichomyceticus* $absB_{AT}^+$ (див. підпункт 3.6.2.2.), де нами показано негативним вплив $absB_{AT}$ саме на експресію $whiG_{AT}$.

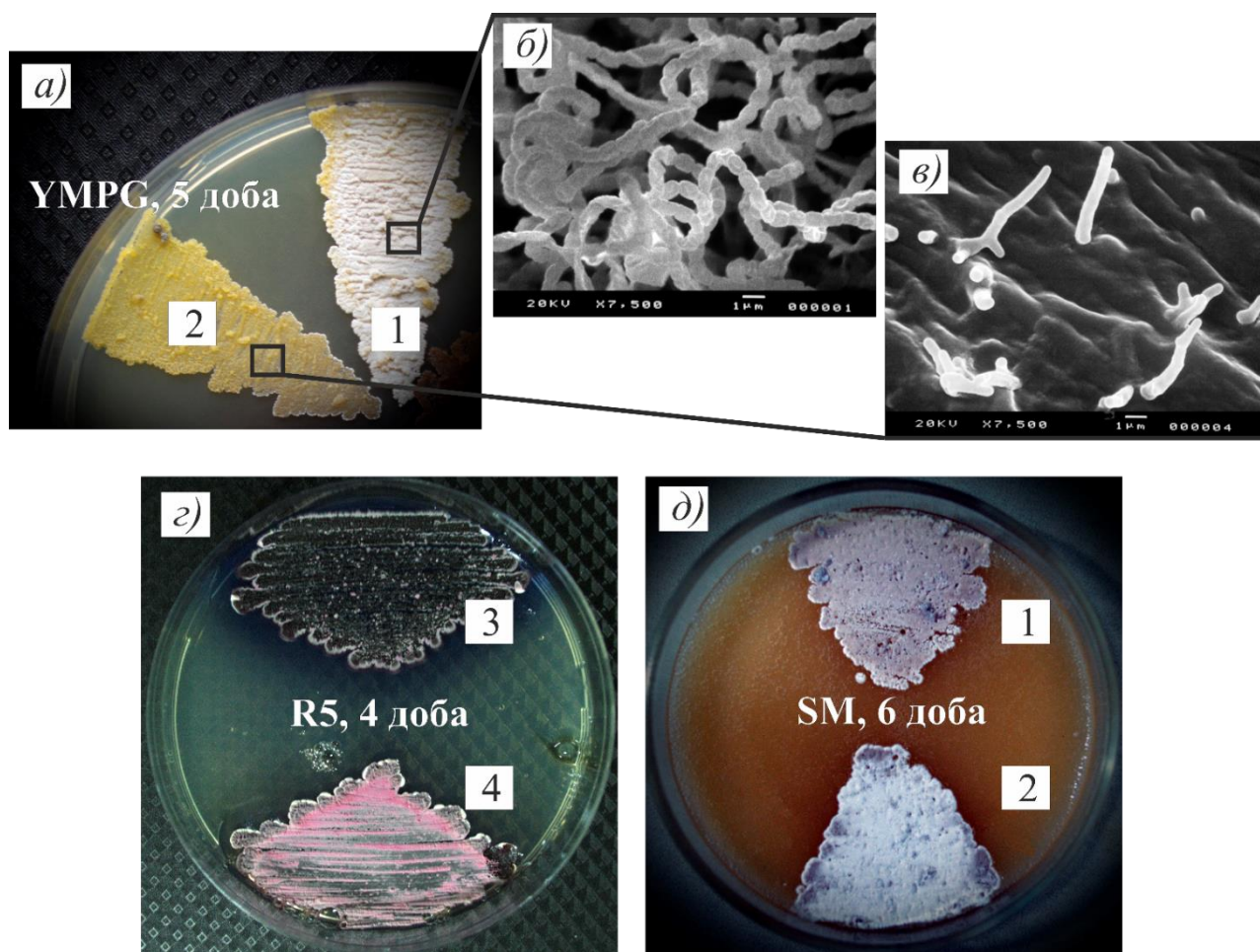


Рис.3.57. Відмінності в морфології пар штамів: *S. coelicolor* M1152 (1)/*S. coelicolor* M1152 $absB_{AT}^+$ (2) та *S. coelicolor* M145 (3)/ *S. coelicolor* M145 $absB_{AT}^+$ (4) за умов вирощування на різних агаризованих середовищах (a, г, д); мікрофотографії відповідних поверхонь газонів (б,в).

Загалом, отримані дані свідчать про те, що, РНКаза AbsB_{AT} можливо здатна розщеплювати транскрипти деяких *whi*-генів за певних умов у *S. coelicolor*, як і транскрипти *AdpA*. Штам *S. coelicolor* M1152 відрізняється від M145 не лише відсутністю кластерів вторинних метаболітів; так як M1152 було сконструйовано

як універсального гетерологічного господаря для кластерів біосинтезу антибіотиків, цей штам також містить ряд мутацій, зокрема мутацію в РНК-полімеразі та рибосомальному білку RpsL [39]; ці мутації значно інтенсифікують процеси синтезу білка та експресії генів в M1152. Можна допустити, що пул AbsB_{AT} буде більшим за умов гетерологічної експресії в M1152 у порівнянні із експресією в M145; більший пул, відповідно буде вести до того, що РНК-аза буде розщеплювати як преференційні субстрати, так і менш преференційні. Таким менш преференційним субстратом може бути AdpA мРНК, і, відповідно, Bld-фенотип спостерігатиметься у M1152 *absB*_{AT}⁺, але не у M145 *absB*_{AT}⁺.

3.6.4. Надекспресія *ssgB*_{AT} індукує формування спорангіїв за умов культивування, для яких споруляція не властива

SsgA-подібні білки (SsgA-like proteins – SALP) є групою споріднених білків, задіяних у споруляції стрептоміцетів. Із них ключовими для споруляції у стрептоміцетів є паралоги SsgA та SsgB, що виступають регуляторами септування гіфів (ймовірно беруть участь в рекрутуванні FtsZ до місця утворення септи) повітряного міцелію і задіяні в формуванні спор [67, 156,]. В *A. teichomyceticus* формування спор відбувається всередині спорангіїв, тому, ймовірно, генетичні механізми регуляції формування спор та спорангіїв (чи спор всередині спорангіїв) є спільними. Із біоінформатичного аналізу (3.6.1.1) видно, що у *A. teichomyceticus* є лише один SALP-білок, ортолог SsgB *S. coelicolor*. Інший представник *Micromonosporaceae*, *Salinispora tropica* також має лише один гомолог SsgB [156]. Для того, щоби дізнатися, чи SsgB_{AT} задіяний у споруляції *A. teichomyceticus* ми вирішили надекспресувати ген *ssgB*_{AT}.

Для надекспресії ми сконструювали вектор на основі pSETPrAm (див. підрозділ 3.1). Ділянку, що несе послідовність гена *ssgB*_{AT}, ампліфіковано з хромосоми *A. teichomyceticus* за допомогою Q5® High-Fidelity ДНК-полімерази (NEB). Амплікон елюювали та клонували у EcoRI- та EcoRV-сайти pSETPrAm. Отриману плазмиду pAmssgBAT (рис.3.58) перевіряли за допомогою рестрикційного картування та переносили в *A. teichomyceticus* за допомогою

міжродової конюгації з *E. coli* ET12567 pUZ8002. Транскон'югантів відібрали за стійкістю до апраміцину в концентрації 50 мкг/мл та перевірили за допомогою ПЛР.

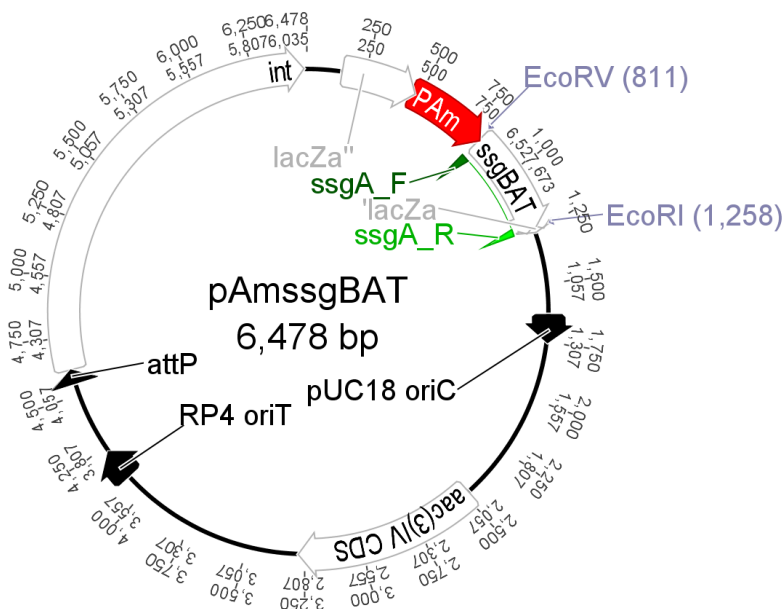


Рис.3.58 Будова рекомбінантної плазмиди pAmssgBAT, яку використано для надекспресії гена *ssgB_{AT}* в *A. teichomyceticus*. Умовні позначення описані на рис. 3.1.

Виявилося, що надекспресія *ssgB_{AT}* в *A. teichomyceticus* не мала помітного впливу на його споруляцію при вирощуванні на агаризованих середовищах ISP3 і CM. Натомість, коли штами *A. teichomyceticus ssgB_{AT}⁺* висівали на середовище ISP2, на якому дикий тип зазвичай формує поодинокі гіфи повітряного міцелію та ніколи не формує спорангіїв, виявилося, що вони утворюють спорулюючий газон (рис.3.59). Більше того, дослідження мікроморфології газонів *A. teichomyceticus ssgB_{AT}⁺* за допомогою сканувальної електронної мікроскопії показало присутність розвинених спорангіїв (рис.3.59). Ці результати свідчать на користь того, що продукт гена *ssgB_{AT}* у *A. teichomyceticus* є задіяним у формуванні спорангіїв, і, можливо спор в них: збільшення дози цього гена веде до запуску диференціації на середовищах, де вона не відбувається за нормальних умов.

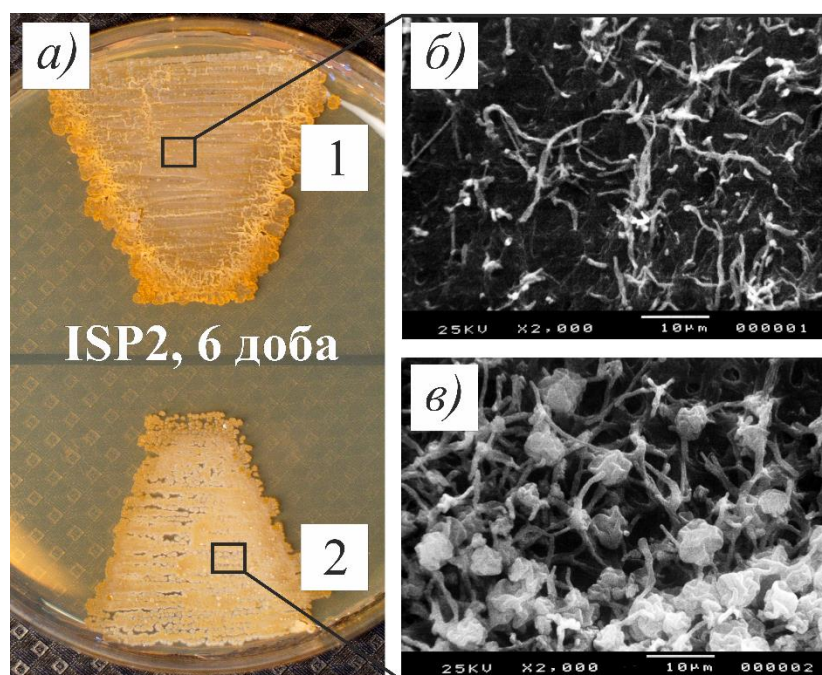


Рис.3.59 Морфологія (а) та мікроморфологія (б, в) штамів *A. teichomyceticus*: дикого типу (1) та $ssgB_{AT}^{+}$ (2), 6 день росту на середовищі ISP2.

Підсумовуючи результати, отримані у підрозділі 3.6. можна сказати, що ми лише розпочали досліджувати регуляторну мережу, яка відповідає за регуляцію вторинного метаболізму та морфологічної диференціації у *A. teichomyceticus* на глобальному рівні. Проте, ми вже відкрили багато важливих регуляторних елементів. Ми спробували узагальнити всі дані і припущення, отримані для глобальної регуляції біосинтезу тейкопланіну та морфогенезу в *A. teichomyceticus* на рис.3.60.

