

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»**

ЮЩУК ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ



УДК 238.218.60

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

03.00.22 – молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор
Федоренко Віктор Олександрович,
Львівський національний університет імені Івана Франка,
завідувач кафедри генетики та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Панчук Ірина Ігорівна,
Чернівецький національний університет імені Юрія
Федьковича, професор кафедри молекулярної генетики та
біотехнології

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Дмитрук Костянтин Васильович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач лабораторії метаболічної інженерії

Захист дисертації відбудеться «14» грудня 2017 р. о 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Факс: (044) 434 3777. Адреса електронної пошти: d26.254.01@ukr.net.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано _____ листопада 2017 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Г.Я. Баєр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пошук нових антибіотиків, як і даліше 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 (Bérdu, 2012). Клас *Actinobacteria* – це велика група грам-позитивних бактерій з Г-Ц багатими геномами (Stackebrandt et al., 1997). Для них характерне велике різноманіття життєвих форм: від простих кокоїдних або паличкоподібних, до складних міцеліальних (Miyadoh, 1997). Вторинний метаболізм та складна морфологічна диференціація актинобактерій є спряженими процесами і, принаймні у стрептоміцетів, контролюються спільними регуляторними механізмами (McCormick, Flardh, 2012).

Впродовж багатьох років основними об'єктами досліджень та джерелом антибіотиків були представники родини *Streptomycetaceae*. Проте, останнім часом все більше нових антибіотичних сполук походять із актинобактерій інших родів, зокрема, *Micromonosporaceae* та *Pseudonocardiaceae*, які значно відрізняються від стрептоміцетів (Spohn et al., 2014; Williams et al., 2007; Yim et al., 2014).

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 штамми *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) (Mattox et al., 2016; Smith et al., 2009; Smith et al., 2015), тейкопланін та ванкоміцин і надалі залишаються основними медичними антибіотиками цього класу. Тейкопланін менш токсичний ніж ванкоміцин та характеризується кращою фармакокінетикою (Yoshiyama et al., 2000). Як ліпоглікопептидна сполука, він у 50-100 разів більш ліпофільний ніж ванкоміцин і володіє високою тканинною проникністю та здатністю утворювати водорозчинні солі з 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 (Jung et al., 2008, 2009). Нещодавні дослідження (Horbal et al., 2012) 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* (Horbal et al., 2014) відкриває широке поле для нових спроб конструювання штамів-надпродуцентів тейкопланіну.

Хоча кластер генів біосинтезу тейкопланіну секвеновано (Li et al., 2004), 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 глікозилування та ацетилювання аглікону тейкопланіну (АГТ);
- 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. У роботі були застосовані наступні методи дослідження: мікробіологічні (виращування 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 зі зворотною транскрипцією), біоінформатичні (аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, анотація генів, філогенетичний аналіз).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше *in vivo* досліджено функції генів *tei3**, *tei10**, *tei11**, *tei13** та *tei30**, продукти яких задіяні у реакціях глікозилювання та ацилювання АГТ. 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, причому *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*.

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. Волебенем (Тюбінгенський університет, Німеччина) та проф. Ф. Марінеллі (Університет Інзубрії, Італія), з якими автор має спільні публікації.

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 «Tropical 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).

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 та проілюстровано 66 рисунками, та 12 таблицями.

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.

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 pSETPAm можна використати для інших видів і штамів *Actinoplanes*. Виявлені і вивчені у роботі гени, продукти яких задіяні в процесах модифікації АГТ, 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.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 15 наукових робіт, з яких 2 статті у провідних фахових реферованих виданнях, 3 статті в зарубіжних наукових виданнях, 1 патент України на корисну модель, 1 стаття у збірнику наукових праць та 8 тез доповідей.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто сучасні дані щодо глікопептидних антибіотиків, їх класифікації, механізмів дії та резистентності, шлях-специфічної регуляції біосинтезу. Описано особливості структури тейкопланіну. Також, висвітлено механізми глобальної регуляції морфогенезу та біосинтезу антибіотиків, відомі для стрептоміцетів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано штами *Escherichia coli* DH5a, ET12567 (pUZ8002), BL21 (DE3), а також штами актиноміцетів *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL B-16726, *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces griseus* Δ adpA та їх похідні, отримані у цій роботі. В експериментах з інактивації та надекспресії генів було використано плазміди: pKC1139, pSET152, pMT3226 (Kaiser, 2000); pUC57, pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific); pGUS (Myronovskyi et al., 2011); pET24-a-b (Novagen), pTST101 (Stumpp et al., 2000).

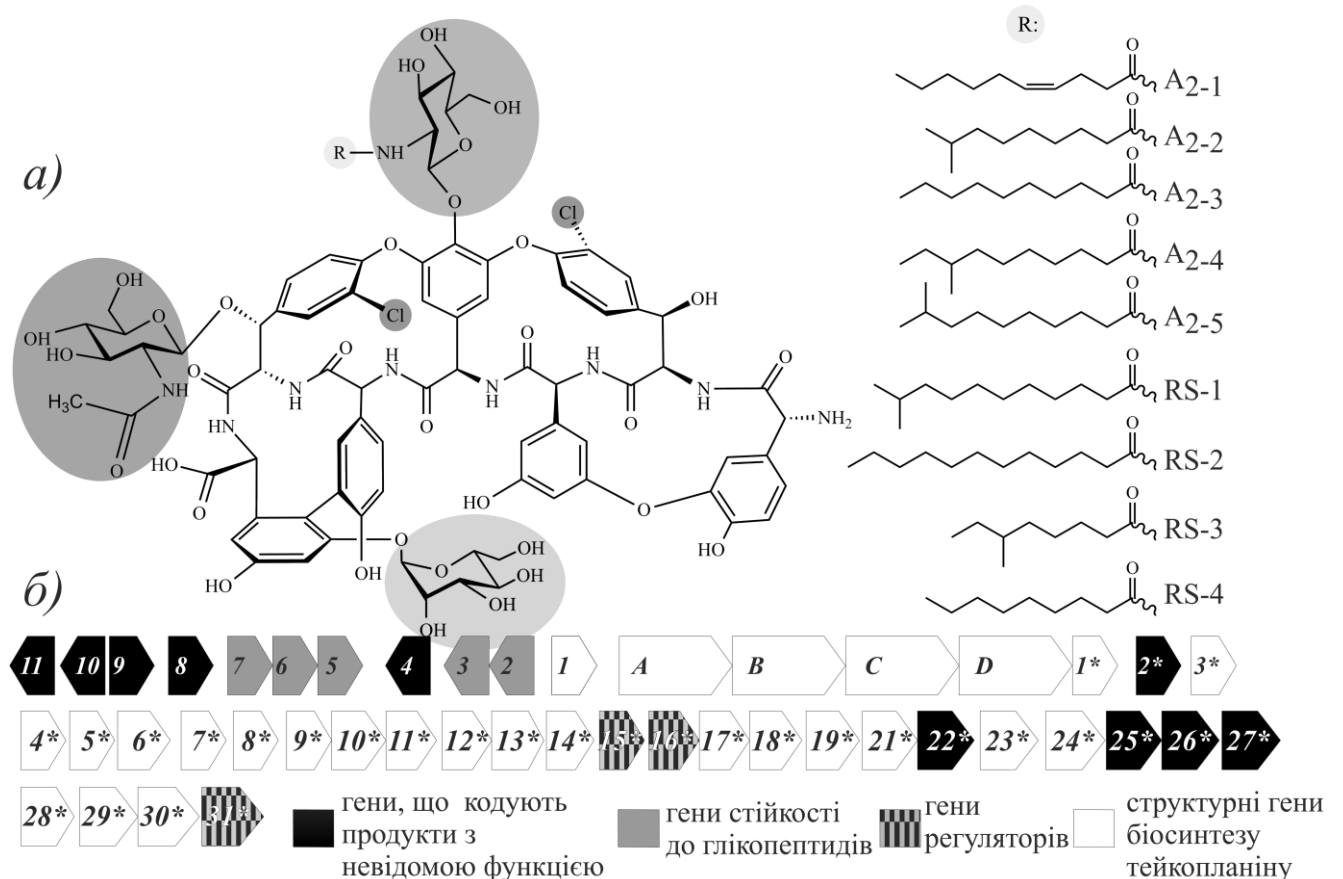


Рис.1. Хімічна структура тейкопланіну (а), відтінками сірого показано залишки N-ацетил-глюкозаміну, D-глюкози та D-манози відповідно, атоми хлору та місце приєднання бічних аліфатичних ланцюгів; б) організація кластера генів біосинтезу тейкопланіну *A. teichomyceticus*.

