

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

КОШЛА ОКСАНА ТАРАСІВНА



УДК 579.25; 577.21

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

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Осташ Богдан Омелянович,

Львівський національний університет імені Івана Франка,
головний науковий співробітник НДЧ.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Дмитрук Костянтин Васильович,

Інститут біології клітини НАН України,
завідувач лабораторії метаболічної інженерії;

кандидат біологічних наук

Тігунова Олена Олександрівна,

Державна установа “Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України”,
науковий співробітник лабораторії харчової та
промислової біотехнології

Захист дисертації відбудеться “23” січня 2020 р. о 13.00 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 “19” грудня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

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

Регуляція метаболізму стрептоміцетів містить ієрархічно підпорядковані каскади, є надзвичайно складною, тісно скоординованою в часі та з умовами середовища (McCormick and Flärdh 2012). Значний та виправданий інтерес дослідників довгий час був спрямований на регуляцію вторинного метаболізму мережею транскрипційних факторів (den Hengst et al. 2010; Liu et al. 2013). Накопичення нових даних транскриптоміки, протеоміки та метаболоміки дає змогу виявити нові, не менш важливі рівні регуляції експресії генів. Одним із таких рівнів є трансляційна регуляція, яка впливає на метаболізм через зміни точності, ефективності та вибіркості трансляції мРНК (Day and Tuite 1998; Novoa and Ribas de Pouplana 2012; Csárdi et al. 2015; Guo 2018). Вивчення механізмів, що впливають на трансляційну регуляцію експресії генів стрептоміцетів дасть змогу глибше зрозуміти ті фундаментальні процеси, що лежать в основі білкового синтезу певних груп мРНК (в тому числі і мРНК, необхідних для синтезу різних класів ВМ) та використати ці дані для раціонального конструювання штамів із необхідними властивостями. Отже, робота має важливе теоретичне й практичне значення.

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

вторинного метаболізму в актинобактерій” (№ державної реєстрації 0118U000406, 2018 р.).

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

Для досягнення мети поставлено такі *завдання*:

1. Сконструювати та дослідити властивості низки штамів *Streptomyces albus* SAM2 меродиплоїдних за геном рибосомного білка S12 *rpsL*;
2. Сконструювати безмаркерного делеційного мутанта *S. albus* за геном лейцил-тРНК (UUA) *bldA* та дослідити його властивості, зокрема, морфологічний цикл на агаризованих середовищах, синтез вторинних метаболітів та експресію в мутанті репортерних генів;
3. Сформуванати вибірку генів стрептоміцетів, білкові продукти яких, імовірно, модифікують тРНК;
4. Сконструювати штами *S. albus* з делеціями вибраних генів модифікацій тРНК, дослідити властивості отриманих штамів;
5. Описати загальну схему функціонування і регуляції вторинного метаболізму стрептоміцетів за участі досліджених генів модифікації тРНК.

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

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

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

Наукова новизна отриманих результатів. Створено делеційного мутанта *S. albus* за геном *bldA* та доведено, що штам нездатний експресувати ТТА-вмісні гени. Вперше класифіковано гени білків, що задіяні в посттранскрипційних модифікаціях тРНК стрептоміцетів. Вперше отримано делеційних мутантів стрептоміцетів за цими генами та доведено їх функцію шляхом хімічного аналізу модифікацій нуклеозидів тРНК; описано властивості мутантних штамів, зокрема їхній морфотип, здатність синтезувати вторинні

метаболіти та вплив відсутності модифікацій на експресію репортерних білків. Отримано низку меродиплоїдних штамів *S. albus* за геном рибосомного білка S12 – *rpsL* – та описано вплив такого стану гена на вторинний метаболізм і загальні процеси росту та стійкості до антибіотиків. Отримано нові дані про регуляторні процеси на трансляційному рівні контролю експресії генів та їхнє місце в уже описаних регуляторних каскадах.

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

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені у дисертації, автор отримав особисто або за непосредньої участі у виконанні експериментів. Планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів виконано спільно з науковим керівником, д.б.н. Б. О. Остащем (ЛНУ ім. І. Франка). Вибрані питання роботи проаналізовано та обговорено зі співробітниками кафедри генетики та біотехнології ЛНУ ім. І. Франка, проф. В. О. Федоренком, к.б.н. І. С. Осташ, к.б.н. О. С. Ющуком, асп. І. В. Рокицьким, з якими автор має спільні публікації. Електронну мікроскопію штамів *S. albus* виконано спільно з к.ф.-м.н. Ю. Р. Дацюком (ЛНУ ім. І. Франка). Частина роботи виконувалась в Університеті Уппсали (Швеція), у групі проф. Л. А. Кірсебома, за підтримки здобувача стипендією Visby від Swedish Institute (SI). Аналіз гідролізатів тРНК проводили у співпраці із групою проф. А. Бістрома із Університету Умеа (Швеція). ВЕРХ-МС аналіз екстрактів, отриманих зі штаму $\Delta bldA$, проводили спільно з асп. М. Лопатнюк (група проф. А. Лужецького, Саарландський університет, Німеччина).