Зокрема, нами показано, що представник родини *Micromonosporales*, *A. teichomyceticus*, скоріше за все не володіє AdpA-опосередкованою системою регуляції. На сьогодні, дані порівняльної геноміки [16] свідчать про те, що у всіх секвенованих геномах стрептоміцетів є ТТА-вмісні ортологи *adpA*. За інерцією, найближчі гомологи *adpA* в нестрептоміцетів часто ануються як ортологи *adpA*. Проте, застосувавши комплексний підхід до пошуку не просто ортолога AdpA, а всіх найважливіших елементів AdpA-опосередкованої регуляції, ми довели, що всі ці елементи у *A. teichomyceticus* відсутні. Це підтверджується як дослідженнями *in silico*, так і дослідженнями *in vivo* та *in vitro*.

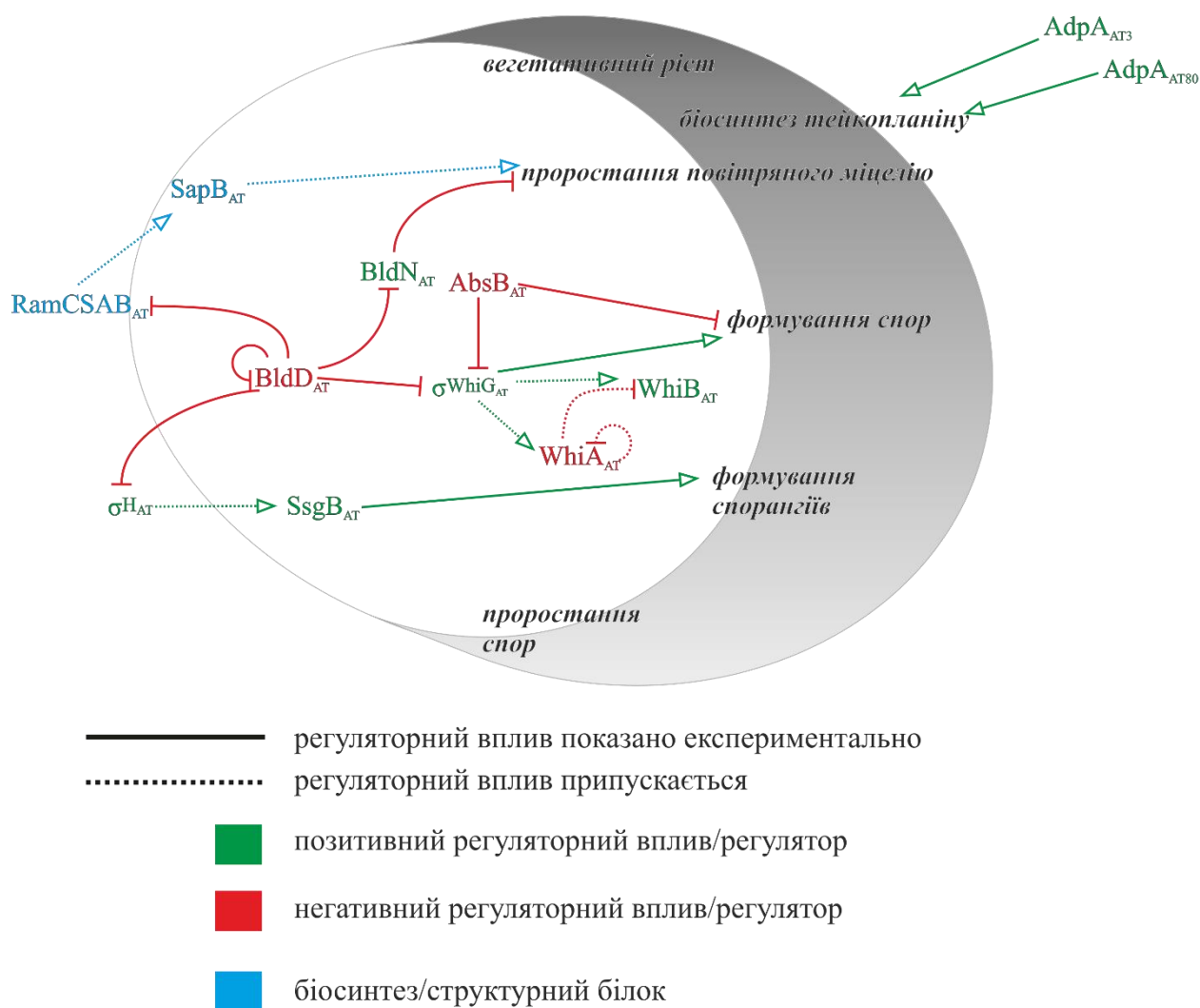


Рис. 3.60 Описані в цьому підрозділі фактори, що впливають на синтез тейкопланіну та морфогенез у *A. teichomyceticus*, та взаємодії між ними.

Раніше ніхто не досліджував AdpA-опосередковану регуляцію у нестрептоміцетних видів, проте можна припустити, що тенденція до відсутності AdpA-опосередкованої регуляції буде спостерігатися у всіх *Micromonosporales*. Цілком ймовірно, що дані дальших експериментів з іншими представниками *Micromonosporales* також покажуть відсутність AdpA-опосередкованої регуляції у них. Наші дані дадуть змогу пролити світло на еволюцію AdpA-подібних регуляторів стрептоміцетів. Згідно із останніми дослідженнями еволюційної історії актинобактерій [79] всі актинобактерії із складними життєвими циклами розділилися на дві сестринські клади понад 1 мільярд років тому. Так, до першої клади входять *Streptomycetales* та *Frankiales*, до другої – всі інші спорулюючі актиноміцети включно з *Micromonosporales*, *Pseudonocardiales*, *Nocardiales*.

Представники обох клад мають в своїх геномах численні паралоги регуляторів AraC/XylS-родини [139], із структурою, подібною до AdpA (димеризаційний домен та ДНК-зв'язувальний петля-поворот-петля домен). Така ж структура характерна і для досліджених у цій роботі AdpA_{AT80}, AdpA_{AT19} та AdpA_{AT3}; проте AdpA_{AT80}, AdpA_{AT19} та AdpA_{AT3} не мають ДНК- зв'язувальних властивостей стрептоміцетних AdpA, а саме здатність AdpA до зв'язування виродженого операторного сайту й визначає існування такого величезного AdpA-регулону у стрептоміцетів. Отже, базуючись на цих даних, можна зробити припущення, що AdpA-стрептоміцетів – продукт спеціалізованої еволюції AraC/XylS-регуляторів актинобактерій, що виник вперше у еволюційній лінії *Streptomyetales*. Виходячи із того, що AdpA_{AT80}, AdpA_{AT19} та AdpA_{AT3} за певних умов проявляють себе як позитивні регулятори біосинтезу антибіотиків (наприклад тейкопланіну в *A. teichomyceticus*) та спорогенезу (за гетерологічної експресії AdpA_{AT19} у *S. coelicolor*), можна зробити наступне припущення, що серед AraC/XylS-регуляторів предкових щодо AdpA, були позитивні регулятори морфогенезу та вторинного метаболізму. Далі, низка еволюційних подій в одній з ліній AraC/XylS-регуляторів, що належать до стрептоміцетів та їх найближчих предків, привела до зниження специфічності ДНК-зв'язувального домену. Це, врешті, дало початок групі AdpA-регуляторів стрептоміцетів, ключових для морфогенезу та вторинного метаболізму.

На відміну від ситуації із AdpA-опосередкованою регуляцією, елементи Bld- та Whi-каскадів в *A. teichomyceticus* подібні до своїх гомологів у стрептоміцетів. Зокрема, негативний регулятор BldD_{AT} – ортолог стрептоміцетних BldD, виступає глобальним репресором морфогенезу і в *A. teichomyceticus*. Більше того, мішені для BldD_{AT}, виявлені в цій роботі, співпадають із такими в *S. coelicolor* [33]. Ортологи BldD можна знайти і в інших представників порядку *Micromonosporales*. Повертаючись до реконструкції еволюції актинобактерій, показаної в [79], стає зрозумілим, що BldD, як ключовий негативний регулятор, повинен бути наявним у спільного предка всіх спорулюючих актинобактерій, від якого походять як стрептоміцетна так і

актинопланетна кладі. Беручи це до уваги, можна констатувати, що BldD-опосередкована глобальна регуляція морфогенезу може бути найдревнішим механізмом регуляції морфогенезу в спорулюючих актинобактерій.

Ортолог AbsB також було знайдено у *A. teichomyceticus*; хоча у стрептоміцетів його єдиною мішенню є *adrA*-мРНК, ми знайшли, що *A. teichomyceticus absB_{AT}⁺* є заблокованим на стадії формування спорангіїв, а рівень *whiG_{AT}*-транскрипту в цьому штамі зменшується. Тобто, у *A. teichomyceticus* мішенню AbsB є принаймні транскрипт *whiG_{AT}*.

Отже, серед мішеней BldD_{AT} і AbsB_{AT} нами знайдено WhiG_{AT}, ортолога σ -фактора, задіяного в споруляції у стрептоміцетів. Хоча на перший погляд ці дані виглядають незрозумілими, при більш детальному аналізі їх можна адекватно інтерпретувати в контексті регуляторного каскаду, що ймовірно є залежним від WhiG_{AT} у *A. teichomyceticus*. Виходячи із даних, отриманих *in silico*, у *A. teichomyceticus* є щонайменше дві мішені для WhiG_{AT}: *whiA_{AT}* та *whiB_{AT}*. Ортологи для стрептоміцетних *whiI* та *whiH* у *A. teichomyceticus* відсутні. Цікаво, що у стрептоміцетів WhiA виступає негативним регулятором *whiB*, *whiG* та є ауторегулятором [64]. Якщо допустити, що аналогічна схема спрацьовує для *A. teichomyceticus*, то прояв фенотипу *A. teichomyceticus whiG_{AT}⁺* можна пояснити. Надекспресія *whiG_{AT}* приводить до зростання експресії *whiA_{AT}*, що кодує негативний регулятор. При збільшенні пулу цього білка він буде інгібувати експресію як *whiB_{AT}*, *whiG_{AT}*, так і експресію власного гена *whiA_{AT}*. Це, очевидно, повинно зумовлювати Whi-подібний фенотип *A. teichomyceticus*, який і був описаний для штамів *absB_{AT}⁺* та *whiG_{AT}⁺*.

Відкритим залишається питання регуляції утворення спорангіїв у *A. teichomyceticus*. Наші дані вказують на те, що у формуванні спорангіїв може бути задіяним продукт гена *ssgB_{AT}*, надекспресія якого веде до формування спорангіїв на середовищах, де *A. teichomyceticus* їх в нормі не формує. Ортолог *ssgB_{AT}* у стрептоміцетів бере участь у септуванні гіфів повітряного міцелію; можливо, у *A. teichomyceticus* SsgB_{AT} функціонує аналогічно.

Варто відмітити, що ми поки не знайшли жодного глобального регулятора *A. teichomyceticus*, який би одночасно впливав і на біосинтезу тейкопланіну і на морфогенез, що повсюдно спостерігається у стрептоміцетів. Цілком можливо, що кластери біосинтезу глікопептидів «потрапляють» у геноми продуцентів внаслідок горизонтального переносу генів та не завжди вписуються в глобальні регуляторні мережі. Для розуміння регуляторних мереж треба вивчити вплив глобальних регуляторів на інші вторинні метаболіти, зокрема на тейхоміцин. Однак, надекспресія генів найближчих гомологів *AdpA* в *A. teichomyceticus* веде до зростання продукції тейкопланіну.

Матеріали підрозділу викладено в наступних публікаціях: [102, 165, 166, 168, 169, 176, 177, 178].