Для вирощування штамів актиноміцетів і визначення продукції антибіотиків використовували рідкі живильні середовища: TSB (Kaiser, 2000); TM1, E25 (Taurino et al., 2011). Для аналізу росту та морфології різних штамів актиноміцетів використовували агаризовані середовища: ISP2 (Salfinger et al., 2015); ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 (Shirling et al., 1966); ISP7 (Atlas, 2009); CM, MM, R5 (Kaiser, 2000); MYM (Stuttard, 1982), YMPG (Su et al., 1984).

Трансформацію та електропорацію клітин *E. coli* здійснювали згідно стандартних методик (Green, Sambrock, 2012). Кон'югаційні схрещування *Escherichia-Streptomyces* та *Escherichia-Actinoplanes* проводили, як описано (Ha et al., 2008; Kaiser, 2000). Виділення та аналіз сумарної та плазмідної ДНК, ферментативну обробку ДНК, ампліфікацію генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та їх субклонування здійснювали за стандартними методиками (Green, Sambrock, 2012). Виділення сумарної РНК проводили за модифікованим методом Кірбі, кДНК синтезували з використанням комерційних наборів згідно з рекомендаціями виробника. Культивування *A. teichomyceticus* для кількісного та якісного аналізу тейкопланіну та сам аналіз проводили, як описано (Kaiser, 2000). Гетерологічну експресію білків, їх подальше очищення та дослідження зміни електрофоретичної рухливості молекул ДНК в присутності цих білків виконували, як описано (Makitrynskyu et al., 2013; Chng et al., 2008). Сканувальну електронну мікроскопію виконували з напиленням зразків міддю на мікроскопі JSM-T220a SEM (Jeol).

Для біоінформатичних аналізів використовували Geneious 4.8.5 (Kearse et al., 2012), Mega 6 (Tamura et al., 2012), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створення системи для надекспресії генів в *A. teichomyceticus*. Досліджено активність гетерологічних промоторів із *S. coelicolor*: *cdaRp* – промотора регуляторного гена біосинтезу Са-залежного антибіотика *cdaR*; *actII-R4p* – промотора гена шлях-специфічного регулятора біосинтезу актинородину *actII-R4*; *wblAp* – промотора гена глобального регулятора *wblA* (Ryding et al., 2002; Fowler-Goldsworthy et al., 2011; Arias et al., 1999), а також промотора *aac(3)IVp* гена стійкості до апраміцину з *Klebsiella pneumoniae* в *A. teichomyceticus*. Виявлено, що активність гетерологічних промоторів (опосередкована глюкуронідазною активністю) *cdaRp* та *wblAp* є невеликою. Від цих результатів сильно відрізнялася активність *actII-R4p*, що була у десять раз більшою ніж у промоторів *cdaRp* та *wblAp*. Активність промотора *aac(3)IVp* приблизно в 2-3 рази вища, ніж активність *cdaRp* та *wblAp*, хоча і нижча ніж активність *actII-R4p*. На базі інтегративного вектора pSET152 створено платформу для експресії генів у *A. teichomyceticus*, в якій бажаний ген може бути клонованим під контроль *aac(3)IVp* – вектор pSETPAm. Ефективність створеної платформи показано на прикладі надекспресії гена фактора рециклінгу рибосом *frr*_{AT}. Рекомбінантний штам *A. teichomyceticus*

pSETPAm *frr*_{AT} продукували у 8 разів більше тейкопланіну у порівнянні із штамом дикого типу.

Роль генів *tei3, *tei10**, *tei11**, *tei13** та *tei30** у біосинтезі тейкопланіну.** У кластері генів біосинтезу тейкопланіну присутні три гени, що кодують глікозилтрансферази – *tei1*, *tei3** та *tei10** (рис.1, б, Li et al., 2004). У роботі створено мутантів *A. teichomyceticus* за генами *tei3** та *tei10** та проаналізовано похідні тейкопланіну, що продукувалися мутантними штамми за допомогою ВЕРХ із мас-спектроскопією та ВЕРХ із тандемною мас-спектроскопією.

Мутанти *A. teichomyceticus* *tei10*::aac(3)IV* та *tei3*::aac(3)IV* не продукували нормальний комплекс тейкопланіну. ВЕРХ-МС аналіз культуральних екстрактів мутанта за геном *tei3** виявив дві нові сполуки із молекулярними масами 1716 та 1730 Да (рис.2, а), що відповідають деманозильованому похідним тейкопланіну із приєднаними С10 та С11 бічними ацильними ланцюгами.

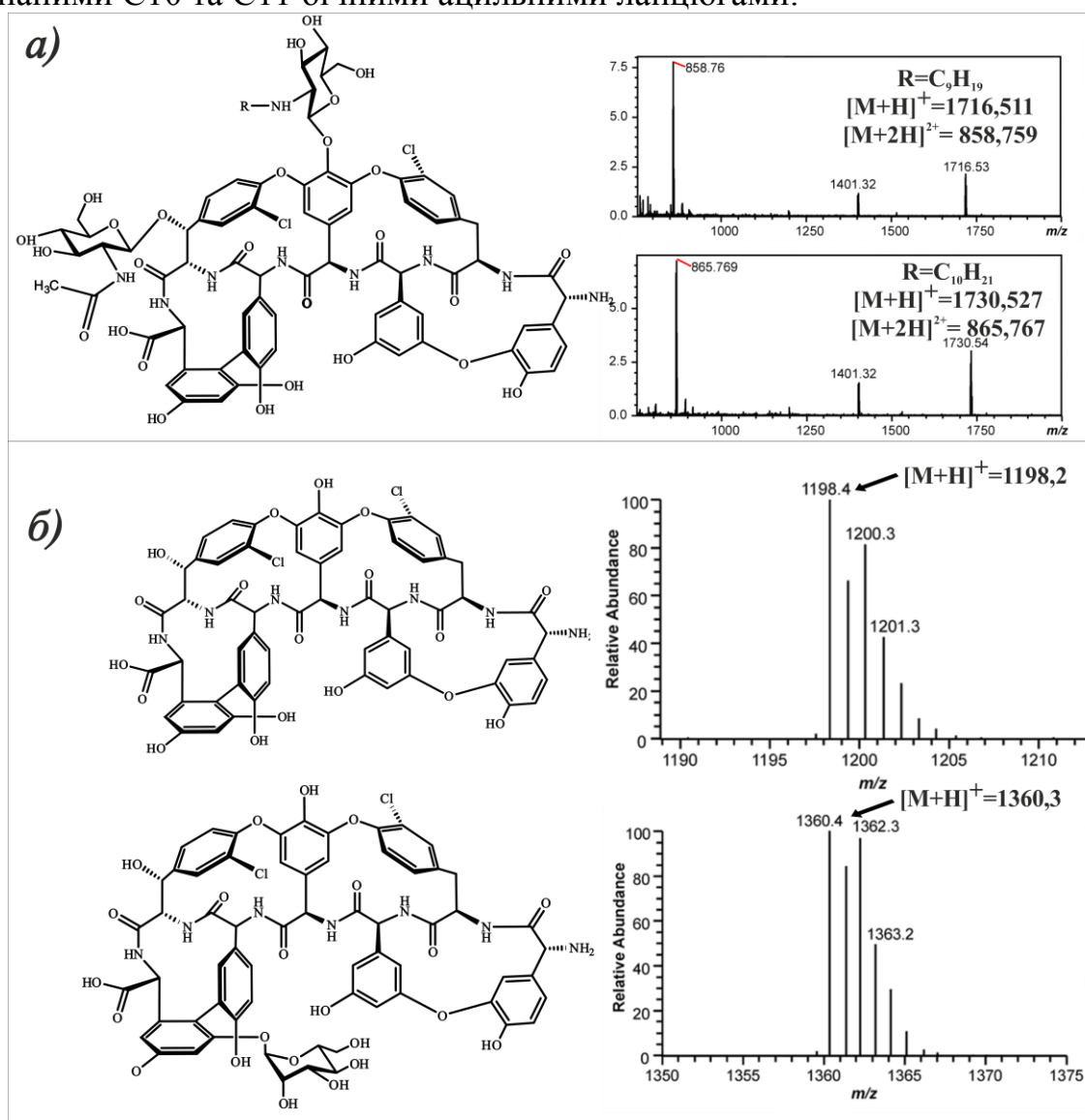


Рис.2. а) структурна формула деманозильованих похідних тейкопланіну, що продукувалися штамом *A. teichomyceticus* *tei3*::aac(3)IV* та відповідні МС профілі, похідні відрізняються довжиною бічного ланцюга (R); б) структурні формули сполук, що продукуються штамом *A. teichomyceticus* *tei10*::aac(3)IV* та відповідають АГТ (1198,2 КДа), та манозильованому АГТ (1360,3 КДа), та їх МС-профілі.