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

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх

обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (186 найменувань) та додатків. Роботу викладено на 167 сторінках машинописного тексту (114 сторінок основного тексту) і проілюстровано 44-ма рисунками та 8-ма таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляді літератури) розглянуто сучасні дані щодо регуляції морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів. Описані фенотипові прояви мутацій генів *rpsL* (кодує рибосомний білок S12) та *bldA* (кодує тРНК^{Leu}_{UAA}, що єдина розшифровує найрідкісніший для геномів стрептоміцетів кодон ТТА), що змінюють експресію генів на рівні трансляції. Окрім цього, охарактеризовано важливу роль посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК для їхнього функціонування і нормального перебігу процесу трансляції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано наступні штами мікроорганізмів: *Escherichia coli* GB2005 (Fu et al. 2008; Tu et al. 2016), WM6026 (Blodgett, Zhang and Metcalf 2005), BW25113 (pIJ790) (Gust et al. 2003), штам *Streptomyces albus* SAM2 (Bilyk and Luzhetskyy 2014), та його похідні, отримані у цій роботі, а також *Candida famata* VKM Y-9 і *Bacillus cereus* ATCC19637. Для нокауту, комплементачії, внесення додаткових копій генів використано конструкти, отримані на основі: векторів pTOS, pTES (Herrmann et al. 2012), pKC1139, pKC1132 (Kieser et al. 2000), patt-shyg (Myronovskiy, Rosenkränzer, and Luzhetskyy 2014), pSMART (BAC_1N12) (Koshla et al. 2017). Також використано плазмиди pUWLDre (Herrmann et al. 2012), pUWLint31 (Myronovskiy, Rosenkränzer, and Luzhetskyy 2014), pGM4181/pGM4181tta- (Koshla et al. 2019), косміди pOJ436ara (Luzhetskyy et al. 2007), moeno38-6 (Ostash et al. 2013), репортерні плазмиди pRV3 (Koshla et al. 2017), pSAGA/pSAGAtta (Koshla et al. 2019), padpAscript/transl/control (Makitrynskiy et al. 2013).

Для вирощування культур стрептоміцетів, характеристики їх росту та морфологічного розвитку, визначення продукції ними вторинних метаболітів використовували рідкі та агаризовані середовища SFM, MM, SMMS, R5 (Kieser et al. 2000); SG1, SG2, ISP3, GYM (Koshla et al. 2017), TSB (та агаризоване TSA). Трансформацію і електропорацію клітин *E. coli* здійснювали за стандартними методами, як і кон'югаційні схрещування *Escherichia-Streptomyces* (Sambrook and Russell 2001; Kieser et al. 2000). Виділення плазмідної та сумарної ДНК, ампліфікацію фрагментів за допомогою ПЛР, ферментативну обробку ДНК, аналіз ДНК проводили стандартно (Sambrook and Russell 2001). Рекombініринг ДНК виконували як описано в (Gust, Kieser, and Chater 2002; Gust et al. 2003). Виділення сумарної фракції тРНК виконували як описано (Cayama et al. 2000; Koshla et al. 2019), аналіз посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК проводили за допомогою ВЕРХ, як описано (Gehrke and Kuo 1989). Вторинний метаболізм стрептоміцетів характеризували

за допомогою біотестів та аналізом екстрактів, отриманих з досліджуваних штамів, методом ВЕРХ-МС (Makitrynskyu et al. 2010; Ostash et al. 2013; Koshla et al. 2017, 2019). Визначення активності β -глюкуронідази в лізатах *gusA*⁺-штамів проводили, як описано (Myronovskyi et al. 2011). Сканувальну електронну мікроскопію виконували на мікроскопі Jeol JSM-T220A. Для біоінформатичних аналізів використовували пакет програм BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), базу даних MODOMICS (Voccaletto et al. 2018), tRNAscan-SE (Lowe and Eddy 1997; Lowe and Chan 2016). Карти плазмід будували за допомогою програми SnapGene.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Меродиплоїди *S. albus* за геном *rpsL* та їхні властивості. Ген *rpsL* кодує життєво важливий білок S12, що входить до складу декодувального центру 30S субодиниці бактерійних рибосом. Хоча точкові мутанти за геном *rpsL* докладно описані для низки організмів (Okamoto-Hosoya, Hosaka, and Ochi 2003; Carr, Gregory, and Dahlberg 2005; Agarwal, Gregory, and O'Connor 2011), практично відсутня інформація про те, як впливає на фенотип наявність в одному геномі двох різних копій цього гена. Нами сконструйовано 9 безмаркерних меродиплоїдних штамів *S. albus* SAM2 за геном *rpsL* (*XNR_RS18425*, або *XNR_3720*), які, окрім алеля дикого типу, додатково несли один із мутантних алелів, що зумовлювали виникнення амінокислотних заміщень в структурі S12 (R86P, K88E, K88R, L90K, P91S, R94G, K88E+P91S, GI92, K88E+GI92). Усі штами позначили уніфіковано, як-от *S. albus* R86P_ex.