Загалом, в цій роботі (та попередньо) створено ряд штамів із підвищеною продукцією тейкопланіну. Це досягалося надекспресією генів, позитивний вплив яких на біосинтез тейкопланіну здійснюється на різних рівнях: гена *frr_{AT}*, що кодує фактор рециклінгу рибосом та позитивно впливає на загальний фітнес культури; генів, що кодують ферменти біосинтезу тирозину, які забезпечують продукцію тейкопланіну попередниками; генів шлях-специфічних регуляторів біосинтезу тейкопланіну *tei15** та *tei16**; накінець, генів глобальних регуляторів *AdpA_{AT80}* та *AdpA_{AT3}*. Привабливим виглядає припущення, що коекспресія усіх цих генів може мати емерджентний ефект та вести до подальшого збільшення продукції тейкопланіну. Створення ряду рекомбінантних штамів *A. teichomyceticus* із коекспресіями генів, що здійснюють позитивний вплив на біосинтез тейкопланіну, виглядає перспективним продовженням цієї роботи. Не менш цікавою виглядає і перспектива надекспресії досліджених у цій роботі генів в промислових штаммах-надпродуцентах тейкопланіну, отриманих класичними методами мутагенезу та селекції. Такий підхід може знайти своє застосування в рамках подальшого раціонального покращення цих надпродуцентів.

ВИСНОВКИ

В роботі вивчено механізми генетичного контролю біосинтезу тейкопланіну в актиноміцета *A. teichomyceticus* NRRL B-16726. Зокрема, досліджено активність гетерологічних промоторів у *A. teichomyceticus*. Встановлено роль генів, що кодують ферменти модифікації аглікону тейкопланіну. Досліджено транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну, а також залежність експресії цих генів від шлях-специфічних регуляторів. Показано роль генів *tei14** та *tei24** в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну попередниками. Вивчено життєвий цикл *A. teichomyceticus* та деякі аспекти глобальної регуляції морфогенезу та вторинного метаболізму.

1. Сконструйований однокопійний інтегративний кон'югативний вектор pSETPAm може бути використаний для надекспресії генів в *A. teichomyceticus* під контролем сильного конститутивного промотора *aac(3)IVp*. Надекспресія гена фактора рециклінгу рибосом *frt_{AT}* із використанням плазмиди pSETPAm зумовлює збільшення біосинтезу тейкопланіну майже у 8 разів.

2. Вперше показано *in vivo*, що гени *tei3** та *tei10** контролюють глікозилювання аглікону тейкопланіну: приєднання залишку манози та N-ацетил-глюкозаміну відповідно, а ген *tei11** - приєднання бічного аліфатичного ланцюга. На основі аналізу похідних тейкопланіну, що продукують мутантами із нокаутами відповідних генів, встановлено наступну послідовність функціонування глікозилаз та ацетил-трансфераз у декоруванні аглікону тейкопланіну: $Tei10^* \rightarrow Tei11^* \rightarrow Tei1$. У свою чергу, манозил-трансфераза *Tei3** є неспецифічною до субстрату, тому її точне положення в послідовності реакцій не встановлено.

3. Досліджено транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну, де виявлено 18 потенційних полігенних та моногенних транскрипційних одиниць.

4. Виявлено, що гени шлях-специфічних регуляторів *tei15** та *tei16** безпосередньо контролюють експресію більшості транскрипційних одиниць

кластера генів біосинтезу тейкопланіну, при чому *tei16** регулює експресію гена *tei15**. Ген третього транскрипційного регулятора, що міститься в кластері генів біосинтезу тейкопланіну – *tei31** – не бере участі в регуляції експресії генів кластера. Гени оперонів *tei7*-6*-5** (ортологи *vanHAX*) та *tei2*-3** (ортологи *vanRS*), що забезпечують стійкість до глікопептидних антибіотиків, конститутивно експресуються в *A. teichomyceticus*

5. Гени *tei14** та *tei24**, що кодують 3-дезоксид-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтазу та префенатдегідрогеназу, беруть участь в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну тирозином, а їх надекспресія веде до зростання продукції тейкопланіну.

6. Вперше описано етапи життєвого циклу штаму *A. teichomyceticus*. У процесі формування спорангіїв *A. teichomyceticus* задіяні гени, які ймовірно кодують SapB-подібний сурфактант.

7. Базуючись на даних, отриманих в результаті аналізу особливостей генома *A. teichomyceticus in silico* (вживання ТТА-кодону, відсутність генів біосинтезу А-фактор-подібних сполук і їх рецепторів), а також вивчення ДНК-зв'язувальних властивостей та гетерологічної експресії найближчих гомологів AdpA *A. teichomyceticus* можна стверджувати про відсутність AdpA-опосередкованої регуляції в *A. teichomyceticus*. *adpA_{AT80}* та *adpA_{AT3}* – гомологи AdpA в *A. teichomyceticus* – є позитивними регуляторами біосинтезу тейкопланіну, а їх надекспресія веде до зростання рівнів біосинтезу цього антибіотика.

8. Вперше показані функції глобальних регуляторів морфогенезу в актинобактерій родини *Micromonosporaceae*. Гени *bldD_{AT}*, *absB_{AT}*, *whiG_{AT}*, *ssgB_{AT}*, задіяні в процесах формування спорангіїв та спор у *A. teichomyceticus*. *bldD_{AT}* та *absB_{AT}* є негативними глобальними регуляторами, які блокують формування спорангіїв *A. teichomyceticus* на різних етапах, а *whiG_{AT}*, *ssgB_{AT}* – позитивними регуляторами формування спорангіїв у *A. teichomyceticus*. Глобальні негативні регулятори *bldD_{AT}* та *absB_{AT}* не впливають на біосинтез тейкопланіну.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abou-Zeid, A., Euverink, G., Hessels, G.I., Jensen, R.A., Dijkhuizen, L. (1995) Biosynthesis of l-Phenylalanine and l-Tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1298-1302.
2. Alduina, R., Piccolo, L. L., D'alia, D., Ferraro, C., Gunnarsson, N., Donadio, S., & Puglia, A. M. (2007). Phosphate-controlled regulator for the biosynthesis of the dalbavancin precursor A40926. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8120-8129.
3. Arias, P, Fernández-moreno, M.A., Malpartida, F. (1999) Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 181(22), 6958-6968.
4. Balado, M., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2008). Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*, 154(5), 1400-1413.
5. Barna, J. (1984). The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 339-357.
6. Barreiro, C., Prieto, C., Sola-Landa, A., Solera, E., Martinez-Castro, M., Perez-Redondo, R., ... Martin, J. F. (2012). Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Journal of Bacteriology*, 194(14), 3756-3757.
7. Beltrametti, F., Consolandi, A., Carrano, L., Bagatin, F., Rossi, R., Leoni, L., ... Marinelli, F. (2007). Resistance to glycopeptide antibiotics in the teicoplanin producer is mediated by van gene homologue expression directing the synthesis of a modified cell wall peptidoglycan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1135-1141.
8. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerden A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., ... Hopwood, D. A. (2005) Complete genome

- sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
9. Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385-395.
 10. Bibb, M. J., Molle, V., & Buttner, M. J. (2000). Sigma BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4606-4616.
 11. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E., Nagaraja Rao, R., & Schoner, B. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116(1), 43-49.
 12. Binda, E., Marcone, G. L., Pollegioni, L., & Marinelli, F. (2012). Characterization of VanYn, a novel D,D-peptidase/D,D-carboxypeptidase involved in glycopeptide antibiotic resistance in *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. *FEBS Journal*, 279(17), 3203-3213.
 13. Bonner, C. A., Disz, T., Hwang, K., Song, J., Vonstein, V., Overbeek, R., & Jensen, R. A. (2008). Cohesion group approach for evolutionary analysis of tyra, a protein family with wide-ranging substrate specificities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 13-53.
 14. Calhoun, D.H., Pierson, D.L., Jensen, R.A. (1973) Channel-shuttle mechanism for the regulation of phenylalanine and tyrosine synthesis at a metabolic branch point in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 113(1), 241-251.
 15. Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., & Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 326(3), 929-939.
 16. Chandra, G., & Chater, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 345-379.
 17. Chater, K. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 685-713.

- 18.Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Méndez, C., & Helmann, J. D. (1989). The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B. subtilis*. *Cell*, 59(1), 133-143.
- 19.Chng, C., Lum, A. M., Vroom, J. A., & Kao, C. M. (2008). A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11346-11351.
- 20.Choi, S., Lee, C., Hwang, Y., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2003). γ -Butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Archives of Microbiology*, 180(4), 303-307.
- 21.Claessen, D. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development*, 17(14), 1714-1726.
- 22.Claxton, H. B., Akey, D. L., Silver, M. K., Admiraal, S. J., & Smith, J. L. (2008). Structure and functional analysis of RifR, the Type II thioesterase from the rifamycin biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5021-5029.
- 23.Collier, J., & Shapiro, L. (2007). Spatial complexity and control of a bacterial cell cycle. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(4), 333-340.
- 24.Cometti, A., Gallo, G.G., Kettenring, J., Panzone, G.B., Tuan, G., Zerilli, L.F. (1988) Isolation and structure determination of the main related substances of teicoplanin, a glycopeptide antibiotic. *Farmaco Sci*, 43(12), 1005-1018.
- 25.Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Supplement 1), S25-S34.
- 26.Craig, W. A. (2003). Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17(3), 479-501.

27. Cross, P. J., Dobson, R. C., Patchett, M. L., & Parker, E. J. (2011). Tyrosine latching of a regulatory gate affords allosteric control of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10216-10224.
28. De Boer, L., Vrijbloed, J. W., Grobбен, G., & Dijkhuizen, L. (1989). Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in the ribulose monophosphate cycle methylotroph *Nocardia* sp. 239. *Archives of Microbiology*, 151(4), 319-325.
29. Den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K., & Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 78(2), 361-379.
30. Di Berardo, C., Capstick, D. S., Bibb, M. J., Findlay, K. C., Buttner, M. J., & Elliot, M. A. (2008). Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 190(17), 5879-5889.
31. Donadio, S., Sosio, M., Stegmann, E., Weber, T., & Wohlleben, W. (2005). Comparative analysis and insights into the evolution of gene clusters for glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(1), 40-50.
32. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
33. Elliot, M. A., Locke, T. R., Galibois, C. M., & Leskiw, B. K. (2003). BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 35-40.
34. Fazel, A.M., Jensen, R.A. (1979) Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via the pretyrosine branchlet in coryneform bacteria. *Journal of bacteriology*, 138(3), 805-815.
35. Fowler-Goldsworthy, K., Gust, B., Mouz, S., Chandra, G., Findlay, K. C., & Chater, K. F. (2011). The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 157(5), 1312-1328.

- 36.Fuglsang, A. (2005). Intragenic position of UUA codons in streptomycetes. *Microbiology*, 151(10), 3150-3152.
- 37.Gajzlerska, W., Kurkowiak, J., & Turło, J. (2015). Use of three-carbon chain compounds as biosynthesis precursors to enhance tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis*. *New Biotechnology*, 32(1), 32-39.
- 38.Golfinger, V. (2013). *Metabolic engineering of tyrosine biosynthesis in the glycopeptide producer Amycolatopsis balhimycina*. Tübingen: Universität Tübingen.
- 39.Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2010). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 207-215.
- 40.Green, M. R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 41.Gust B., Kieser T., & Chater K. (2002). *PCR targeting system in Streptomyces coelicolor* A3(2). Norwich: John Innes Centre.
- 42.Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1541-1546.
- 43.Ha, H., Hwang, Y., & Choi, S. (2008). Application of conjugation using ϕ C31 att/int system for *Actinoplanes teichomyceticus*, a producer of teicoplanin. *Biotechnology Letters*, 30(7), 1233-1238.
- 44.Hadatsch, B., Butz, D., Schmiederer, T., Steudle, J., Wohlleben, W., Süssmuth, R., & Stegmann, E. (2007). The biosynthesis of teicoplanin-type glycopeptide antibiotics: assignment of P450 mono-oxygenases to side chain cyclizations of glycopeptide A47934. *Chemistry & Biology*, 14(9), 1078-1089.
- 45.Hara, H., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2009). DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology*, 155(7), 2197-2210.