Мутант *tei3*::aac(3)IV* не продукував інших частково глікозильованих похідних тейкопланіну. Це вказує на те, що інші дві глікозилтрансферази (*tei1* та *tei10**) здатні високоспецифічно розпізнавати як субстрат неманозильований АГТ. Також, присутність похідних із масами 1716 та 1730 Да свідчить, що ацетилтрансфераза *Tei11** розпізнає як субстрат неманозильований АГТ. У свою чергу, результати ВЕРХ-МС аналізу екстрактів *A. teichomyceticus tei10*::aac(3)IV*, показали продукцію варіанту тейкопланіну із молекулярною масою 1360 Да. Така молекулярна маса відповідає манозильованому АГТ (рис.2., б). Присутня також невелика кількість сполуки із молекулярною масою 1198 Да, що відповідає АГТ (рис.2, б). Отже, глікозилтрансферази *Tei10** та *Tei1* функціонують одна за одною у процесі біосинтезу тейкопланіну.

Тейкопланін, як ліпоглікопептидний антибіотик, несе бічний аліфатичний ланцюг (рис.1, а). Приєднання цього ланцюга ймовірно здійснюється ацетилтрансферазою *Tei11**, для якої ацетилтрансферазна активність показана *in vitro*. Ми дослідили роль гена *tei11** в біосинтезу тейкопланіну *in vivo*, створивши мутант *A. teichomyceticus tei11*::aac(3)IV*. ВЕРХ-МС аналіз культуральних екстрактів *tei11*::aac(3)IV* показав присутність двох нових сполук із молекулярними масами 1521 та 1724 кДа, що відповідають похідним тейкопланіну без бічного ацильного ланцюга (рис.3).

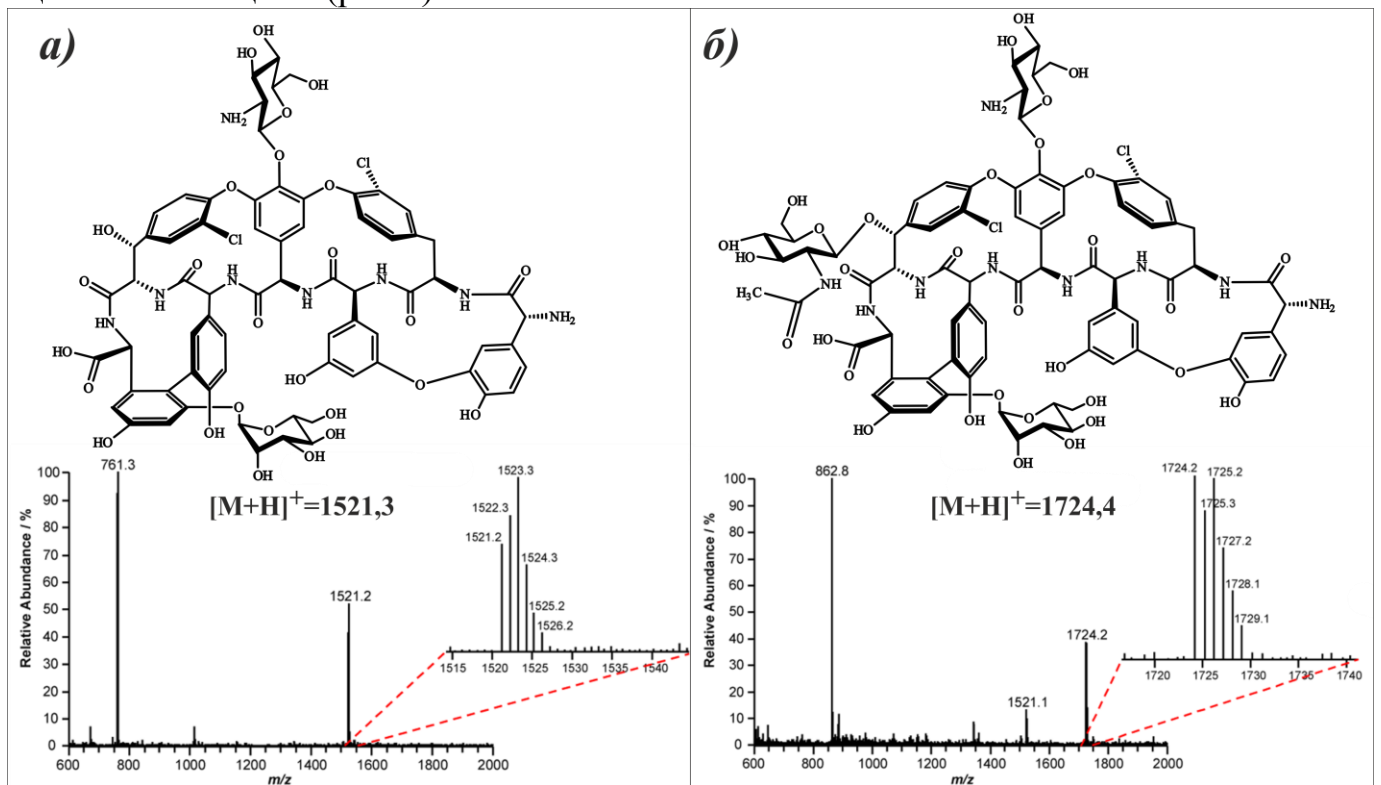


Рис.3. Структурні формули похідних тейкопланіну, що продукувалися штамом *A. teichomyceticus tei11*::aac(3)IV* та їх ВЕРХ-МС-спектри, які відповідають: *а)* деацильованому тейкопланіну без одного GlcNAc (1521,3 кДа); *б)* глікозильованому аклікону тейкопланіну (1724,4 кДа).

Похідне з молекулярною масою 1724 відповідає деацильованому тейкопланіну (рис.3, а), а із масою 1521 – деацильованому тейкопланіну без залишку GlcNAc, приєданого до 6 амінокислотного залишку пептидного кору (рис.3, б).

Превалуючою сполукою було похідне тейкопланіну із молекулярною масою 1521 (біля 90%). Отже, дані аналізу *in vivo* доводять, що ген *tei11** кодує ключовий фермент, приєднання ліпідного бічного ланцюга. Перелік похідних тейкопланіну, що продукувалися *A. teichomyceticus* *tei11*::aac(3)IV* говорить про особливості функціонування глікозилтрансферази Tei1: 90% деацильованих похідних тейкопланіну, які продукувалися штамом *tei11*::aac(3)IV*, були без залишку GlcNAc на шостій амінокислоті аглікону. Це дає підстави припустити, що Tei1, володіє винятковою афінністю до ацильованих попередників тейкопланіну; однак, Tei1 таки спроможний приєднувати залишки GlcNAc до неацильованих попередників тейкопланіну, хоча і з низькою частотою.

Гени *tei13** та *tei30** кодують ацил-КоА-синтазу та ацил-КоА-лігазу відповідно. Ми припустили, що їх продукти можуть брати участь у біосинтезі ацил-КоА-субстрату для Tei11*. Проте, нокауту цих генів в *A. teichomyceticus* не впливали на біосинтез тейкопланіну, а отже, продукти генів *tei13** та *tei30** не є важливими для нормального біосинтезу тейкопланіну.

Особливості шлях-специфічної регуляції біосинтезу тейкопланіну у *A. teichomyceticus*. Кластер генів біосинтезу тейкопланіну містить у своєму складі три гени шлях-специфічних транскрипційних регуляторів (рис.1, *a*). Це гени *tei15**, *tei16** та *tei31**, що кодують StrR-, LuxR та Xre-подібний регулятори відповідно. Функції перших двох із них вивчено (Horbal et al., 2014), і вони показані як ключові регулятори біосинтезу тейкопланіну. Однак, незрозумілою залишається ієрархія цих двох регуляторів, та їх регулони. Не вивчено і роль регуляторного гена *tei31** в біосинтезі тейкопланіну.

З метою виявити, чи *tei31** задіяний у біосинтезі тейкопланіну, було надекспресовано та нокаутовано цей ген. Виявилось, що рекомбінантні штами не відрізняються за продукцією тейкопланіну від дикого типу. Проаналізувавши транскрипцію гена *tei31** за умов, в яких відбувається продукція тейкопланіну, ми не виявили експресії цього гена. Такі результати підштовхують до думки, що *tei31** є мовчазним і не відіграє жодної ролі для продукції тейкопланіну.