Аналізуючи властивості меродиплоїдів, виявили, що лише штам GI92_ex проявляв відмінну від дикого типу морфологію (формував тонший міцелій та меншу кількість спор на твердих середовищах). Меродиплоїд K88E_ex утворював стрептоміцин-стійкі КУО із частотою, на 2 порядки вищою, ніж SAM2 (при висіві зі спорових суспензій). Практично всі штами виявляли змінену ендогенну антибіотичну активність проти *B. cereus* та, при рості на агаризованому SG2, мали вищу активність проти дріжджів *C. famata*. При цьому, продукція антибіотиків залежала від середовища і додатково внесеного мутантного алеля *rpsL*. Наприклад, штами L90K_ex, P91S_ex, K88E+P91S_ex мали підвищену активність проти *B. cereus*, тоді як K88R_ex практично такої не виявляв. Також дослідили здатність штамів до гетерологічної продукції антибіотиків. Меродиплоїд L90K_ex *ara* надпродукував забарвлений антибіотик аранціаміцин (*ara* кластер генів біосинтезу внесений у складі косміди pOJ436ara) в 4-5 разів більше порівняно з диким типом (рис. 1).

Конструювання та дослідження мутанта *S. albus* за геном *bldA*, що кодує лейцинову тРНК^{Leu}_{UAA}. Ген *bldA* кодує єдину тРНК^{Leu}_{UAA}, що здатна розшифровувати найрідкісніший для геномів стрептоміцетів кодон ТТА, а, отже, необхідна для трансляції UUA-вмісних мРНК. Продукти останніх не є життєво важливими, однак задіяні в процесах морфогенезу та вторинного метаболізму (Lawlor, Baylis, and Chater 1987; Li et al. 2007; Chandra and Chater

2008). Мутанта *S. albus* SAM2 за геном *bldA* сконструйовано для вивчення процесів тРНК-опосередкованої регуляції експресії генів у згаданому штамі.

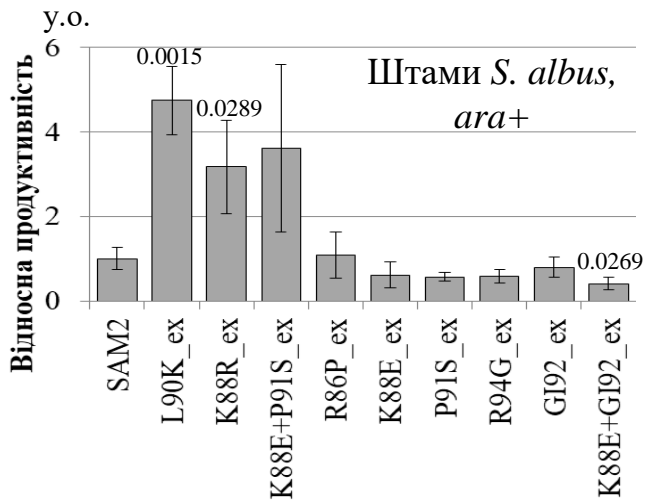


Рис. 1. Відносна продукція забарвлених метаболітів *ara*⁺-штамами, меродиплоїдними за геном *rpsL*. Нормалізовано відносно кількості сухої біомаси в 1 мл культури. Продукцію *ara*⁺-штамом SAM2 прийнято за 1. Представлено середній результат 3 повторів, планки похибок відображають стандартне відхилення.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

Раніше такий мутант описаний не був. У *S. albus* J1074 тРНК^{Leu}_{UAA} кодується геном *XNR_RS09895* (*XNR_1995*). Ген заміщено на касету стійкості до апраміцину (*aac(3)IV-oriT* із *patt-saac-oriT* (Myronovskyi, Rosenkränzer, and Luzhetskyu 2014)), яку потім видалено за допомогою інтегрази Int31. Так сконструйовано безмаркерного мутанта $\Delta bldA$ (або ОК3; Koshla et al. 2017).

На більшості твердих середовищ штамп не виявляв відмінної від SAM2 морфології, однак на SFM чи SMMS повільніше та менш щільно формував повітряний міцелій та спори. Додаткове внесення гена *bldA* у складі плазмиди *pTOSbldA* повністю відновлювало морфологічні дефекти мутанта (рис.2).