46. Heider, S. A., Wolf, N., Hofemeier, A., Peters-Wendisch, P., & Wendisch, V. F. (2014). Optimization of the IPP precursor supply for the production of lycopene, decaprenoxanthin and astaxanthin by *Corynebacterium glutamicum*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2.
47. Higgins, M. (1967) Release of sporangiospores by a strain of *Actinoplanes*. *Journal of Bacteriology*, 94(3), 495–498.
48. Higgins, M., Lechevalier, M., Lechevalier, H. (1967) Flagellated actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1446–1451.
49. Higo, A., Horinouchi, S., & Ohnishi, Y. (2011). Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology*, 81(6), 1607-1622.
50. Horbal, L., Kobylyanskyy, A., Truman, A., Yushchuk, O., Marinelli F., Ostash, B., Luzhetskyy, A., & Fedorenko, V. (2014, April). The pathway specific regulatory genes as keys to teicoplanin overproduction in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (p. 7). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv.
51. Horbal, L., Kobylyanskyy, A., Truman, A. W., Zaburranyi, N., Ostash, B., Luzhetskyy, A., ... Fedorenko, V. (2014). The pathway-specific regulatory genes, *tei15** and *tei16**, are the master switches of teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9295-9309.
52. Horbal, L., Kobylyanskyy, A., Yushchuk, O., Ziburannyi, N., Luzhetskyy, A., Ostash, B., ... Fedorenko, V. (2013). Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus* – producer of teicoplanin, drug of last defense. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 367-372.
53. Horbal, L., Rebets, Y., Rabyk, M., Makitrynsky, R., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V., & Bechthold, A. (2012). SimReg1 is a master switch for

- biosynthesis and export of simocyclinone D8 and its precursors. *AMB Express*, 2(1), 1.
54. Horbal, L., Zaburanny, N., Ostash, B., Shulga, S., & Fedorenko, V. (2012). Manipulating the regulatory genes for teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2095-2100.
 55. Horinouchi, S., & Beppu, T. (2007). Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 83(9/10), 277-295.
 56. Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., ... Cohen, S. N. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1276-1287.
 57. Hund, H.K., Bär, G., Lingens, F. (1990) Purification and properties of arogenate dehydrogenase from *Actinoplanes missouriensis*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 44(9-10), 797-801.
 58. Janosi, L., Shimizu, I., & Kaji, A. (1994). Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4249-4253.
 59. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6, 3901-3907.
 60. Jefferson, R. A., Bevan, M., & Kavanagh, T. (1987). The use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochemical Society Transactions*, 15(1), 17-18.
 61. Jung, H., Jeya, M., Kim, S., Moon, H., Kumar Singh, R., Zhang, Y., & Lee, J. (2009). Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 417-428.

62. Jung, H., Kim, S., Prabhu, P., Moon, H., Kim, I., & Lee, J. (2008). Optimization of culture conditions and scale-up to plant scales for teicoplanin production by *Actinoplanes teichomyceticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 21-27.
63. Jung, W. S., Kim, E., Yoo, Y. J., Ban, Y. H., Kim, E. J., & Yoon, Y. J. (2014). Characterization and engineering of the ethylmalonyl-CoA pathway towards the improved heterologous production of polyketides in *Streptomyces venezuelae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3701-3713.
64. Kaiser, B. K., & Stoddard, B. L. (2011). DNA recognition and transcriptional regulation by the WhiA sporulation factor. *Scientific Reports*, 1(1), 1-9.
65. Kaiser, D., Robinson, M., & Kroos, L. (2010). Myxobacteria, polarity and multicellular morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), 380-389.
66. Kears, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
67. Keijser, B. J., Noens, E. E., Kraal, B., Koerten, H. K., & Wezel, G. P. (2003). The *Streptomyces coelicolor* *ssgB* gene is required for early stages of sporulation. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 59-67.
68. Keijser, B. J., Van Wezel, G. P., Canters, G. W., & Vijgenboom, E. (2002). Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* *ram* genes: Involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4420-4429.
69. Kelemen, G. H., Brown, G. L., Kormanec, J., Potůčková, L., Chater, K. F., & Buttner, M. J. (1996). The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 21(3), 593-603.

70. Keller, B., Keller, E., Lingens, F. (1985) Arogenate dehydrogenase from *Streptomyces phaeochromogenes*. Purification and properties. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 366(11), 1063-1066.
71. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
72. Kieser, T., & Bibb, M. J. (2004). *Practical streptomyces genetics*. Norwich, England: John Innes Centre.
73. Kilian, R., Fräsch, H., Kulik, A., Wohlleben, W., & Stegmann, E. (2016). The VanRS homologous two-component system VnlRS_{Ab} of the glycopeptide producer *Amycolatopsis balhimycina* Activates Transcription of the vanHAXSc genes in *Streptomyces coelicolor*, but not in *A. balhimycina*. *Microbial Drug Resistance*, 22(6), 499-509.
74. Kim, J., Won, H., & Kang, S. (2013). The C-terminal domain of the transcriptional regulator BldD from *Streptomyces coelicolor* A3(2) constitutes a novel fold of winged-helix domains. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(6), 1093-1098.
75. Kormanec, J., & Sevcikova, B. (2002). The stress-response sigma factor σ^H controls the expression of *ssgB*, a homologue of the sporulation-specific cell division gene *ssgA*, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Genetics and Genomics*, 267(4), 536-543.
76. Kwun, M. J., Novotna, G., Hesketh, A. R., Hill, L., & Hong, H. (2013). *In vivo* studies suggest that induction of VanS-dependent vancomycin resistance requires binding of the drug to D-Ala-D-Ala termini in the peptidoglycan cell wall. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4470-4480.
77. Lechevalier H., Lechevalier M., Holbert P. (1966) Electron microscopic observation of the sporangial structure of strains of *Actinoplanaceae*. *Journal of Bacteriology*, 92(4), 1228–1235.
78. Lee, P., Umeyama, T., & Horinouchi, S. (2002). *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary

- metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 43(6), 1413-1430.
79. Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., ... Currie, C. R. (2016). Evolution and ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 235-254.
 80. Li, L., Guo, J., Wen, Y., Chen, Z., Song, Y., & Li, J. (2010). Overexpression of ribosome recycling factor causes increased production of avermectin in *Streptomyces avermitilis* strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(7), 673-679.
 81. Li, T., Huang, F., Haydock, S. F., Mironenko, T., Leadlay, P. F., & Spencer, J. B. (2004). Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin. *Chemistry & Biology*, 11(1), 107-119.
 82. Li, X., Wang, J., Li, S., Ji, J., Wang, W., & Yang, K. (2015). ScbR- and ScbR2-mediated signal transduction networks coordinate complex physiological responses in *Streptomyces coelicolor*. *Scientific Reports*, 5, 14831.
 83. Light, S. H., & Anderson, W. F. (2013). The diversity of allosteric controls at the gateway to aromatic amino acid biosynthesis. *Protein Science*, 22(4), 395-404.
 84. Lo Grasso, L., Maffioli, S., Sosio, M., Bibb, M., Puglia, A. M., & Alduina, R. (2015). Two master switch regulators trigger A40926 biosynthesis in *Nonomuraea* sp. strain ATCC 39727. *Journal of Bacteriology*, 197(15), 2536-2544.
 85. Loll, P. J., Miller, R., Weeks, C. M., & Axelsen, P. H. (1998). A ligand-mediated dimerization mode for vancomycin. *Chemistry & Biology*, 5(5), 293-298.
 86. Lopez-Garcia, M. T., Santamarta, I., & Liras, P. (2010). Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus* *adpA*-deleted mutant. *Microbiology*, 156(8), 2354-2365.

- 87.Ma, Z., Tao, L., Bechthold, A., Shentu, X., Bian, Y., & Yu, X. (2014). Overexpression of ribosome recycling factor is responsible for improvement of nucleotide antibiotic-toyocamycin in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 5051-5058.
- 88.Mackay, J. P., Gerhard, U., Beauregard, D. A., Williams, D. H., Westwell, M. S., & Searle, M. S. (1994). Glycopeptide antibiotic activity and the possible role of dimerization: a model for biological signaling. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4581-4590.
- 89.Makitrynsky, R., Ostash, B., Tsypik, O., Rebets, Y., Doud, E., Meredith, T., ... Fedorenko, V. (2013). Pleiotropic regulatory genes *bldA*, *adpA* and *absB* are implicated in production of phosphoglycolipid antibiotic moenomycin. *Open Biology*, 3(10), 130121-130121.
- 90.Marahiel, M. A. (2016). A structural model for multimodular NRPS assembly lines. *Nat. Prod. Rep*, 33(2), 136-140.
- 91.Marshall, C.G., Lessard, I.A., Park, I. & Wright, G.D. (1998) Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide producing organisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42, 2215–2220.
- 92.Mattox, J., Belliveau, P., & Durand, C. (2016). Oritavancin: a novel lipoglycopeptide. *The Consultant Pharmacist*, 31(2), 86-95.
- 93.McCormick, J., Flärdh, K. (2012) Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 206–231.
- 94.Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 515-525.
- 95.Miyadoh, S. (1997). *Atlas of actinomycetes*. Tokyo: Asakura Publishing Co.
- 96.Myronovskyi, M., Welle, E., Fedorenko, V., & Luzhetskyy, A. (2011). β -glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in *Actinomycetes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5370-5383.

97. Nicolaou, K. C., Boddy, C. N., Braese, S., & Winssinger, N. (1993). Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(15), 2096-2152.
98. Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., & Dessen, A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Science*, 23(3), 243-259.
99. O'Connor, T. J., Kanellis, P., & Nodwell, J. R. (2002). The ramC gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Molecular Microbiology*, 45(1), 45-57.
100. Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., & Horinouchi, S. (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Molecular Microbiology*, 34(1), 102-111.
101. Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A., & Horinouchi, S. (2005). AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(3), 431-439.
102. Ostash, B., Yushchuk, O., Tistechok, S., Mutenko, H., Horbal, L., Muryn, A., ... Fedorenko, V. (2015). The adpA-like regulatory gene from *Actinoplanes teichomyceticus*: in silico analysis and heterologous expression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1297-1301.
103. Owen, J. G., Reddy, B. V., Ternei, M. A., Charlop-Powers, Z., Calle, P. Y., Kim, J. H., & Brady, S. F. (2013). Mapping gene clusters within arrayed metagenomic libraries to expand the structural diversity of biomedically relevant natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 11797-11802.
104. Pachebat, J. A., Van Keulen, G., Whitten, M. M., Girdwood, S., Del Sol, R., Dyson, P. J., & Facey, P. D. (2013). Draft genome sequence of

- Rhodococcus rhodnii* strain LMG5362, a symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the principle vector of *Trypanosoma cruzi*. *Genome Announcements*, 1(3), e00329-13-e00329-13.
105. Pfeifer, V., Nicholson, G. J., Ries, J., Recktenwald, J., Schefer, A. B., Shawky, R. M., ... Pelzer, S. (2001). A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis: the biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38370-38377.
 106. Pootoolal, J., Thomas, M. G., Marshall, C. G., Neu, J. M., Hubbard, B. K., Walsh, C. T., & Wright, G. D. (2002). Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8962-8967.
 107. Puk, O., Bischoff, D., Kittel, C., Pelzer, S., Weist, S., Stegmann, E., ... Wohlleben, W. (2004). Biosynthesis of chloro- β -hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6093-6100.
 108. Rebets, Y., Boll, R., Horbal, L., Fedorenko, V., & Bechthold, A. (2009). Production of avilamycin A is regulated by AviC1 and AviC2, two transcriptional activators. *The Journal of Antibiotics*, 62(8), 461-464.
 109. Rebets, Y., Dutko, L., Ostash, B., Luzhetskyy, A., Kulachkovskyy, O., Yamaguchi, T., ... Fedorenko, V. (2007). Function of lanI in regulation of landomycin A biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136 and cross-complementation studies with *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins encoding genes. *Archives of Microbiology*, 189(2), 111-120.
 110. Retzlaff, L., & Distler, J. (1995). The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Molecular Microbiology*, 18(1), 151-162.

111. Richter, T. K., Hughes, C. C., & Moore, B. S. (2014). Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. *Environmental Microbiology*, 17(6), 2158-2171.
112. Rudolph, M. M., Vockenhuber, M., & Suess, B. (2013). Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 159(Pt_7), 1416-1422.
113. Ryding, N. J., Anderson, T. B., & Champness, W. C. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, Encoding a cluster-linked two-component system. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 794-805.
114. Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P., & Horinouchi, S. (2004). Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 334, 53-61.
115. Schleif, R. (2003). AraC protein: A love-hate relationship. *BioEssays*, 25(3), 274-282.
116. Shawky, R. M., Puk, O., Wietzorrek, A., Pelzer, S., Takano, E., Wohlleben, W., & Stegmann, E. (2007). The border sequence of the balhimycin biosynthesis gene cluster from *Amycolatopsis balhimycina* contains *bbr*, encoding a StrR-like pathway-specific regulator. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1-3), 76-88.
117. Shumilin, I., Bauerle, R., & Kretsinger, R. (2003). Crystal structure of E24Q mutant of phenylalanine-regulated 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHP synthase) from *Escherichia coli* in complex with Mn^{2+} and PEP. doi:10.2210/pdb1n8f/pdb.
118. Smith, J. R., Roberts, K. D., & Rybak, M. J. (2015). Dalbavancin: a novel lipoglycopeptide antibiotic with extended activity against gram-positive infections. *Infectious Diseases and Therapy*, 4(3), 245-258.
119. Smith, W., & Drew, R. (2009). Telavancin: A new lipoglycopeptide for Gram-positive infections. *Drugs of Today*, 45(3), 159.