Із використанням експериментальних та біоінформатичних підходів було встановлено транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну. Виявлено 18 моногенних та поліцистронних транскрипційних одиниць. Отримавши інформацію про транскрипційну організацію, ми дослідили, які саме з них піддаються регулюванню шлях-специфічних регуляторів Tei15* та Tei16*. Для цього експресія всіх транскрипційних одиниць була вивчена у штамів із нокаутованими генами Tei15* та Tei16* за допомогою напівкількісної ПЛР із зворотною транскрипцією.

Виявилося, що оперони генів резистентності, а саме *tei7-5* (*vanHAX*) та *tei3-2* (*vanRS*) експресуються конститутивно протягом всього дослідженого періоду часу як в дикого типу, так і в мутантах Δ *tei15** та Δ *tei16** (рис.4), а отже є незалежними від шлях-специфічних регуляторів Tei15* та Tei16*. Експресія гена *tei17**, що репрезентував оперон *tei17*-23**, нагадувала таку в штамі дикого типу. Не всі *tei*-гени експресувалися за умов продукування тейкопланіну. Окрім згаданого *tei31**, також не спостерігали експресії гена імовірної сидерофорредуктази *tei27**, 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.4).

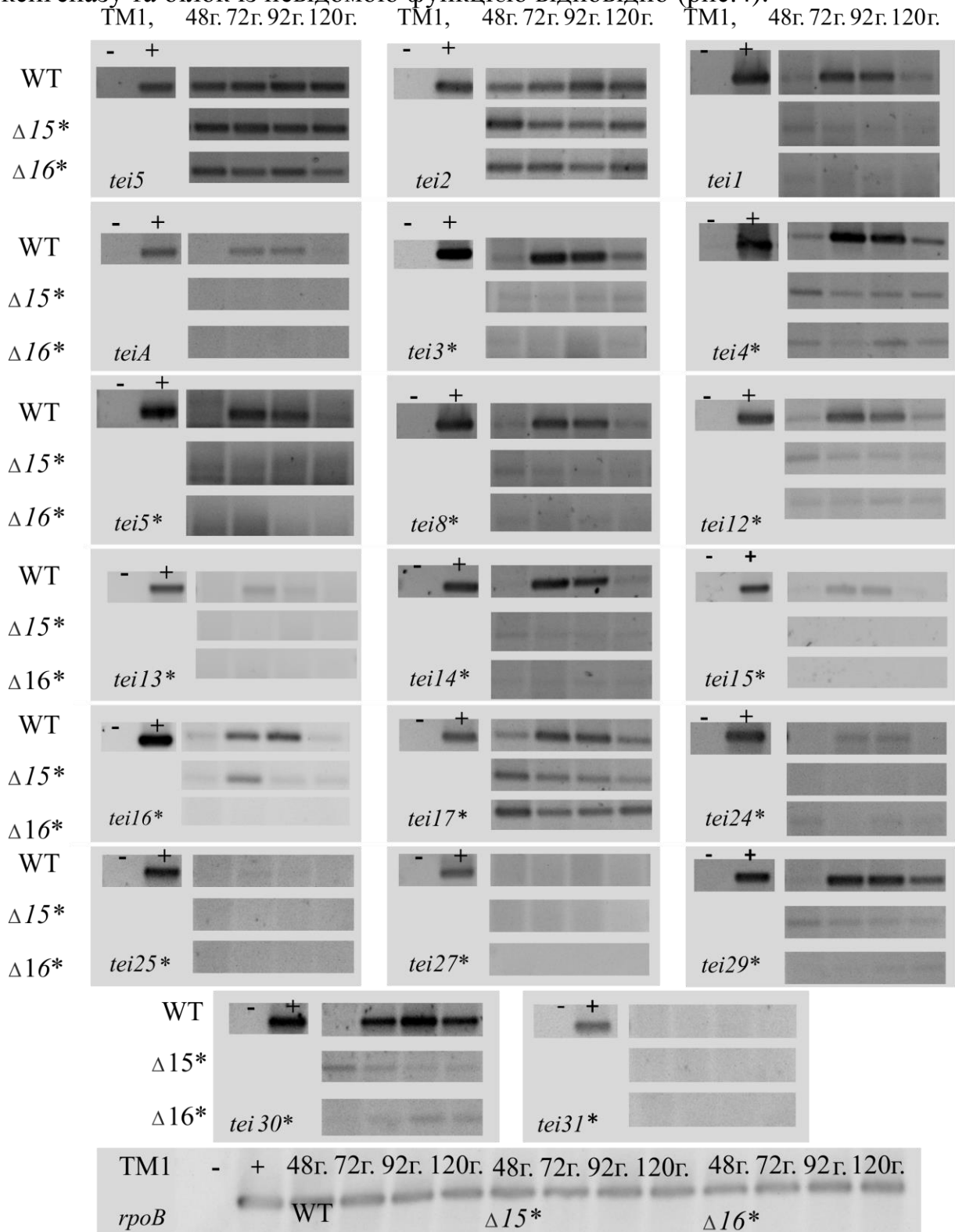


Рис.4. Експресія основних транскрипційних одиниць кластера біосинтезу тейкопланіну в штаммах $\Delta tei15^*$, $\Delta tei16^*$ та дикого типу (WT) при їх вирощуванні в середовищі TM1 в різних часових точках (в “-” матриці немає, в “+” матрицею служила хромосомна ДНК, в усіх інших – відповідний зразок кДНК).

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.4). Не спостерігали експресії генів $teiA$ та $tei13^*$ у мутантів $\Delta tei15^*$ та $\Delta tei16^*$ (рис.4). Було виявлено, що експресія гена $tei15^*$ цілком залежить від $tei16^*$: у *A. teichomyceticus* $\Delta tei16^*$ експресії гена $tei15^*$ не помічено (рис.4).

Базуючись на отриманих даних, можна зробити припущення, що експресія переважної більшості транскрипційних одиниць кластера генів біосинтезу тейкопланіну залежить від шлях-специфічних регуляторів $Tei15^*$ та $Tei16^*$. При цьому, $Tei16^*$ є ієрархічно вищим, ніж $Tei15^*$ та ініціює транскрипцію гена $tei15^*$.

Дослідження генів, продукти яких задіяні в забезпеченні біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками. Із 7-ми амінокислот АГТ 5-ть безпосередньо походять від тирозину, а для біосинтезу ще 2-ох тирозин є амінодонором. Кластери генів біосинтезу глікопептидів мають в своєму складі гени, які кодують дезокси-D-арабіногептулозонат-7-фосфатсинтази (DAHPS) та префенатдегідрогенази (PDH). Експериментально роль таких генів була вивчена для продуцента ванкоміцин-подібного антибіотика баліміцину *Amycolatopsis balhimycina* (Thycaer et al., 2010). В кластері біосинтезу тейкопланіну DAHPS та PDH кодовані генами $tei14^*$ та $tei24^*$ відповідно. Ми вирішили дослідити, який вплив на біосинтез тейкопланіну мають ці гени. Також, в *A. teichomyceticus* було гетерологічно експресовано гени DAHPS та PDH з *Am. balhimycina*.

Надекспресія власного ($tei14^*$) та гетерологічного ($dahp_{secABAL}$) генів DAHPS веде до збільшення продукції тейкопланіну (рис.5, а). Позитивний ефект на біосинтез тейкопланіну має місце незважаючи на відмінності між $Tei14^*$ та DAHPS_{secABAL}, що належать до DAHPS І β підтипу та І α підтипу відповідно. Обидва білки мають різну тривимірну структуру та філогенетичне походження. Ми припускаємо, що гени DAHPS були запозичені кластерами генів біосинтезу ванкоміцин- та тейкопланін-подібних антибіотиків незалежно в ході конвергентної еволюції.