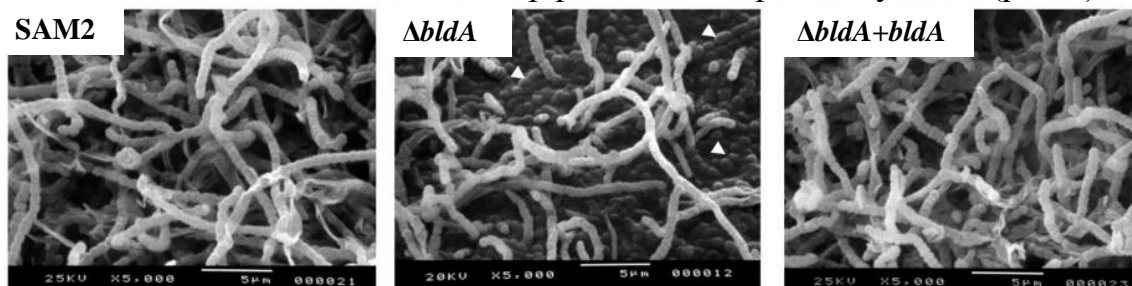


Рис. 2. Скануюча електронна мікроскопія 3-денних газонів штамів *S. albus*, SAM2, $\Delta bldA$ і $\Delta bldA+bldA$ (комплементований), вирощених на SFM. Білими трикутниками позначено фрагментований субстратний міцелій штаму $\Delta bldA$.

Нокаут гена *bldA* активізував синтез протигрибкових та пригнічував синтез протибактерійних метаболітів. ВЕРХ-МС екстрактів, отриманих зі штамів SAM2 та $\Delta bldA$, виявила, що $\Delta bldA$ продукував більше кандидидин-подібних сполук, ніж SAM2 при рості у рідкому середовищі SG2 (рис.3).

Оцінюючи експресію ТТА-вмісних конструктів та кластерів генів біосинтезу (КГБ), виявили, що нокаут гена *bldA* в *S. albus* практично скасовує продукцію антибіотиків, КГБ яких містять ТТА-кодони (наприклад, гетерологічних сполук – аранціаміцину та моеноміцину, та власних –

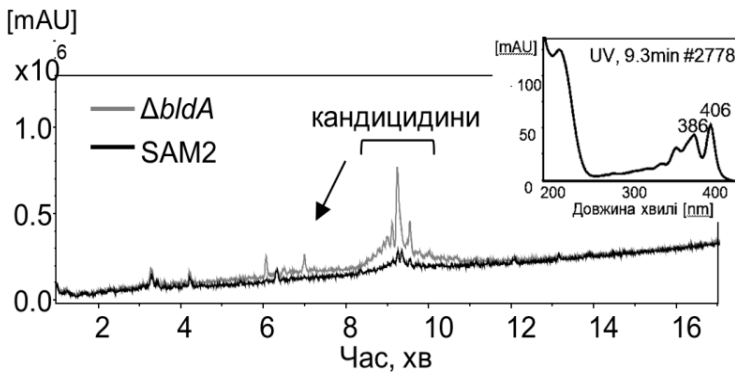


Рис. 3. Хроматограма ВЕРХ етилацетатних екстрактів, отриманих з однакової кількості біомаси штамів SAM2 і $\Delta bldA$ та спектр УФ-поглинання кандицидинів. Вісь абсцис – час виходу сполук, хв; вісь ординат – значення абсорбції в mAU.

пауломіцинів). Також візуально не виявлено експресії ТТА⁺-гена *SCO3479* (кодує ортолога β -галактозидази в *S. coelicolor*) з плазмиди pRV3 в $\Delta bldA$ -мутанта (вирощування на TSA з додаванням X-gal та індуктора кумату). Проте, виявили низький рівень β -глюкуронідазної активності штаму $\Delta bldA$, який містив трансляційне злиття ТТА-вмісного гена *adpA_{gh}* з репортером *gusA* (в складі *radpAtransl*), що свідчить про імовірну містрансляцію кодона UUA. Додаткові копії гена *bldA* не впливали на морфотип SAM2, однак на певних середовищах приводили до зростання антибіотичної активності проти *B. cereus*.

Мутанти *S. albus* за генами, що кодують білки посттранскрипційних модифікацій тРНК. Утворення посттранскрипційних модифікації тРНК є важливою умовою дозрівання та функціонування цих молекул (Shepherd and Ibba 2015; Voccaletto et al. 2018). Використовуючи біоінформатичний аналіз, виявлено можливих ортологів білків, задіяних в процесах посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК у стрептоміцетів. Вперше для стрептоміцетів отримано нокаутні штами за генами ортологів MiaA (тРНК (аденозин (37)-N6)-диметилалілтрансфераза, XNR_1074) та MiaB (тРНК (N6-ізопентеніл аденозин (37)-C2)-метилгіоттрансфераза, XNR_1078), функція генів підтверджена експериментально. Шляхом ВЕРХ-аналізу гідролізатів тРНК, отриманих з нокаутних штамів та штаму дикого типу, описані послідовні реакції гіпермодифікації позиції ms^2io^6A37 для більшості тРНК з антикодонами ХХА (Koshla et al. 2019).