120. Somma, S., Gastaldo, L., & Corti, A. (1984). Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(6), 917-923.
121. Song, J., Bonner, C.A., Wolinsky, M., Jensen, R.A. (2005) The TyrA family of aromatic-pathway dehydrogenases in phylogenetic context. *BMC biology*, 3(13).
122. Sosio, M. M., Kloosterman H., Bianchi A., De Vreugd P., Dijkhuizen L., & Donadio S. (2004). Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Microbiology*, 150(1), 95-102.
123. Sosio, M., Stinchi, S., Beltrametti, F., Lazzarini, A., & Donadio, S. (2003). The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* species. *Chemistry & Biology*, 10(6), 541-549.
124. Speedie, M. K., & Park, M. O. (1980). Regulation of tyrosine biosynthesis by phenylalanine in anthramycin-producing *Streptomyces refuineus*. *The Journal of Antibiotics*, 33(6), 579-584.
125. Speth, A. R., Hund, H., & Lingens, F. (1989). Terminal phenylalanine and tyrosine biosynthesis of *Microtetraspora glauca*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 370(1), 591-600.
126. Spohn, M., Kirchner, N., Kulik, A., Jochim, A., Wolf, F., Muenzer, P., ... Stegmann, E. (2014). Overproduction of ristomycin A by activation of a silent gene cluster in *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 6185-6196.
127. Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-rainey, N. L. (1997). proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 479-491.
128. Stegmann, E., Albersmeier, A., Spohn, M., Gert, H., Weber, T., Wohlleben, W., ... Rückert, C. (2014). Complete genome sequence of the actinobacterium *Amycolatopsis japonica* MG417-CF17T (=DSM 44213T) producing (S,S)-N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid. *Journal of Biotechnology*, 189, 46-47.

129. Stegmann, E., Pelzer, S., Bischoff, D., Puk, O., Stockert, S., Butz, D., ... Wohlleben, W. (2006). Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. *Journal of Biotechnology*, 124(4), 640-653.
130. Stumpp, T., Wilms B., & Altenbuchner J. (2000). Ein neues, L-rhamnose induzierbares expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum*, 6, 33-36.
131. Takano, E. (2006). γ -butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 287-294.
132. Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M. J., Wang, L., Li, W., ... Chater, K. F. (2003). A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 50(2), 475-486.
133. Takano, E., Kinoshita, H., Mersinias, V., Bucca, G., Hotchkiss, G., Nihira, T., ... Chater, K. (2005). A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 56(2), 465-479.
134. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
135. Tan, H., & Chater, K. F. (1993). Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. *Journal of Bacteriology*, 175(4), 933-940.
136. Taurino, C., Frattini, L., Marcone, G., Gastaldo, L., & Marinelli, F. (2011). *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 82.
137. Thykaer, J., Nielsen, J., Wohlleben, W., Weber, T., Gutknecht, M., Lantz, A. E., & Stegmann, E. (2010). Increased glycopeptide production after

- overexpression of shikimate pathway genes being part of the balhimycin biosynthetic gene cluster. *Metabolic Engineering*, 12(5), 455-461.
138. Tianhui, X., & Chiao, J. (1989). Regulation of the biosynthetic pathway of aromatic amino acids in *Nocardia mediterranei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 991(1), 6-11.
 139. Tobes, R., Ramos, J.L. (2002). AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 318-321.
 140. Traitcheva, N., Jenke-Kodama, H., He, J., Dittmann, E., & Hertweck, C. (2007). Non-colinear polyketide biosynthesis in the aureothin and neo-aureothin pathways: an evolutionary perspective. *ChemBioChem*, 8(15), 1841-1849.
 141. Truman, A. W., Kwun, M. J., Cheng, J., Yang, S. H., Suh, J., & Hong, H. (2014). Antibiotic resistance mechanisms inform discovery: identification and characterization of a novel *Amycolatopsis* strain producing ristocetin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5687-5695.
 142. Truman, A. W., Robinson, L., & Spencer, J. B. (2006). Identification of a deacetylase involved in the maturation of teicoplanin. *ChemBioChem*, 7(11), 1670-1675.
 143. Tschowri, N., Schumacher, M., Schlimpert, S., Chinnam, N., Findlay, K., Brennan, R., & Buttner, M. (2014). Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell*, 158(5), 1136-1147.
 144. Uchida, K., Jang, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Hayakawa, M., Fujita, N., & Aizawa, S. (2011). Characterization of *Actinoplanes missouriensis* spore flagella. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2559-2562.
 145. Umeyama T., , Lee P.-C., Horinouchi S. (2002). Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 419-425.
 146. Van Wageningen, A., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., ... Solenberg, P. J. (1998). Sequencing and

- analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chemistry & Biology*, 5(3), 155-162.
147. Walsh, T. R., & Howe, R. A. (2002). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 657-675.
 148. Wang, T., Bai, L., Zhu, D., Lei, X., Liu, G., Deng, Z., & You, D. (2012). Enhancing macrolide production in *Streptomyces* by coexpressing three heterologous genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(1), 5-9.
 149. Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., ... Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0 – a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W237-W243.
 150. Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, 60(1), 43-50.
 151. Williams, P. G., Asolkar, R. N., Kondratyuk, T., Pezzuto, J. M., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2007). Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of Natural Products*, 70(1), 83-88.
 152. Wittmann, M., Linne, U., Pohlmann, V., & Marahiel, M. A. (2008). Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin. *FEBS Journal*, 275(21), 5343-5354.
 153. Wolański, M., Donczew, R., Kois-Ostrowska, A., Masiewicz, P., Jakimowicz, D., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2011). The level of AdpA directly affects expression of developmental genes in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6358-6365.
 154. Wu, J., & Woodard, R. (2006). New insights into the evolutionary links relating to the 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4042-4048.

155. Xu, L., Huang, H., Wei, W., Zhong, Y., Tang, B., Yuan, H., ... Zhao, W. (2014). Complete genome sequence and comparative genomic analyses of the vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis*. *BMC Genomics*, 15(1), 363.
156. Xu, Q., Traag, B. A., Willemse, J., McMullan, D., Miller, M. D., Elsliger, M., ... Van Wezel, G. P. (2009). Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex *Actinomycetes*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25268-25279.
157. Xu, S., Yang, Y., Jin, R., Zhang, M., & Wang, H. (2006). Purification and characterization of a functionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase. *Protein Expression and Purification*, 49(2), 151-158.
158. Xu, W., Huang, J., Lin, R., Shi, J., & Cohen, S. N. (2010). Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor. *Molecular Microbiology*, 75(3), 781-791.
159. Yamamura, H., Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Ichikawa, N., Ikeda, H., Sekine, M., ... Hayakawa, M. (2012). Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431T (= NBRC 102363T). *Standards in Genomic Sciences*, 7(2), 1-17.
160. Yim, G., Kalan, L., Koteva, K., Thaker, M. N., Waglechner, N., Tang, I., & Wright, G. D. (2014). Harnessing the synthetic capabilities of glycopeptide antibiotic tailoring enzymes: characterization of the UK-68,597 biosynthetic cluster. *ChemBioChem*, 15(17), 2613-2623.
161. Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K., & Wright, G. (2013). Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *The Journal of Antibiotics*, 67(1), 31-41.
162. Yoshiyama, Y., Yazaki, T., Kanke, M., Beauchamp, D. (2000). Nephrotoxicity of teicoplanin in rats. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 53(12), 660-6.
163. Yushchuk O., Horbal L., Datsyuk J., Stegmann E., & Fedorenko V. (2016). Peculiarities of *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726

- morphology and life cycle. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, (71), 126-136.
164. Yushchuk, O., Ostash, B., Pham, T. H., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V., Truman, A. W., & Horbal, L. (2016). Characterization of the Post-Assembly Line Tailoring Processes in Teicoplanin Biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 11(8), 2254-2264.
 165. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2013, December). *bldD* cloned from *Actinoplanes teichomyceticus* blocks morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. In «*Biology: from a molecule up to the biosphere*» Abstracts of the VIII International young scientists' conference. Paper presented at VIII International young scientists' conference: "Biology: from a molecule up to the biosphere", Kharkiv (pp. 105-106). Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv national university.
 166. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2014, April). *In silico* reconstruction of putative *bld*- and *whi*-cascades analogues in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 100-101). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv.
 167. Yushchuk, O., Horbal, L., Stegmann, E., & Fedorenko, V. (2016, April). Manipulating the precursor supply to improve teicoplanin biosynthesis levels in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Topical issues of new drugs development*, Vol. 1. Paper presented at XXIII International scientific and practical conference of young scientists and students "Topical issues of new drugs development", Kharkiv (pp. 388-389). Kharkiv: NUPh.
 168. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2016, April). *ssgB* orthologue positively influences sporangia formation in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at XII International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 142-143). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv.

169. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2016, April). Negative regulators AbsB_{AT} and BldD_{AT} orchestrate the expression of putative morphogenes in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Actualni problemu biochimiji ta biotechnologiji – 2016*. Paper presented at Conference-competition of young scientists “Actualni problemu biochimiji ta biotechnologiji”, Kyiv (p. 68). Kyiv: SPD Popov D.V.
170. Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V., & Luzhetskyy, A. (2014). Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics*, 15(1), 97.
171. Zaburannyi, N. (2009). TTA Lynx: a web-based service for analysis of actinomycete genes containing rare TTA codon. *Bioinformatics*, 25(18), 2432-2433.
172. Власюк, І., Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко, В. (2017, квітень). Гетерологічна експресія гена *rrf*_{AT} в клітинах стрептоміцетів. В *Молодь та поступ біології, збірник тез*. Тези представлені на XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь та поступ біології", Львів (ст. 101). Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка.
173. Горбаль Л., Ющук О., Забуранний Н., Кобилянський А., Осташ Б., Марінеллі Ф., ... Федоренко В. (2014). Генетичний інструментарій для конструювання штамів *Actinoplanes teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, 31-35.
174. Осташ, Б., Горбаль, Л., Ющук, О., Тістечок, С., Мурин, А., & Федоренко, В. (2014). Спосіб індукції синтезу нових антибіотиків у актинобактерій. Патент України на корисну модель № 94608. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
175. Федоренко, В. О., Осташ, Б. О., Гончар, М. В., & Ребець, Ю. В. (2007). *Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів*. Львів: Видавничий центр ЛНУ.

176. Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко В. (2016, травень). Глобальні регулятори AbsB_{AT} та BldD_{AT} задіяні у регуляції морфогенезу *Actinoplanes teichomyceticus*. В *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, та біотехнології рослин і мікроорганізмів*. Тези представлені на XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», Київ (ст. 77-79). Київ: ТОВ «Алефа».
177. Ющук О., Горбаль Л., Дацюк Ю., Остап Б., Штегманн Е., Лужецький А., & Федоренко В. (2016). Глобальні механізми регуляції морфогенезу в спорангіальних актинобактерій. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, 192-96.

**ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ БІОСИНТЕЗУ ТЕЙКОПЛАНІНУ В
*ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS***

ДОДАТКИ

Додаток А

Список наукових праць здобувача:

1. Horbal, L., Kobylyansky, A., Yushchuk, O., Zaburannyi, N., Luzhetskyy, A., Ostash, B., Marinelli, F., Fedorenko, V. (2013). Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus* – producer of teicoplanin, drug of last defense. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 367-372.
2. Горбаль, Л., Ющук, О., Забуранний, Н., Кобилянський, А., Осташ, Б., Марінееллі, Ф., ... Федоренко, В. (2014). Генетичний інструментарій для конструювання штамів *Actinoplanes teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну.
3. Ostash, B., Yushchuk, O., Tistechok, S., Mutenko, H., Horbal, L., Muryn, A., Dacyuk, Y., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V. (2015). The *adpA*-like regulatory gene from *Actinoplanes teichomyceticus*: *in silico* analysis and heterologous expression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1297-1301.
4. Yushchuk, O., Horbal, L., Datsyuk, J., Stegmann, E., & Fedorenko, V. (2016). Peculiarities of *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726 morphology and life cycle. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, (71), 126-136.
5. Ющук, О., Горбаль, Л., Дацюк, Ю., Осташ, Б., Штегманн, Е., Лужецький А., & Федоренко В. (2016). Глобальні механізми регуляції морфогенезу в спорангіальних актинобактерій. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, 192-96.
6. Yushchuk, O., Ostash, B., Pham, T. H., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V., Truman, A. W., & Horbal, L. (2016). Characterization of the Post-Assembly Line Tailoring Processes in Teicoplanin Biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 11(8), 2254-2264.
7. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2013, December 3-6). *bldD* cloned from *Actinoplanes teichomyceticus* blocks morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. In «*Biology: from a molecule up to*

- the biosphere» Abstracts of the VIII International young scientists' conference.* Paper presented at VIII International young scientists' conference: "Biology: from a molecule up to the biosphere", Kharkiv (pp. 105-106). Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv national university. *Форма участі – очна.*
8. Horbal, L., Kobylansky, A., Truman, A., Yushchuk, O., Marinelli F., Ostash, B., Luzhetskyy, A., & Fedorenko, V. (2014, April 8-11). The pathway specific regulatory genes as keys to teicoplanin overproduction in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (p. 7). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна.*
 9. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2014, April 8-11). *In silico* reconstruction of putative *bld*- and *whi*-cascades analogues in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 100-101). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна.*
 10. Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко В. (2016, 20 травня). Глобальні регулятори AbsB_{AT} та BldD_{AT} задіяні у регуляції морфогенезу *Actinoplanes teichomyceticus*. В *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, та біотехнології рослин і мікроорганізмів*. Тези представлені на XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», Київ (ст. 77-79). Київ: ТОВ «Алефа». *Форма участі – заочна.*
 11. Yushchuk, O., Horbal, L., Stegmann, E., & Fedorenko, V. (2016, April 21). Manipulating the precursor supply to improve teicoplanin biosynthesis levels in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Topical issues of new drugs development, Vol. 1*. Paper presented at XXIII International scientific and practical conference of young scientists and students "Topical issues of new drugs development", Kharkiv (pp. 388-389). Kharkiv: NUPh. *Форма участі – очна.*

12. Yushchuk, O., Horbal, L., & Fedorenko, V. (2016, April 19-21). *ssgB* orthologue positively influences sporangia formation in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Youth and progress of biology book of abstracts*. Paper presented at XII International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology", Lviv (pp. 142-143). Lviv: Ivan Franko national university of Lviv. *Форма участі – очна*.
13. Yushchuk, O., & Horbal, L. (2016, May 26-27). Negative regulators AbsB_{AT} and BldD_{AT} orchestrate the expression of putative morphogenes in *Actinoplanes teichomyceticus*. In *Actualni problemu biochimiji ta biotehnologiji – 2016*. Paper presented at Conference-competition of young scientists “*Current topics in bopchemistry and biotechnology*”, Kyiv (p. 68). Kyiv: SPD Popov D.V. *Форма участі – заочна*.
14. Власюк, І., Ющук, О., Горбаль, Л., & Федоренко, В. (2017, 25-27 квітня). Гетерологічна експресія гена *rrf_{AT}* в клітинах стрептоміцетів. В *Молодь та поступ біології, збірник тез*. Тези представлені на XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь та поступ біології", Львів (ст. 101). Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка. *Форма участі – очна*.
15. Осташ, Б., Горбаль, Л., Ющук, О., Тістечок, С., Мурин, А., & Федоренко, В. (2014). Спосіб індукції синтезу нових антибіотиків у актинобактерій. Патент України на корисну модель № 94608. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.

Додаток Б

Штами мікроорганізмів, плазмід та праймери, використані в роботі

Таблиця Б.1

Штами мікроорганізмів, використані в роботі

Штами	Характеристика	Джерело
1	2	3
<i>E. coli</i> DH5α	Штам для конструювання та селекції рекомбінантних плазмід ($F^-(\phi 80d\Delta(lacZ)M15)$ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>)	MBI Fermentas
<i>E. coli</i> NovaBlue	Штам для конструювання та селекції рекомбінантних плазмід (<i>endA1 hsdR17 (r_{k12}⁻ m_{k12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺lacI^qZΔM15::Tn10] (Tet^R)</i>).	Novagen
<i>E. coli</i> ET12567 (pUB307)	Дефектний за метилазами штам, що несе трансмісивну плазмиду pUB307, яка забезпечує перенесення корезидентних плазмід (<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsd-M</i> pUB307)	Проф. К.П.Сміт, Інститут біомолекулярних досліджень, Манчестер, Великобританія
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	Дефектний за метилазами штам, що несе нетрансмісивну плазмиду pUZ8002, яка забезпечує перенесення корезидентних плазмід (<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsd-M</i> pUZ8002)	Проф. К.П.Сміт, Інститут біомолекулярних досліджень, Манчестер, Великобританія
<i>E. coli</i> BW 25113 (pIJ790)	Штам для проведення процедури ПЛР-спрямованого мутагенезу Redirect ($\Delta(araDaraB)$ 567, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, <i>lambda-rph-1</i> , $\Delta(rhaD-rhaB)$ 568, <i>hsdR514</i>), містить плазмиду pIJ790, що сконструйована на основі вектора pKD20 із термочутливим репліконом, містить гени <i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> , які забезпечують гомологічну рекомбінацію, <i>cm^r</i>	Проф. М. Бібб, Дж. Іннес Центр, Норвіч, Великобританія
<i>A. teichomyceticus</i> NRRL-B16726	Продуцент тейкопланіну та тейхоміцину, дикий тип	Колекція культур ARS
<i>S. coelicolor</i> M145	Похідний <i>S. coelicolor</i> A3(2), не містить плазмід SCP1 та SCP2	проф. А. Бехтольд, Фрайбурзький університет, ФРН

1	2	3
<i>S. coelicolor</i> M1152	Похідний <i>S. coelicolor</i> M145 із видаленими кластерами генів біосинтезу актинородину, ундецилпродигіозину та Ca-залежного антибіотика	[39]
<i>S. coelicolor</i> Sc19 ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> із плазмідом рKC1139ADPA19AT	Ця робота
<i>S. coelicolor</i> Sc3 ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> із плазмідом рSETPAmSc3	Ця робота
<i>S. coelicolor</i> Sc80 ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> із плазмідом рSETPAmSc80	Ця робота
<i>S. coelicolor</i> M1152 <i>absB</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> M1152 із плазмідом рAmabsB	Ця робота
<i>S. coelicolor</i> <i>bldD</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> M145 із плазмідом рAmbldD	Ця робота
<i>S. coelicolor</i> <i>absB</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>S. coelicolor</i> M145 із плазмідом рAmabsB	Ця робота
<i>S. griseus</i> (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948	Дикий тип, продуцент стрептоміцину	Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка
<i>S. griseus</i> Sc19 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> із плазмідом рKC1139ADPA19AT	Ця робота
<i>S. griseus</i> Sc3 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> із плазмідом рSETPAmSc3	Ця робота
<i>S. griseus</i> Sc80 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> із плазмідом рSETPAmSc80	Ця робота
<i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i>	Похідний <i>S. griseus</i> (Krainsky 1914), із нокаутом гена <i>adpA</i>	проф. Ясуо Оніші, університет Токіо, Японія
<i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> Sc19 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> із плазмідом рKC1139ADPA19AT	Ця робота
<i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> Sc3 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> із плазмідом рSETPAmSc3	Ця робота
<i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> Sc80 ⁺	Похідний <i>S. griseus</i> Δ <i>adpA</i> із плазмідом рSETPAmSc80	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> рSETPAm	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідом рSETPAm	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> рSET152	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідом рSET152	Ця робота

1	2	3
<i>A. teichomyceticus</i> pKC1139	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pKC1139	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pMT3226gusA	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pMT3226gusA	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pSETPAmgusA	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETPAmgusA	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pSETPactgusA	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETPactgusA	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pSETPcdaRgusA	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETPcdaRgusA	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pSETPwblAgusA	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETPwblAgusA	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>frr</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>frr</i> _{AT} ⁺	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei24</i> ^{*+}	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>tei24</i> ^{*+}	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei24</i> ^{*tr+}	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>tei24</i> ^{*tr+}	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>pdh</i> _{ABAL} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>pdh</i> _{ABAL} ⁺	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pSETtei14*	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETtei14*	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> pKCtei14*	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pKCtei14*	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>dahp</i> _{ABAL} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>dahp</i> _{ABAL} ⁺	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>pdt</i> _{ATE} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>pdt</i> _{ATE} ⁺	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>pdt</i> _{ABAL} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із надекспресією гена <i>pdt</i> _{ABAL} ⁺	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>bldD</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pAmblldD	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>absB</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pAmabsB	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>whiG</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pAmwhiG	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>ssgB</i> _{AT} ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pAmssgB	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>Sc19</i> ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pKC1139ADPA19AT	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>Sc3</i> ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною pSETPAmSc3	Ця робота

1	2	3
<i>A. teichomyceticus</i> Sc80 ⁺	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із плазмідною рSETPAmSc80	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei3*::aac(3)IV</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei3*</i>	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei10*::aac(3)IV</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei10*</i>	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei11*::aac(3)IV</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei11*</i>	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei30*::aac(3)IV</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei30*</i>	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> <i>tei31*::aac(3)IV</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei31*</i>	Ця робота
<i>A. teichomyceticus</i> Δ <i>tei15*</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei15*</i>	[51]
<i>A. teichomyceticus</i> Δ <i>tei16*</i>	Похідний <i>A. teichomyceticus</i> із нокаутом гена <i>tei16*</i>	[51]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Штам для експресії гетерологічних білків, <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(<i>lacI::PlacUV5::T7 gene1</i>) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs

Таблиця Б.2

Плазміди та косміди, використані в роботі

Плазміди/косміди	Характеристика	Джерело
1	2	3
pGUS	Вектор для транскрипційного злиття, що несе безпромоторний <i>gusA</i> , Am ^r , Sp ^r	[96]
pMT3226	Інтегративний вектор для експресії, що містить касету <i>gylR</i> для експресії генів, індукованої гліцерилем, Am ^r	[72]
pKC1139	Реплікативний олігокопійний вектор, що містить термочутливий pSG5 реплікон, Am ^r	[72]
pJET1.2	Комерційний вектор для клонування, Ap ^r	ThermoFisher Scientific
pUC57	Комерційний вектор для клонування, Ap ^r	MBI Fermentas
pSET152	Інтегративний вектор на основі,	[72]
pET24-a(+)	Вектор для гетерологічної експресії білків в <i>E. coli</i> , Km ^r	Novagen
pET24-b(+)	Вектор для гетерологічної експресії білків в <i>E. coli</i> , Km ^r	Novagen
pTST101	Вектор для експресії гетерологічних білків в <i>E. coli</i> у вигляді трансляційного злиття з білком MalE, Ap ^r	[130]
pMT3226gusA	Похідне pMT3226, що несе безпромоторний ген <i>gusA</i>	Ця робота
pSETPA _m	Похідне pSET152, що несе <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPA _m gusA	Похідне pSET152, що несе <i>gusA</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPA _{act} gusA	Похідне pSET152, що несе <i>gusA</i> під контролем промотора <i>actII-R4p</i>	Ця робота

1	2	3
pSETPcdaRgusA	Похідне pSET152, що несе <i>gusA</i> під контролем промотора <i>cdaRp</i>	Ця робота
pSETPwblAgusA	Похідне pSET152, що несе <i>gusA</i> під контролем промотора <i>wblAp</i>	Ця робота
pSETPAmrrf	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>frr_{AT}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
4B2	Косміда на основі Supercos1, що несе фрагмент кластера біосинтезу тейкопланіну	Доктор Е. Труман, Дж. Іннес Центр, Норвіч, Великобританія
4B2hyg	Похідне 4B2, в якому маркер стійкості до канаміцину замінений на маркер стійкості до гігроміцину	Ця робота
4B2hygtei3*::aac(3)IV	4B2hyg із нокаутом гена <i>tei3*</i>	Ця робота
4B2hygtei10*::aac(3)IV	4B2hyg із нокаутом гена <i>tei10*</i>	Ця робота
4B2hygtei11*::aac(3)IV	4B2hyg із нокаутом гена <i>tei11*</i>	Ця робота
4B2hygtei13*::aac(3)IV	4B2hyg із нокаутом гена <i>tei13*</i>	Ця робота
JB7	Косміда на основі Supercos1, що несе фрагмент кластера біосинтезу тейкопланіну	Доктор Е. Труман, Дж. Іннес Центр, Норвіч, Великобританія
JB7hyg	Похідне JB7, в якому маркер стійкості до канаміцину замінений на маркер стійкості до гігроміцину	Ця робота
JB7hygtei30*::aac(3)IV	JB7hyg із нокаутом гена <i>tei30*</i>	Ця робота
JB7hygtei31*::aac(3)IV	JB7hyg із нокаутом гена <i>tei31*</i>	Ця робота
pSETTei31*	Похідне pSET152, що несе ген <i>tei31*</i> під контролем нативного промотора	Ця робота