Біоінформатичний аналіз PDH кластерів генів біосинтезу глікопептидів виявив, що префенатдегідрогенази, кодовані в кластерах генів біосинтезу ванкоміцин- та тейкопланін-подібних глікопептидів споріднені. Однак, в архітектурі більшості PDH кластерів генів біосинтезу ванкоміцин-подібних глікопептидів бракує АСТ-домена, що ймовірно бере участь в ретроінгібуванні PDH тирозином. Сконструйовані штами *A. teichomyceticus* із надекспресіями гетерологічного гена $pdh_{secABAL}$ (що походить із кластера генів біосинтезу баліміцину та не має АСТ-домена), як і вкороченого варіанта гена $tei24^*_{tr}$ (в якому штучно було видалено АСТ-домени), не відрізнялися продукцією тейкопланіну від штаму дикого типу (рис.5, б). Натомість, штам *A. teichomyceticus* $tei24^{*+}$, в якому надекспресовано

повну версію гена *tei24** синтезував у тричі більше тейкопланіну, ніж контрольний штам. Із отриманих даних випливає, що С-термінальна ділянка *Tei24** необхідна для позитивного ефекту надекспресії відповідного гена на рівень біосинтезу тейкопланіну. Можна зробити припущення, що *Tei24** підлягає зворотному інгібуванню тирозином, а $\text{PDH}_{\text{secABAL}}$ та $\text{Tei24}^*_{\text{tr}}$ втратили їхні АСТ-домени, а отже не можуть інгібуватися продуктами реакцій, які вони каталізують.

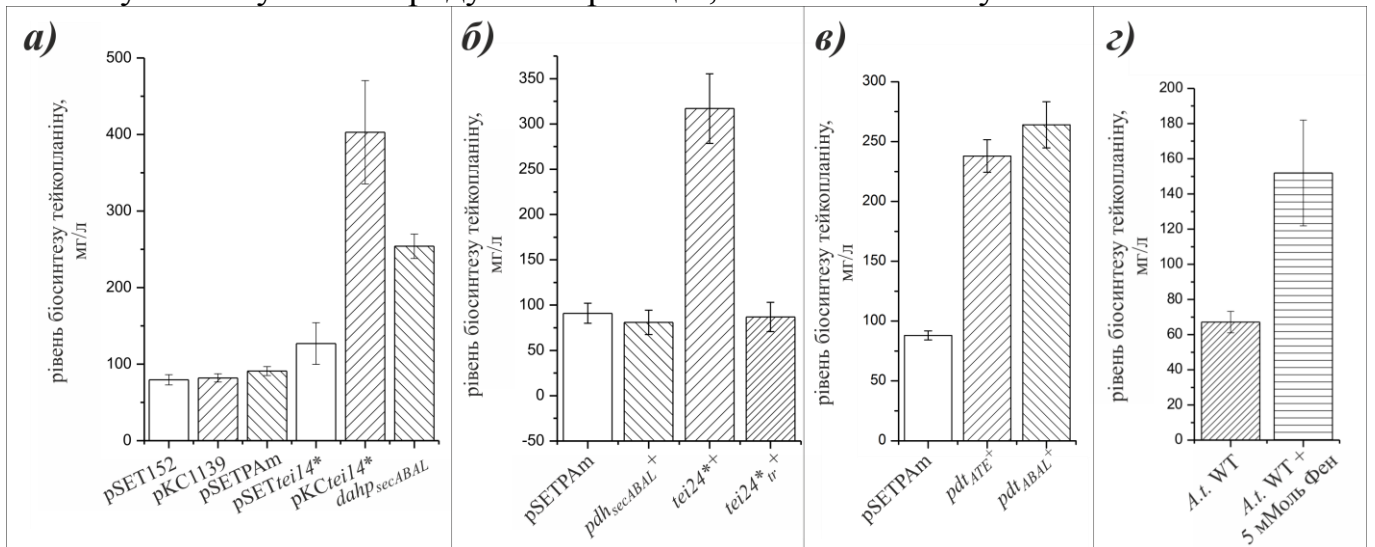


Рис.5. Продукція тейкопланіну рекомбінантними штамми *A. teichomyceticus* із надекспресіями генів: а) ДАНР-синтаз *dahp_{secABAL}* та *tei14 у порівнянні із штамми, що несли відповідні вектори, без клонуваних генів; б) префенатдегідрогеназ *pdh_{secABAL}*, *tei24**, *tei24*_{tr}* порівняно з контрольним штамом *A. teichomyceticus* pSETPAm⁺; в) префенатдегідратаз *pdt_{ATE}*, *pdt_{ABAL}* порівняно з контрольним штамом *A. teichomyceticus* pSETPAm⁺; та штамом дикого типу (г) за умов вирощування з додаванням 5 мМоль фенілаланіну порівняно з контролем (WT).**

Префенат, що синтезується в бактерійній клітині, може бути метаболізований в тирозин, чим завершується шикікатний шлях, або у фенілаланін. Остання реакція каталізується префенатдегідратазами (PDT). З'ясовано, що багато актинобактерійних префенатдегідратаз активуються тирозином і інгібуються фенілаланіном (Abou-Zeid et al., 1995; De Boer et al., 1989; Tianhui, Chiao, 1989). Ми припустили, що надекспресія генів, які їх кодують, повинна привести до різкого зростання пулу фенілаланіну в клітині. Враховуючи те, що активність PDT інгібується фенілаланіном, зростання концентрації фенілаланіну може пригнічувати активність PDT, а це в свою чергу може спричинити збільшення пулу тирозину і підвищення рівня синтезу тейкопланіну. Для цього було сконструйовано рекомбінантні штамми із надекспресіями генів *pdt_{ATE}* та *pdt_{ABAL}*, що кодують префенат-дегідрогенази *A. teichomyceticus* та *Am. balhimycina* відповідно. Аналіз продукції тейкопланіну в рекомбінантних штаммах показав, що обидва *A. teichomyceticus* *pdt_{ATE}*⁺ та *pdt_{ABAL}*⁺ синтезували у понад два рази більше тейкопланіну порівняно зі штамми, які несли вектор без клонуваних генів (рис.5, в). Також виявлено, що в середовище ТМ1 5 мМоль фенілаланіну веде до збільшення продукції тейкопланіну штамом дикого типу (рис.5, г).

Особливості морфології та життєвого циклу *A. teichomyceticus*. Представники роду *Actinoplanes* здатні формувати великі спорангієподібні структури, в яких розвиваються зооспори, однак їх життєвий цикл ніколи не досліджувався. Ми дослідили морфологію та життєвий цикл *A. teichomyceticus* із використанням методів світлової та сканувальної електронної мікроскопії.

Виявлено, що після потрапляння спор на поверхню живильного середовища, вони проростають та протягом перших двох діб утворюють вегетативний міцелій. Після двох діб культивування спорангієносні гіфи з'являються на поверхні вегетативного міцелію (рис.6, а-г). На четверту добу культивування на кінцях гіфів повітряного міцелію формуються зародки спорангіїв (рис.6, г). Протягом четвертої-п'ятої діб культивування зародкові спорангії збільшувалися в розмірах (від 1,5-2 мкм, рис.6, д, е), а на шосту добу перетворювались на дозрілі сферичні спорангії (>20 мкм, рис.6, є). Зволоження дозрілих спорангіїв ініціює вивільнення рухливих спор (рис.6, ж, з). На цьому життєвий цикл *A. teichomyceticus* замикається.