Виявлено, що нокаут *miaA* приводить до сповільнення процесів росту та морфологічної диференціації штаму SAM2, тоді як нокаут *miaB* майже не впливав на морфологію (рис.4). Внесення копії гена *miaA* в складі pTES1074 в мутантний штам відновлювало фенотип дикого типу. Окрім цього, штам $\Delta miaA$ проявляв вищу активність проти дріжджів *C. famata* та практично повністю втрачав активність проти *B. cereus*, порівняно з диким типом. ВЕРХ-МС дослідження екстрактів, отриманих зі штамів SAM2, $\Delta miaB$ та $\Delta miaA$ (вирощених в рідкому середовищі SG2), виявило підвищення рівня та різноманітності накопичених форм антибіотиків антимицинів мутантними штамми, особливо $\Delta miaA$ (рис.5). Внесення додаткових копій генів *miaA* та *miaB* (в складі інтегративних плазмід pTES1074 і pTES1078, відповідно) в SAM2 не привело до змін морфології чи накопичення вторинних метаболітів.

Штам $\Delta miaB$ продукував менше, а $\Delta miaA$ практично не накопичував гетерологічних антибіотиків моюноміцину та аранціаміцину. Враховуючи, що

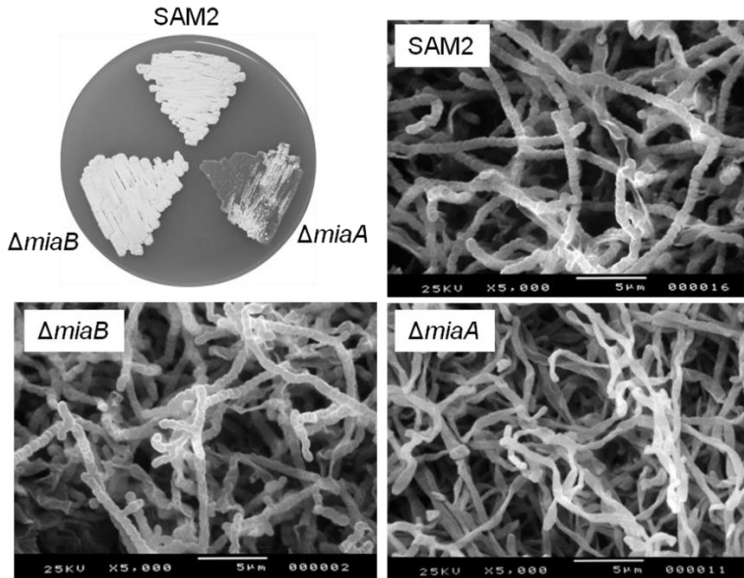


Рис. 4. Морфологічний фенотип штамів $\Delta miaA$ та $\Delta miaB$ при рості на SFM. Інкубували 2 доби при 30°C. Ті ж газони використали для скануючої електронної мікроскопії (у випадку $\Delta miaA$ продемонстровано зображення фрагменту білого газону на стадії розвитку повітряних гіфів).

КГБ обох антибіотиків містять ТТА-кодони, вирішено вивчити експресію ТТА-вмісних репортерів для нокаутних штамів. Аналізуючи експресію ТТА⁺-гена *SCO3479*, виявили, що $\Delta miaA$ RV3 проявляв β -галактозидазну активність лише за присутності індуктора кумату (оптимальна транскрипція репортера), тоді як