1	2	3
pSETPAmpdhsecABAL	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>pdh_{secABAL}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPAмtei24*	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>tei24*</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPAмtei24*tr	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>tei24*_{tr}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPAмdahpsecABAL	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>dahp_{secABAL}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETtei14*	Похідне pSET152, що несе ген <i>tei14*</i> під контролем нативного промотора	Ця робота
pKC1139tei14*	Похідне pKC1139, що несе ген <i>tei14*</i> під контролем нативного промотора	Ця робота
pSETPAмpdtATE	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>pdt_{ATE}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pSETPAмpdtABAL	Похідне pSETPAм, що несе ген <i>pdt_{ABAL}</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pETAdpAgr	Похідне pET24-b(+), що несе ген <i>adpAgr</i>	Ця робота
pETSc80	Похідне pET24-b(+), що несе ген <i>adpASc80</i>	Ця робота
pETSc3	Похідне pET24-b(+), що несе ген <i>adpASc3</i>	Ця робота
pETSc19	Похідне pET24-b(+), що несе ген <i>adpASc19</i>	Ця робота
pTST101AdpAgr	Похідне pTST101, що несе послідовність, яка кодує ДНК-зв'язувальний домен AdpAgr	Ця робота
pTST101Sc80	Похідне pTST101, що несе послідовність, яка кодує ДНК-зв'язувальний домен AdpASc80	Ця робота

1	2	3
pTST101Sc3	Похідне pTST101, що несе послідовність, яка кодує ДНК-зв'язувальний домен AdpASc3	Ця робота
pTST101Sc19	Похідне pTST101, що несе послідовність, яка кодує ДНК-зв'язувальний домен AdpASc19	Ця робота
pKC1139adpAAT19	Похідне pKC1139, що несе ген <i>adpASc19</i> під контролем нативного промотора	Ця робота
pAmSc3	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>adpASc3</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pAmSc80	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>adpASc80</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pAmbldDAT	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>bldDAT</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pETBldDAT	Похідне pET24-a(+), що несе ген <i>bldDAT</i>	Ця робота
pAmabsBAT	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>absBAT</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pAmwhiGAT	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>whiGAT</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота
pAmssgBAT	Похідне pSETPAm, що несе ген <i>ssgBAT</i> під контролем промотора <i>aac(3)IVp</i>	Ця робота

Таблиця Б.3

Характеристика праймерів, використаних в роботі

Назва	Послідовність, 5'-3'	Призначення
1	2	3
GusAEVForw GusAEIRev	TTTTTGATATCTTATTGGCACTAGTCGAG TTTTTGAATTCGTAATGCTTATCACTGCTT	клонування <i>gusA</i>
aacPF aacPR	TTGATATCGACATTGCACTCCAC TTGGATCCGTTGGATACACCAAG	клонування <i>aac3(IV)p</i>
actII-R4Forw actII-R4Rev	TTTTGGTACCATCGGTGATTACATGGA TTTCTAGAGCTCGGATTCACGGTC	клонування <i>actII-R4p</i>
cdaRForw cdaRRev	TTTTCTAGACAACCTGGACGCCGA TTTGGTACCGAAGATCCATGACCTC	клонування <i>cdaRp</i>
wblAForw wblARev	TTTGGTACCTGCGCACTCCAGTCGG TTTTCTAGAGCGCTTCTTTGGCATGG	клонування <i>wblAp</i>
rrfAT_EV_F rrfAT_ERI_R	TTTGATATCGGAGGAAGATCTCGCCGTGATCG TTTGAATTCCGCGCGCTAGTGCGTCAGA	клонування <i>frr_{AT}</i>
tei10*DelRev tei10*DelRev	CGGCCGACGCCGGAGCCTACCGAATGGGG ATGCGAGATGATTCCGGGGATCCGTCGACC CGCCGCCCACCGGTGCGGGCCGACAGC CGGTGCGGTTTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ампліфікація касети для руйнування <i>tei10*</i>
tei3*DelForw tei3*DelRev	TCCCGCCATCGACGCCGTATCACGCCTGGA GGTTACGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC CAGCCCGCGGGGCGGTGACGGATCCACCG GCTCGCCTTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ампліфікація касети для руйнування <i>tei3*</i>
Am_F Am_R	CGGGGTCTGACGCTCAGTGGA AATCAGCGCGACCTTGCCCC	верифікація плазмід із маркером стійкості до апраміцину
tei11RedR tei11RedF	GCGGGTTTCGCTGGAGGTGCAGGAGAGC GTGAAGGAGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC CGTGGCCGGGCTCGCCGGCAGCGGCTCC GCCGCCGCTTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ампліфікація касети для руйнування <i>tei11*</i>

1	2	3
tei13*Del Forw tei13*del Rev	CGATGAGCAGGGAGGGAATCCCCGATG GGCTACGACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC CGGCAACCGCGTCGGTCCGGATCCCGGCG ACACCCGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ампліфікація касети для руйнування <i>tei13*</i>
tei30*Del Forw tei30*Del Rev	TCCGTCGGCCGTCCGGAGCGGCGGAGG GGGAGAGGAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC TCCGTCGGCCGTCCGGAGCGGCGGAGGG GGAGAGGAATGATTCCGGGGATCCGTCGAC C	ампліфікація касети для руйнування <i>tei30*</i>
311 312	GACGGAGGTCCAGCAGGGCAC CACCTGGCATGTCGGTCGCA	клонування <i>tei31*</i>
tei5_RT_ F tei5_RT_ R	GGCGACCTGCGACTTCCTC GCGCCCATGACGAACGCGG	виявлення реверс- транскрипту <i>tei5</i>
tei2_RT_ F tei2_RT_ R	CGGGTCCGCGTTCTCGTCC CGCCTACAGCAGGCCACCT	виявлення реверс- транскрипту <i>tei2</i>
tei1_RT_ F tei1_RT_ R	GTGCCGATGGTGCCGATCG CAGGGGCGCTCGGTGAAGGC	виявлення реверс- транскрипту <i>tei1</i>
teiA_RT_ F teiA_RT_ R	CTTAGCCCCGGCACTGGTGG GCCGGATCCACCGGGACGAA	виявлення реверс- транскрипту <i>teiA</i>
tei3*_RT_ F tei3*_RT_ R	GGCCAAGATGGTGCAGGCG TTGACCTCCTCGGCGCCGG	виявлення реверс- транскрипту <i>tei3*</i>
tei4*_RT_ F tei4*_RT_ R	GGCCTTGGTGGACTCCTCC AGCGCGACCGCACCGGGACG	виявлення реверс- транскрипту <i>tei4*</i>
tei5*_RT_ F tei5*_RT_ R	ACGCCATCGAGGCGCTCGGC GCCCCATGACGAACGCGGCG	виявлення реверс- транскрипту <i>tei5*</i>
tei8*_RT_ F tei8*_RT_ R	CTCGGTCACCGGGGTGATC TGTCGCTCAGCGGGATGTA	виявлення реверс- транскрипту <i>tei8*</i>
tei12*_R T_F	ATCCGGCCCCACCACCCTGAC	виявлення

1	2	3
tei12*_R T_R	CGGTCGGGCAGGTCGTTGTA	реверс- транскрипту <i>tei12*</i>
tei13*_R T_F tei13*_R T_R	TCGGCGATCCGGCGGGCTGG 2 CGGCTATCGTCCGCAGCCAG	виявления реверс- транскрипту <i>tei13*</i>
tei14*_R T_F tei14*_R T_R	TACCAGGGGTTGGGGGAGCG GCGGCGCTGAGCCATTCCT	виявления реверс- транскрипту <i>tei14*</i>
tei15*_R T_F tei15*_R T_R	CGGTGACCGGTATCTCGCCG TGAGCAGCCGATTGCGGACG	виявления реверс- транскрипту <i>tei15*</i>
tei16*_R T_F tei16*_R T_R	TGGGCGAGCTGAGCCAGGA AGGTGACCACGGCCATCGGA	виявления реверс- транскрипту <i>tei16*</i>
tei17*_R T_F tei17*_R T_R	CGTGACGTCGACCGGCTTCC CGCCGAAGAGGCTGTTGACCA	виявления реверс- транскрипту <i>tei17*</i>
tei24*_RT _F tei24*_RT _R	TGTTCGCCGGCAAGACCTGG TGACGTCACGGACCCCCTGG	виявления реверс- транскрипту <i>tei24*</i>
tei25*_RT _F tei25*_RT _R	GTCCGGCTCGCCGTGCTCGTC TTCATCAGCGCCGACAACCG	виявления реверс- транскрипту <i>tei25*</i>
tei27*_RT _F tei27*_RT _R	CACCCGCACCTACACCGTGC GTCCACCTCCACCAGGGCCA	виявления реверс- транскрипту <i>tei27*</i>
tei29*_RT _F tei29*_RT _R	GGACATCCGCAACGAGTTC CAGGATGCCCTTCACCAC	виявления реверс- транскрипту <i>tei29*</i>
tei30*_RT_ F tei30*_RT_ R	TGCTCGGCCCGGTCCCGCTG AGCGGTAGCCGTCGAGCAGC	виявления реверс- транскрипту <i>tei30*</i>

1	2	3
tei31*_R T_F tei31*_R T_R 1	CCAGCCCGGCGCATGTCGG GCAGGCGGCACAGCGCATC	виявления реверс- транскрипту <i>tei31*</i>
teiB- C_RT_F teiB- C_RT_R	GCGCGCGAGAGGTGTTCCAG GTCCACCGGGCCGTCGAGAT	виявления реверс- транскрипту <i>teiB-C</i>
teiD- 1*_RT_F teiD- 1*_RT_R	TGCCGGTGTCCGAGGCGATA GCCGAGACAATCCTGCCGGG	виявления реверс- транскрипту <i>teiD-1*</i>
tei2*- 3*_RT_F tei2*- 3*_RT_R	TCGACCGGCTGGACGAGCAT CCAGGCATACAGCACCGCCG	виявления реверс- транскрипту <i>tei2*-3*</i>
tei5*- 6*_RT_F tei5*- 6*_RT_R	GATTCCGGCCCTGGCACACC GTCCGGTGACCAGCCACTGC	виявления реверс- транскрипту <i>tei5*-6*</i>
tei19*- 20*_RT_ F tei19*- 20*_RT_ R	CCGCCGGAGGAGATGGACGA ATGGCGTTGAGCACGTCGGG	виявления реверс- транскрипту <i>tei19*-20*</i>
tei20*- 21*_RT_ F tei20*- 21*_RT_ R	TCGGTCCGGGCGATCAAGGA GTGGCCAGCTCACCCACGAC	виявления реверс- транскрипту <i>tei20*-21*</i>
tei22*- 23*_RT_ F tei22*- 23*_RT_ R	GGTCGGCGCGAACACCATCA GCGAACGAGATCGCCTCGGG	виявления реверс- транскрипту <i>tei22*-23*</i>
tei23*- 24*_RT_ F tei23*- 24*_RT_ R	GCGGTACTTCCACCCGGACG CGACGAGCGCGAGATCCACC	виявления реверс- транскрипту <i>tei23*-24*</i>