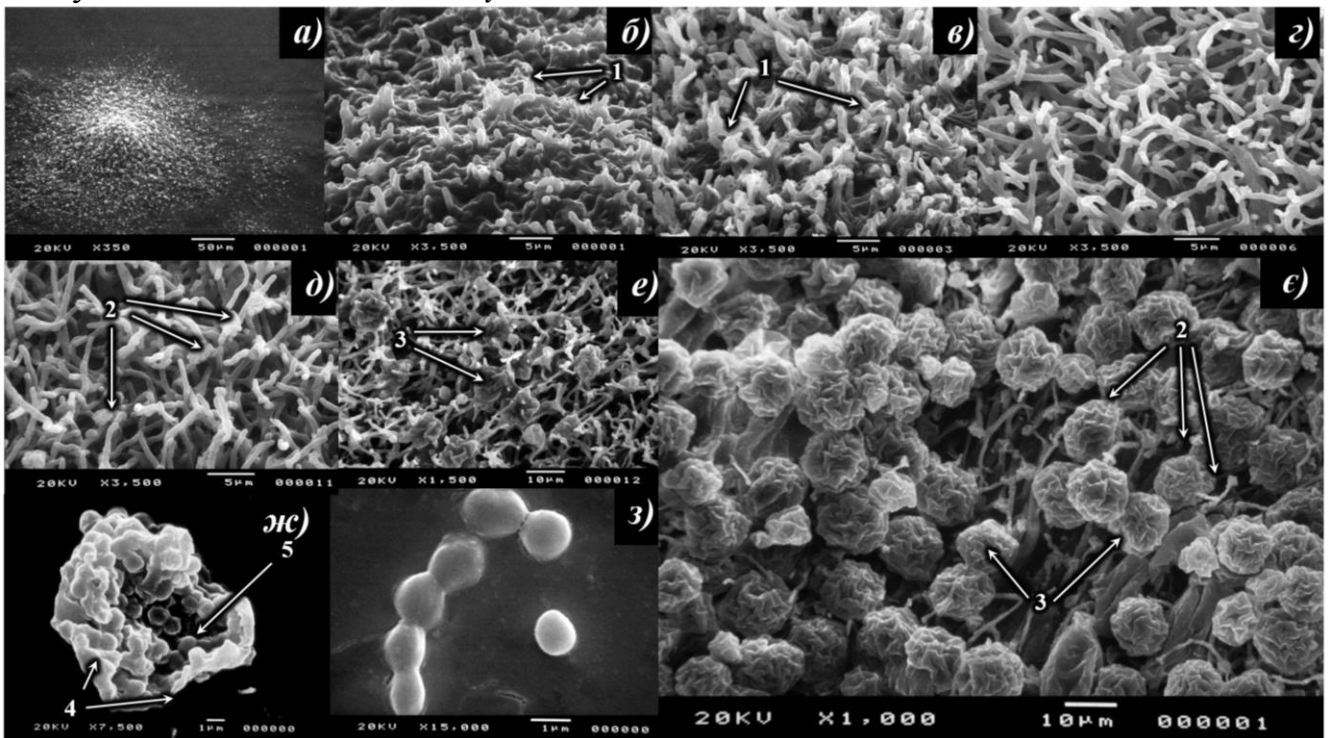


Рис.6. Основні етапи розвитку *A. teichomyceticus* на СМ-агарі: а), б) початок проростання спорангієносних гіфів (1, 2-а доба культивування); в) ріст спорангієносних гіфів (1, 3-а д.к.); г, д) поява та ріст зародкових спорангіїв (2, 4-5-і д.к.); е) поява дозрілих спорангіїв (3, 6-а д.к.); є) повністю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

Глобальна регуляція біосинтезу тейкопланіну та морфогенезу у *A. teichomyceticus*. Найголовнішим позитивним глобальним регулятором стрептоміцетів є транскрипційний регулятор AdpA із регулоном у понад 1000 генів (Hara et al., 2009). Ми дослідили особливості організації геному *A. teichomyceticus in silico*, та виявили, що цей організм не має справжнього ортолога стрептоміцетних *adpA*. Відсутніми були і найважливіші аспекти *adpA*-опосередкованої регуляції,

характерної для стрептоміцетів: в геномі не знайдено гени, продукти яких задіяні в синтезі та розпізнаванні А-фактора та подібних сполук; вживання ТГА-кодону відрізняється від такого у стрептоміцетів, а сам кодон зустрічається в життєво-важливих генах; промоторно-операторна ділянка гена лейцинової тРНК не містить сайтів розпізнавання для AdpA.

Не обмежившись роботою *in silico*, ми дослідили ДНК-зв'язувальні властивості трьох найближчих гомологів AdpA та виявили, що ці білки не здатні розпізнавати операторні сайти AdpA *in vitro*, а гени відповідних регуляторів не здатні комплементувати Bld-фенотип у *S. griseus* $\Delta adpA$ *in vivo*. Ці дані наштовхують на думку, що *adpA*-опосередкована регуляція у *A. teichomyceticus* відсутня. Однак, виявлено що деякі гомологи AdpA є позитивними регуляторами біосинтезу тейкопланіну в *A. teichomyceticus*: надекспресія генів *adpA*_{AT3} та *adpA*_{AT80} вела до збільшення продукції тейкопланіну.

У стрептоміцетів експресія *adpA* регулюється на посттранскрипційному рівні за допомогою РНК-ази AbsB. В *A. teichomyceticus* ми знайшли ортолога *absB*. Надекспресія гена *absB*_{AT} вела до блокування морфогенезу *A. teichomyceticus* на стадії формування спорангіїв, але не мала впливу на продукцію тейкопланіну (рис.7, в, з). Отже, в *A. teichomyceticus* *absB*_{AT} є негативним регулятором морфогенезу навіть враховуючи відсутність AdpA-опосередкованої регуляції. Аналіз експресії ряду потенційних морфогенів штамі *A. teichomyceticus* із надекспресією *absB*_{AT} вказав на *whiG*_{AT} як можливу мішень AbsB_{AT} (рис.8).

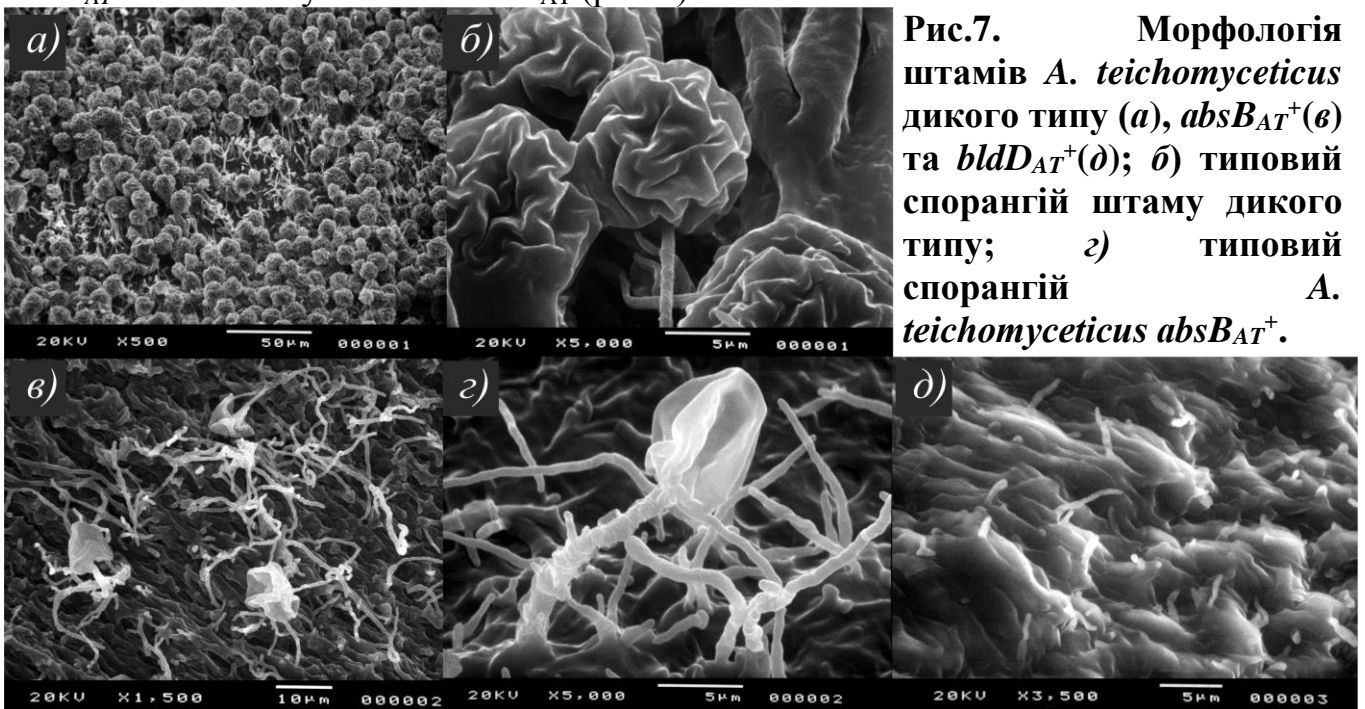


Рис.7. Морфологія штамів *A. teichomyceticus* дикого типу (а), *absB*_{AT}⁺(в) та *bldD*_{AT}⁺(д); б) типовий спорангій штаму дикого типу; з) типовий спорангій *A. teichomyceticus absB*_{AT}⁺.

Окрім AdpA у стрептоміцетів є багато інших глобальних регуляторів із меншими регулонами. Негативним регулятором із найвищою ієрархією серед них є BldD (Den Hengst et al., 2010). *In silico* було знайдено ортолога *bldD* в *A. teichomyceticus*, а також ортологи його можливих мішеней. Надекспресія гена *bldD*_{AT} призвела до повного блокування морфологічної диференціації *A. teichomyceticus* (рис.7, д), однак не мала впливу на продукцію тейкопланіну. Дослідження ДНК-зв'язувальних властивостей *bldD*_{AT} показало, що цей білок здатний зв'язувати власну промоторно-операторну

ділянку, а також промоторно-операторні ділянки генів *sigH_{AT}* та *whiG_{AT}* (рис.9). Ці дані було підтверджено також за допомогою аналізу експресії ряду морфогенів у штамі *A. teichomyceticus* із надекспресією *bldD_{AT}* у порівнянні із диким типом (рис.8).