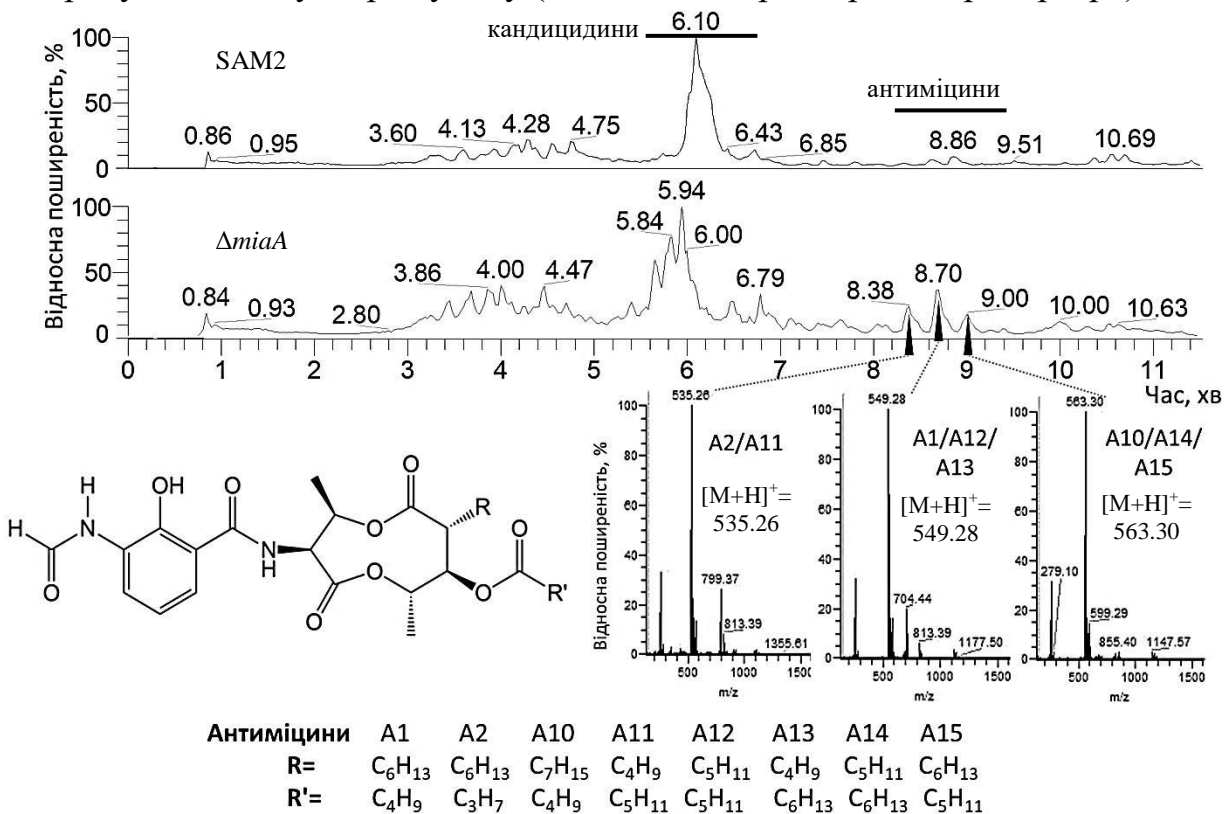


Рис. 5. Результати ВЕРХ-МС екстрактів SAM2 і $\Delta miaA$. Чорні трикутники позначають більш виражені піки сполук для $\Delta miaA$, порівняно з SAM2, m/z яких відповідають антиміцинам A2/A11 (8.38 хв), A1/A12/A13 (8.70 хв) та A10/A14/A15 (9.00 хв). По осі абсцис подано час виходу сполук у хв. За 100% відносної поширеності піків (вісь ординат) прийнято абсолютне значення абсорбції максимального піку серед представлених (в AU). Зображено хімічні формули згаданих антиміцинів.

SAM2 RV3 був здатний розщеплювати X-gal і за відсутності індуктора (базальна транскрипція репортера). Окрім цього, попри практично однакову активність промотора *adpA_{gh}* для мутантів та дикого типу, експресія трансляційного злиття ТТА-вмісного гена *adpA_{gh}* з репортером *gusA* в $\Delta miaA$ виявилась на третину нижчою, ніж для SAM2. Використали ТТА-вмісну версію гена (в складі pSAGAtta) та порівняли його експресію з ТТА-вільним *gusA* (в складі pSAGA) в SAM2 та $\Delta miaA$ (рис. 6). Виявили, що ТТА⁺ *gusA* в дикого типу експресується гірше на початку розвитку культури (перша доба), ніж ТТА⁻ *gusA*. Однак, для штаму $\Delta miaA$ експресія ТТА⁺ *gusA* розпочинається пізніше (друга-третья доби росту) та є нижчою, що, найімовірніше, свідчить про ускладнену трансляцію кодону UUA. Така трансляція може бути наслідком відсутності модифікації ms² іо⁶ A37 у складі тРНК^{Лей}_{UAA}.

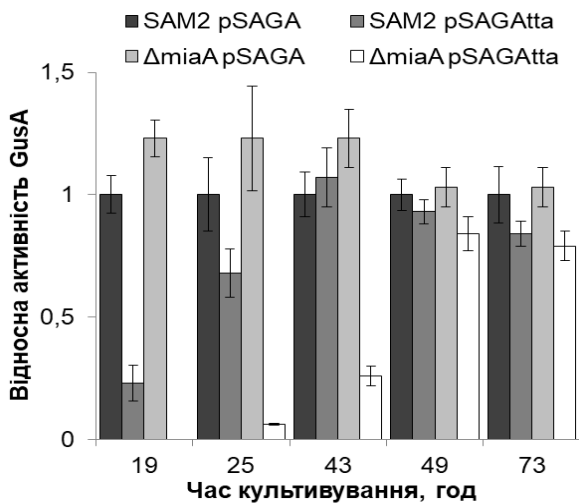


Рис. 6. Відносна β-глюкуронідазна (GusA) активність лізатів штамів стрептоміцетів, отриманих із рідких культур TSB, відібраних на вказані години росту. За одиницю для кожної години прийнято абсолютне значення (в од.акт/г) для лізату штаму SAM2 pSAGA на відповідну годину росту. Вказані середні значення трьох повторів та стандартні відхилення.