1	2	3
pdhbal_F pdhbal_R	TTTGATATCGGAGGGCGCCGGTGACCATCGAGAAA GCGCT TTTGAATTCCTAACGCCCCGGGGAACCC	клонування <i>pdh_{secABAL}</i>
tei24_F tei24_R tei24tr_R	TTTGATATCGGAGGGTCGACGTGCGCACTCTTCT TTTGAATTCGCTCAGCGGTGCGGCCCTCG TTTGAATTCTCACGCCCCGGCGGGCGGCCGGGT	клонування <i>tei24*</i> <i>tei24*_{tr}</i>
dahpbal_F dahpbal_R	TTTGATATCGGAGGCCGCGATGACCCACACCGT TTTGAATTCATCAGCTTGCTTGCTTGCCG	клонування <i>dahp_{secABAL}</i>
tei14F tei14R	TTTGAATTCGATATCGATCCGGACCGACGCGGTTG TTTCTAGATGAGCAGGGCATAACAGGCCG	клонування <i>tei14*</i>
pdtATE_F pdtATE_R	TTTGATATCGGAGGGGCGCAATGCCCGGAACGCC TTTGAATTCGCACGGAAAGCCTCGGTG	клонування <i>pdt_{ATE}</i>
pdtBAL_F pdtBAL_R	TTTGATATCGGAGGACCCATATGCGGCCCCGCTAG TTTGAATTCTGGCGCTCACCTGCCGGTG	клонування <i>pdt_{ABAL}</i>
tei31REDF tei31REDR	GAAGGCACTCCAGCGGTCCTTGGGAGGCACATTCG GGTGATTCCCGGGGATCCGTCGACC CCGCCTGGCGGGTACACCTGGCATGTGCGTGCAC ATCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ампліфікація касети для руйнування <i>tei31*</i>
AdpA80E VForw AdpA80E IRev	TTTGATATCGGAGGAAGATCTCGCCATGCCGATG TTTGAATTCACCGCGCGCTAGTGCGTCAC	клонування <i>adpA_{AT80}</i>
AdpA3E VForw AdpA3EI Rev	TTTGATATCGGAGGCCATCGTGCGCAAGAATC TTTGAATTCTTTGATCCATGGAATCCTCAAG	клонування <i>adpA_{AT3}</i>
absBActi Forw absBActi Rev	TTTGATATCGGAGGTATCGCATGATTGACAAG TTTGAATTCTCACTCGGGCTTGTCGTCGC	клонування <i>absB_{AT}</i>
whiG_F whiG_R	TTTGATATCGGAGGAACGACATGACCAGCACCGT TTTGAATTCCGGTCGATCAGGCCGCGGTC	клонування <i>whiG_{AT}</i>
bldD_F bldD_R	TTTGATATCGGAGGGTCCGAATGCCGTCTGAGTA AAAGAATTCTCTTCTTTCTTTGGCAGCC	клонування <i>bldD_{AT}</i>

1	2	3
ssgB_F	TTTGATATCGGAGGTCTGTCATGAGTACCA	Клонування
ssgB_R	TTCG TTTGAATTCTCACCGGCCGGCCAGCAGCC	<i>ssgB_{AT}</i>
BldDexp_F	TTTCATATGCCGTCTGAGTACGCGAA	Клонування
BldDexp_R	TTTGCGGCCGCGCTGGCGAAGAACGCCCCGCG	<i>bldD_{AT}</i> для білкової експресії
bldD_RT_F	AAGTCCAACGGCCGGTGGA	виявлення
bldD_RT_R	TTGTAGTCGCCACGCTGCT	реверс-транскрипту <i>bldD_{AT}</i>
absB_RT_F	CACGCCCAGTCCGAGCGCC	виявлення
absB_RT_R	GCACGCGCTCGCCGACGTGG	реверс-транскрипту <i>absB_{AT}</i>
sigH_RT_F	CGGCGCCGGTGTCGGCGACC	виявлення
sigH_RT_R	CACGCCATCGCGGCCTGGC	реверс-транскрипту <i>sigH_{AT}</i>
whiG_RT_F	GGCGCCCTGCTGGACGAGC	виявлення
whiG_RT_R	GATCTGCTCGCGGCGCAGC	реверс-транскрипту <i>whiG_{AT}</i>
whiB_RT_F	CGCAGGTTGAAGGGGTAGA	виявлення
whiB_RT_R	GACCCGCCGCTTCAGCTTG	реверс-транскрипту <i>whiB_{AT}</i>
ramC_RT_F	GGGCTCTGGTGCGCCGCTAC	виявлення
ramC_RT_R	GACGCCGGTCGTGCCCGAG	реверс-транскрипту <i>ramC_{AT}</i>
bldN_RT_F	ACTGGCCGAGGATCTCACC	виявлення
bldN_RT_R	TGCTGCTCCGGGTTGAGTT	реверс-транскрипту <i>bldN_{AT}</i>
Sc19_RT_F	CTGCACCGGCGCGTTCACG	виявлення реверс-транскрипту <i>adpA_{AT19}</i>

1	2	3
Sc19_RT _R	GGGCCTGCCCCGCCGTCGCG	виявлення реверс- транскрипту <i>adpA_{AT19}</i>
Sc80_RT _F	GCTCGCGTGATGTCCATC	виявлення реверс- транскрипту <i>adpA_{AT80}</i>
Sc80_RT _R	GCCGTCCCCGGTGCGGCTGC	виявлення реверс- транскрипту <i>adpA_{AT80}</i>
Sc3_RT_ F	CGCGCGGCGCTGCACTCC	виявлення реверс- транскрипту
Sc3_RT_ R	GCCGCCGCGTTGGCCACCT	<i>adpA_{AT3}</i>
adpAsc_ RT_R	CCGCCACCACGCACTGGATG	виявлення реверс- транскрипту
adpAsc_ RT_R	GGCGCCGATCTCCTCCGGTA	<i>adpAsc</i>
rpoB_RT _F	GCGCCGAGGTCGACTACATGG	виявлення реверс- транскрипту
rpoB_RT _R	TCGAGCGGCGGAACCTTGTGC	<i>rpoB_{AT}</i>
whiG_PR OM_F whiG_PR OM_R	AGCCAGTGGCGATAAGG CCGTACCCCGGCGGAAAC AGCCAGTGGCGATAAG GGCGTCACGGGAGCGGTGT	Ампліфікація промотора <i>whiG_{AT}</i>
sigH_PR OM_F sigH_PR OM_R	AGCCAGTGGCGATAAGG CCCCGTTTCTGCCACAGC AGCCAGTGGCGATAAGC CGGCCCGATCGGTGCTCG	Ампліфікація промотора <i>sigH_{AT}</i>
bldN_PR OM_F BldN_PR OM_R	AGCCAGTGGCGATAAGGC AACGGACAGGCCGTCCGT AGCCAGTGGCGATAAGTT GGTGATCATTCCGTCCAC	Ампліфікація промотора <i>bldN_{AT}</i>
bldD_PR OM_F bldD_PR OM_R	AGCCAGTGGCGATAAGTC ACGGGACGGGTCGTAA AGCCAGTGGCGATAAGCG AATGGAGCGCAGGCGAG	Ампліфікація промотора <i>bldD_{AT}</i>

1	2	3
tei15_PrF _Cy5	AGCCAGTGGCGATAAGAGCCGACATCCGGG AGATC	Ампліфіка-ція
tei15_PrR _Cy5	AGCCAGTGGCGATAAGAGTGAAGTGAATGATCTC CATCTCC	промотора <i>tei15*</i>
strR_PrF _Cy5	AGCCAGTGGCGATAAGGTGCTCCTCGCGTG GTCTTG	<i>strR</i> Ампліфіка-ція
strR_PrR _Cy5	AGCCAGTGGCGATAAGGCTGTTCCCTGAAA TATGCT	промотора <i>strR</i>
Cy5_Pr	AGCCAGTGGCGATAAG	Су5-мічений праймер

Додаток В

Склад живильних середовищ, використаних в роботі

ММ [1] (мінімальне середовище, г/л): L-аспарагін (Reanal) 0.5; K_2HPO_4 (Реахим) 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Хімреактив) 0.2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) 0.01; глюкоза (Difco) 10; агар (Conda) 10; pH 7.2.

Середовище Бенета [2] (г/л): глюкоза (Difco) 10; пептон (Difco) 1; дріжджовий екстракт 1 (Sigma Aldrich); триптон (Difco) 2; агар (Conda) 20.

СМ [1] (соєво-манітолове середовище, г/л): соєве борошно (Henzel) 20; NaCl (Хімреактив) 5; манітол (Sigma Aldrich) 20; агар (Conda) 20; pH 7.2.

R5 [1] (г/л): сахароза (Sigma Aldrich) 10; K_2SO_4 (Реахим) 0.25; $MgCl \cdot 6H_2O$ (Sigma Aldrich) 10.1; глюкоза (Difco) 10; гідролізат казеїну (Difco) 0.1; агар (Conda) 17; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 5; KH_2PO_4 (Реахим) 0.5% 2.5 мл; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Хімреактив) 3.68% 20 мл; L-пролін (Reanal) 20% 3.5 мл; TES (Sigma Aldrich) 5.73% 25 мл; розчин мікроелементів 0.5 мл; NaOH (Хімреактив) 1Н 1.2 мл; pH 7.2.

МҮМ [3] (г/л): дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 4; мальтозний екстракт (Sigma Aldrich) 10; мальтоза (Promega) 4; агар (Conda) 20; pH 7.2

ISP2 [4] (г/л): дріжджовий екстракт (Difco. Sigma Aldrich) 4; мальтозний екстракт (Difco) 10; декстроза/глюкоза (Difco) 4; агар (Conda) 20; pH 7.2.

ISP3 [5] (г/л): вівсяне толокно (Козуб) 20; агар (Conda) 18; pH 7.2.

ISP4 [5] (г/л): розчинний крохмаль (Difco) 10; K_2HPO_4 (Реахим) 1; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Хімреактив) 1; NaCl (Хімреактив) 1; $(NH_4)_2SO_4$ (Merck) 2; $CaCO_3$ 2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) 0.001; $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ (Хімреактив) 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Хімреактив) 0.001; агар (Conda) 20; pH 7.2.

ISP5 [5] (г/л): L-аспарагін (Reanal) 1; гліцерол (Merck) 10; K_2HPO_4 (Реахим) 1; $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) 0.001; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Хімреактив) 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Хімреактив) 0.001; агар (Conda) 20; pH 7.2.

ISP6 [5] (г/л): м'ясний екстракт (Difco) 15; пептон (Sigma Aldrich) 5; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 1; $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ (Реахим) 0.5; K_2HPO_4 (Реахим) 1; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Merck) 0.08; агар (Conda) 15; pH 6.7

ISP7 [6] (г/л): L-аспарагін (Reanal) 1; L-тирозин (Reanal) 0.5; K_2HPO_4 (Реахим) 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Хімреактив) 0.5; NaCl (Merck) 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 1.36; $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Реахим) 0.027; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0.04; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0.025; ZnCl_2 (Хімреактив) 0.02; кислота борна (Sigma Aldrich) $2.85 \cdot 10^{-3}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich) $1.8 \cdot 10^{-3}$; $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Sigma Aldrich) $1.77 \cdot 10^{-3}$; pH 6.3.

TSB/TSA [1] (г/л): казеїновий пептон (Difco) 17; соєвий пептон (Conda) 3; NaCl (Хімреактив) 5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Реахим) 2.5; глюкоза (Sigma Aldrich) 2.5; pH 7.3. + 20 г агару (Conda) для TSA.

YMPG [7] (г/л): глюкоза (Sigma Aldrich) 10; мальтозний екстракт (Sigma Aldrich) 10; пептон (Difco) 1; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 4; $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 2; pH – 7.2.

TM1 [8] (г/л): дектроза (Sigma Aldrich) 10; мальтозний екстракт (Sigma Aldrich) 30; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 2.5; соєве борошно (Sigma Aldrich) 15; CaCO_3 (Sigma Aldrich) 4.

E25 [8] (г/л): дектроза (Sigma Aldrich) 25; м'ясний екстракт (Difco) 4; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) 1; соєве борошно (Henzel) 10; пептон (Sigma Aldrich) 4; NaCl (Sigma Aldrich) 2.5.

Список використаних в додатку В літературних джерел:

1. Kieser, T., & Bibb, M. J. (2004). *Practical streptomyces genetics*. Norwich, England: John Innes Centre.
2. Jones, K. L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology*, 57(2), 141-145.
3. Stuttard, C. (1982). Temperate phages of *Streptomyces venezuelae*: lysogeny and host specificity shown by phages SV1 and SV2. *Microbiology*, 128(1), 115-121.

4. Salfinger, Y., & Tortorello, M. L. (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5th ed.). Washington, DC, WA: APHA Press.
5. Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
6. Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, FL: CRC Press.
7. Su, W., & Beuchat, L. R. (1984). Combined effect of growth medium, age of cells and phase of sporulation on heat resistance and recovery of *Hansenula anomala*. *Mycopathologia*, 87(3), 129-134.
8. Taurino, C., Frattini, L., Marccone, G., Gastaldo, L., & Marinelli, F. (2011). *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 82.