Рис.8. Експресія морфогенів та *groB* в штамах *A. teichomyceticus bldD_{AT}⁺* та *absB_{AT}⁺* у порівнянні із диким типом (ПЛР із кДНК сумарної РНК, виділеної на 4 добу росту на середовищі ISP3); (-) – ПЛР без додавання матриці; (+) – ПЛР із додаванням хромосомної ДНК.

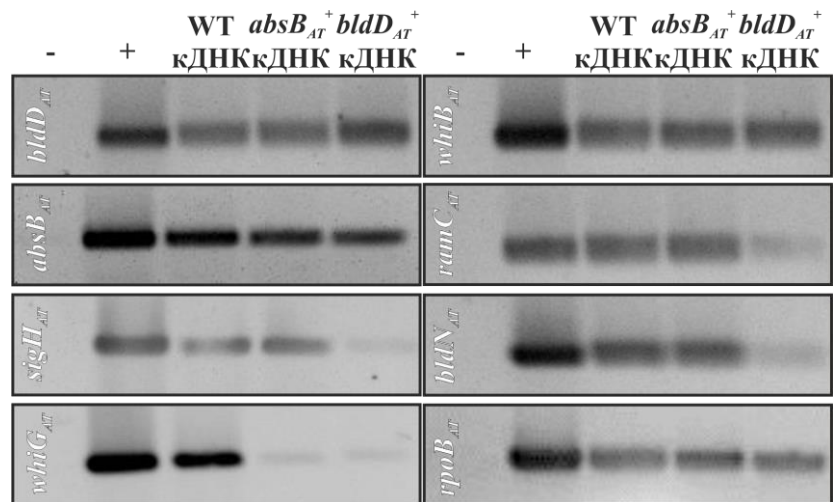
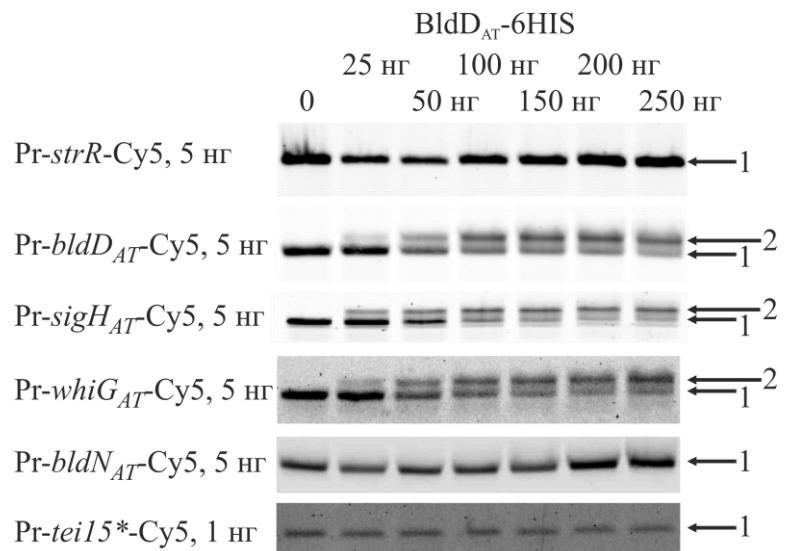


Рис.9. Аналіз зміни електрофоретичної рухливості промоторно-операторних ділянок генів *strR*, *bldD_{AT}*, *sigH_{AT}*, *whiG_{AT}*, *bldN_{AT}*, *tei15** у присутності BldD_{AT}-6HIS: (1) не зв'язана ДНК; (2) утворення нуклеопротейінових комплексів.



Підсумовуючи дані, отримані в цьому розділі можна зробити висновок, що AdpA-опосередкованої регуляції у *A. teichomyceticus* найімовірніше нема, тоді як BldD-опосередкована наявні та подібна до такої у стрептоміцетів.

ВИСНОВКИ

У 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** у 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 *frr_{AT}* із використанням плазміди 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** → *Tei11** → *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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Horbal L. Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus* - producer of teicoplanin, drug of last defense / L. Horbal, A. Kobylyanskyu, O. Yushchuk, N. Zaburannyi, A. Luzhetskyu, B. Ostash, F. Marinelli, V. Fedorenko // J Biotechnol. – 2013. – 168(4). – P. 367–72. *Особистий внесок здобувача – конструювання штамів A. teichomyceticus із транскрипційними злиттями гетерологічних промоторів cdaRp, actII-R4p, wblAp, aac(3)IVp та gusA, та дослідження активності цих промоторів.*
2. Ostash B. The *adpA*-like regulatory gene from *Actinoplanes teichomyceticus*: *in silico* analysis and heterologous expression / B. Ostash, O. Yushchuk, S. Tistechok, H. Mutenko, L. Horbal, A. Muryn, Y. Dacyuk, J. Kalinowski, A. Luzhetskyu, V. Fedorenko // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – 31(8). – P. 1297–1301. *Особистий внесок здобувача – пошук гомологів adpA в A. teichomyceticus, створення штамів A. teichomyceticus та стрептоміцетів із надекспресією гена adpA_{AT9}, дослідження морфології та продукції антибіотиків у рекомбінантних штамів.*
3. Yushchuk O. Peculiarities of *Actinoplanes teichomyceticus* NRRL-B16726 morphology and life cycle / O. Yushchuk, L. Horbal, Ju. Datsyuk, E. Stegmann, V. Fedorenko // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – №71. – С. 126–136. *Особистий внесок здобувача – дослідження особливостей морфології та життєвого циклу A. teichomyceticus із використанням методів сканувальної електронної та світлової мікроскопії, біоінформатичний та транскрипційний аналіз, написання та оформлення статті.*
4. Ющук О. Глобальні механізми регуляції морфогенезу в спорангіальних актинобактерій / О. Ющук, Л. Горбаль, Ю. Дацюк, Б. Осташ, Е. Штегманн, А. Лужецький, В. Федоренко // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – №19. – С. 192-96. *Особистий внесок здобувача – біоінформатичний аналіз, аналіз ДНК-зв'язувальних властивостей білків in vitro, створення штамів S. coelicolor із гетерологічними експресіями генів bldD_{AT}, absB_{AT}, надекспресія гена ssgB_{AT} в A. teichomyceticus, дослідження морфології рекомбінантних штамів, написання та оформлення статті.*
5. Yushchuk O. Characterization of the post-assembly line tailoring processes in teicoplanin biosynthesis / O. Yushchuk, B. Ostash, T.H. Pham, A. Luzhetskyu, V. Fedorenko, A.W. Truman, L. Horbal // ACS Chemical Biology. – 2017. – 11(8). – P. 2254-2264. *Особистий внесок здобувача – створення штамів із нокаутами генів модифікації аглікону тейкопланіну.*
6. Горбаль Л. Генетичний інструментарій для конструювання штамів *Actinoplanes teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну / Л. Горбаль, О. Ющук, Н. Забуранний, А. Кобилянський, Б. Осташ, Ф. Марінееллі, А. Лужецький, В. Федоренко // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – №15. – С. 31-35. *Особистий внесок здобувача – написання та оформлення статті.*
7. Yushchuk, O. *bldD* cloned from *Actinoplanes teichomyceticus* blocks morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor* M145 / O. Yushchuk, L. Horbal // «Biology: from a molecule up to the biosphere» Abstracts of the VIII International young scientists' conference. – Kharkiv, 2013. – P. 105-106. *Особистий внесок здобувача – створення штаму S. coelicolor із гетерологічною експресією bldD_{AT} та його дослідження.*
8. Horbal, L. The pathway specific regulatory genes as keys to teicoplanin overproduction in *Actinoplanes teichomyceticus* / L. Horbal, A. Kobylyanskyu, A. Truman, O. Yushchuk, F. Marinelli, B. Ostash, A. Luzhetskyu, V. Fedorenko // X International conference of students and