Враховуючи ускладнену експресію ТТА-вмісних генів/кластерів штамом $\Delta miaA$, вирішено провести комплементацию морфологічного фенотипу мутанта ТТА-вільним геном *adpA*. Для цього використали плазмиду pGM4181tta-. Виявили, що ТТА⁻ -версія гена *adpA* лише частково відновлює морфологічні дефекти $\Delta miaA$ (рис. 7). Також, нокаут гена *bldA* в штамі $\Delta miaA$ приводить до

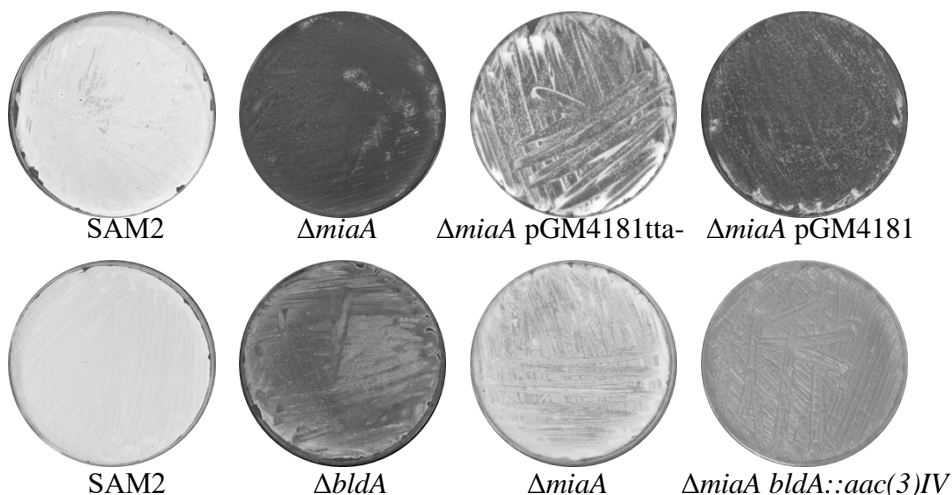


Рис. 7. Морфологічний фенотип штамів *S. albus*, вирощених на SFM при 30°C протягом двох (верхній ряд) чи п'яти (нижній ряд) діб.

виникнення ще більш дефектного морфологічного фенотипу штаму $\Delta miaA bldA::aac(3)IV$, ніж нокаут кожного гена окремо (*bldA* чи *miaA*; рис. 7).

Результати підтверджують, що морфотип $\Delta miaA$ не є абсолютно, а лише частково, залежним від ефективного функціонування тРНК^{Leu}_{UAA} та експресії UUA-вмісних транскриптів. Очевидно, модифікація і⁶A37 є необхідною для нормального функціонування низки інших тРНК. Останні, через трансляцію відповідних кодонів в складі мРНК, теж вносять свою роль в нормальний розвиток та метаболізм штаму SAM2.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ця робота є дослідженням механізмів трансляційного рівня регуляції експресії генів у стрептоміцетів. Вона є першою у вивченні таких життєво важливих процесів, як посттранскрипційні модифікації нуклеозидів тРНК, які раніше для цих організмів не досліджувались. У роботі ми пропонуємо нову експериментальну модель для вивчення згаданих регуляторних механізмів, на основі штаму *S. albus* SAM2, похідного від J1074 (Bilyk and Luzhetskyy 2014).

Шляхом додаткового внесення чи нокауту генів в SAM2, продукти яких безпосередньо чи опосередковано впливають на трансляцію, та подальшим аналізом мутантів, вдалося виявити нетривіальні ефекти на метаболізм. Ми використали штаму SAM2 для початкових досліджень впливу меродиплоїдного стану гена *rpsL*. Отримані меродиплоїдні штами містили дві різні версії гена (дикого типу і мутантний), а, отже, були здатні експресувати дві форми S12. В клітинах меродиплоїдів потенційно існує гетерогенна популяція рибосом (Calamita et al. 2018; Genuth and Barna 2018; Lilleorg et al. 2018). Наразі невідомо, яким є співвідношення двох популяцій рибосом. Можна припустити, що певна частка рибосом містить мутантний білок. На користь цього свідчить зміна фенотипів при внесенні різних додаткових алелів *rpsL* у меродиплоїдів. Ефекти, які справляє на клітини меродиплоїдних штамів *S. albus* потенційно гетерогенна за білком S12 популяція рибосом, різноманітні, та залежать від того, який саме додатковий алель *rpsL* внесено. І, хоч механізми виникнення цих фенотипів потребують подальшого дослідження, вже зараз можна звернути увагу на практичне значення кількох сконструйованих штамів, а саме L90K_ex та K88E+P91S_ex. Останні надпродукують антибіотики та становлять інтерес для вивчення та подальшого вдосконалення. Внизу наведено загальну схему вияву меродиплоїдного стану гена *rpsL* у *S. albus* (рис.8).