- PhD-students "Youth and Progress in biology" book of abstracts. – Lviv, 2014. – P. 7. *Особистий внесок здобувача – дослідження активності гетерологічних промоторів в *A. teichomyceticus*.*
9. Yushchuk, O. *In silico* reconstruction of putative *bld*- and *whi*-cascades analogues in *Actinoplanes teichomyceticus* / O. Yushchuk, L. Horbal, V. Fedorenko // X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology" book of abstracts. – Lviv, 2014. – P. 100-101 *Особистий внесок здобувача – біоінформатична реконструкція мережі глобальних регуляторів в *A. teichomyceticus*.*
10. Ющук, О. Глобальні регулятори AbsB_{AT} та BldD_{AT} задіяні у регуляції морфогенезу *Actinoplanes teichomyceticus* / О. Ющук, Л. Горбаль, В. Федоренко // Збірник тез XIII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів». – Київ, 2016. – Ст. 77-79. *Особистий внесок здобувача – створення штамів *A. teichomyceticus* із надекспресіями генів *absB*_{AT} та *bldD*_{AT} та дослідження їх морфології.*
11. Yushchuk, O. Manipulating the precursor supply to improve teicoplanin biosynthesis levels in *Actinoplanes teichomyceticus* / O. Yushchuk, L. Horbal, E. Stegmann, V. Fedorenko // XXIII International scientific and practical conference of young scientists and students "Topical issues of new drugs development" book of abstracts, Vol. 1. – Kharkiv, 2016. – P. 388-389. *Особистий внесок здобувача – створення штамів *A. teichomyceticus* із надекспресіями генів, продукти яких задіяні в метаболізмі тирозину, та дослідження продукції тейкопланіну цими штамами.*
12. Yushchuk, O. *ssgB* orthologue positively influences sporangia formation in *Actinoplanes teichomyceticus* / O. Yushchuk, L. Horbal, V. Fedorenko // X International conference of students and PhD-students "Youth and Progress in biology" book of abstracts. – Lviv, 2016. – P. 142-143. *Особистий внесок здобувача – створення штаму *A. teichomyceticus* із надекспресією *ssgB*_{AT} та дослідження морфології цього штаму.*
13. Yushchuk, O. Negative regulators AbsB_{AT} and BldD_{AT} orchestrate the expression of putative morphogenes in *Actinoplanes teichomyceticus* / O. Yushchuk, L. Horbal // Conference-competition of young scientists "Actual problems of biochemistry and biotechnology" book of abstracts. – Kyiv, 2016. – P. 68. *Особистий внесок здобувача – дослідження експресії морфогенів в штамах *A. teichomyceticus* із надекспресіями генів *absB*_{AT} та *bldD*_{AT}.*
14. Власюк, І. Гетерологічна експресія гена *rff*_{AT} в клітинах стрептоміцетів / І. Власюк, О. Ющук, Л. Горбаль, В. Федоренко // Збірник тез XIII міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів "Молодь та поступ біології". – Львів, 2017. – Ст. 101. *Особистий внесок здобувача – створення штамів *A. teichomyceticus* та стрептоміцетів із надекспресією гена *rff*_{AT}.*
15. Патент на корисну модель №94608 Україна, МПК (2013.01) C12Q 1/01, C12Q 1/02, C12Q 1/04. Спосіб індукції синтезу нових антибіотиків у актинобактерій / Осташ Б., Горбаль Л., Ющук О., Тістечок С., Мурин А., Федоренко В.; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – №201483116, заявлено 17 квітня 2014 р., опубл. 25.11.2014, Бюл. № 22. *Особистий внесок здобувача – створення вектора pKC1139adrAAT19, написання та оформлення патенту.*

АНОТАЦІЯ

Ющук О.С. Генетичний контроль біосинтезу тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю - 03.00.22 Молекулярна генетика. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2017.

В дисертації вивчено деякі аспекти генетичного контролю біосинтезу клінічно-важливого глікопептидного антибіотика тейкопланіну в *Actinoplanes teichomyceticus*, включаючи шлях-специфічну та глобальну регуляцію, забезпечення біосинтезу тейкопланіну ароматичними амінокислотами-попередниками та роль деяких структурних генів біосинтезу тейкопланіну. Встановлено ймовірну послідовність реакцій модифікації аглікону тейкопланіну. Вивчено роль генів з кластера біосинтезу тейкопланіну, що кодують ферменти синтезу тирозину. Досліджено транскрипційну організацію кластера генів біосинтезу тейкопланіну, де виявлено 18 транскрипційних одиниць; шлях-специфічний регулятор Tei16* контролює експресію гена другого регулятора – Tei15*. Окрім цього, в дисертація вивчено життєвий цикл та механізми глобальної регуляції морфогенезу в *A. teichomyceticus*. Було виявлено, що AdpA-опосередкована глобальна регуляція скоріш за все відсутня в *Actinoplanes teichomyceticus*, однак регулятор BldD виконує функції дуже подібні до тих, які виконують його ортологи у стрептоміцетів. На різних етапах роботи описано створення ряду штамів із підвищеною продукцією тейкопланіну.

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

SUMMARY

Yushchuk O. Genetic control of teicoplanin biosynthesis in *Actinoplanes teichomyceticus*. – Manuscript.

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (Ph.D.) in Biology, speciality 03.00.22 - molecular genetics. – SI “Institute of food biotechnology and genomics of NAS of Ukraine”, Kyiv, 2017.

Some aspects of genetic control of teicoplanin biosynthesis in *Actinoplanes teichomyceticus* were studied in this thesis.

The post-assembly line tailoring processes in teicoplanin biosynthesis were characterized. We have knocked out genes of glycosyltransferases *tei3** and *tei10**, as well as genes putatively involved in aliphatic side chain attachment: *tei13**, *tei30** and *tei11**. HPLC-MS analysis of teicoplanin derivatives produced by these mutants revealed the putative sequence of teicoplanin aglycon (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.

Teicoplanin biosynthesis cluster (TBC) includes three genes encoding pathway-specific regulators, particularly *tei15**, *tei16** (both shown to be crucial for teicoplanin biosynthesis) and *tei31** (with uninvestigated functions). Knock-out as well as overexpression of *tei31** did not affected the production of teicoplanin. In addition, transcriptional analysis revealed that *tei31** was not expressed in teicoplanin-producing culture of *A. teichomyceticus*. We have also studied transcriptional organization of TBC and found eighteen operons and monogenic cistrons. Expression of the majority of these

transcriptional units was revealed to be dependent on *Tei15** and *Tei16**. Finally, expression of *tei15** was found to be absolutely dependent on *Tei16**.

The role of *tei14** and *tei24** genes from TBC was investigated in our work. Both genes encode enzymes of tyrosine metabolism and were shown to be important for teicoplanin biosynthesis: overexpression of these genes led to teicoplanin production increase.

Finally, we have also studied global regulatory mechanisms of teicoplanin biosynthesis and *A. teichomyceticus* morphogenesis. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that closest AdpA-homologues from *A. teichomyceticus* are neither able to reconstitute *bld*-phenotype in *S. griseus* $\Delta adpA$ nor to bind classical AdpA operator. This data along with *in silico* analysis of *A. teichomyceticus* genome allowed us to suggest the absence of AdpA-mediated regulation in *A. teichomyceticus*. However, overexpression of some *adpA* homologues in *A. teichomyceticus* increased the teicoplanin production level. We revealed that overexpression of two global negative regulators, BldD_{AT} and AbsB_{AT}, blocked the development of *A. teichomyceticus* on the stages of sporangiferous hyphae germination and sporangia development respectively. BldD_{AT} protein was shown to bind its own operator region, as well as operator regions of some other putative morphogens, including *whiG_{AT}* and *sigH_{AT}*. BldD-mediated regulation in *A. teichomyceticus* appeared to share many features with the BldD-mediated regulation studied for streptomycetes.

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

АННОТАЦИЯ

Ющук А.С. Генетический контроль биосинтеза тейкопланина у *Actinoplanes teichomyceticus*. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности - 03.00.22 Молекулярная генетика. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2017.

В диссертации изучены некоторые аспекты генетического контроля биосинтеза клинически важного гликопептидного антибиотика тейкопланина в *Actinoplanes teichomyceticus*, включая специфическую и глобальную регуляцию, обеспечение биосинтеза тейкопланина ароматическими аминокислотами-предшественниками, а также роль некоторых структурных генов биосинтеза тейкопланина. Установлена последовательность реакций модификации тейкопланинового агликона. Изучена роль генов кластера биосинтеза тейкопланина, кодирующих ферменты синтеза тирозина. Исследована транскрипционная организация кластера генов биосинтеза тейкопланина, где обнаружено 18 транскрипционных единиц; регулятор *Tei16** контролирует экспрессию гена регулятора *Tei15**. Кроме этого, в диссертации изучены жизненный цикл и механизмы глобальной регуляции морфогенеза *A. teichomyceticus*. Установлено, что AdpA-опосредствованная регуляция скорее всего отсутствует у *A. teichomyceticus*, но глобальный регулятор BldD функционирует подобно своим ортологам у стрептомицетов. На разных этапах работы описано создание ряда штаммов с повышенной продукцией тейкопланина.

Ключевые слова: *Actinoplanes teichomyceticus*, глобальная регуляция, тейкопланин, гликопептиды, специфическая регуляция, морфогенез.