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

Ми зацікавились посттранскрипційними модифікаціями тРНК через наявність унікального регуляційного тандему у стрептоміцетів, а саме UUA-кодону та тРНК^{Leu}_{UAA}, що цей кодон розшифровує (Leskiw, Bibb, and Chater 1991; Takano et al. 2000; Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011; Hackl and Bechthold

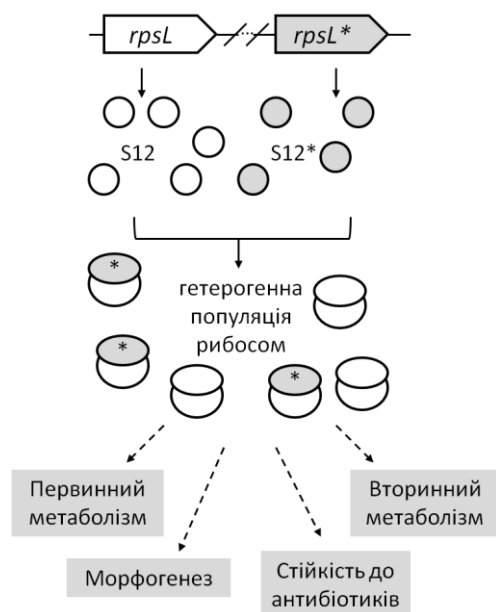


Рис. 8. Загальна схема прояву меродиплоїдного стану гена *rpsL* у *S. albus*. За рахунок наявності двох алелів гена *rpsL*, експресуються дві форми білка S12 – нативна та мутантна, що можуть включатись в структуру рибосом. Утворюється гетерогенна популяція рибосом в клітині, що, через низку процесів, веде до змін властивостей меродиплоїдів, як-от продукції вторинних метаболітів, стійкості до антибіотиків тощо.

2015). Тому створення мутанта *S. albus* $\Delta bldA$ і вивчення його властивостей – необхідні передумови дослідження мутантів за генами модифікацій тРНК. Слід наголосити, що біохімічний контроль Міа-шляху добре вивчено на модельних об'єктах, і він не був у фокусі цієї роботи. Ми зосередились на вивченні фізіологічних наслідків нокауту генів Міа-шляху в стрептоміцетів.

Мутант *S. albus* $\Delta bldA$ не виявляв класичного Bald-фенотипу (гладкі блискучі колонії без повітряного міцелію), описаного для інших стрептоміцетів. Лише за певних умов спостерігали дефекти росту штаму $\Delta bldA$, однак мутант формував повітряний міцелій і спори практично на всіх твердих середовищах. Зважаючи на результати експресії репортерного злиття *adpA-gusA* в $\Delta bldA$, можна припустити, що TTA-кодону в складі гена *adpA* може на низькому рівні містранслюватись за відсутності тРНК^{Leu}_{UAA}. Імовірно, в штамі $\Delta bldA$ утворюється достатня кількість білка AdpA для бодай часткового проходження циклу морфологічного розвитку. Втім, не виявлено жодних ознак експресії інших TTA-вмісних генів для $\Delta bldA$.

Враховуючи те, що раніше біосинтез Міа-залежних модифікацій позиції A37 тРНК для стрептоміцетів не описаний, опираючись на результати цієї роботи, пропонуємо наступну послідовність кроків для SAM2 (рис.9): (1) утворення модифікації N6-ізопентеніладенозину (i^6A37), що каталізує функціональний гомолог МіаА, XNR_1074; (2) утворення 2-метилтіо- i^6A (ms^2i^6A37), що є продуктом каталізу XNR_1078, функціонального гомолога МіаВ; (3) фінальним кроком є гідроксилювання ізопентенілового залишку, як в складі i^6A37 так і в ms^2i^6A37 з утворенням io^6A37 та ms^2io^6A37 , відповідно, функціональним гомологом МіаЕ, наразі невідомим для SAM2.

Делеція гена *XNR_1074* (*miaA*) веде до затримки морфологічного розвитку *S. albus* та зміни вторинного метаболізму в бік накопичення антиміцинів, при цьому, КГБ антибіотиків, що містять ТТА-кодони, практично не експресуються. Морфогенез знаходиться під контролем глобального

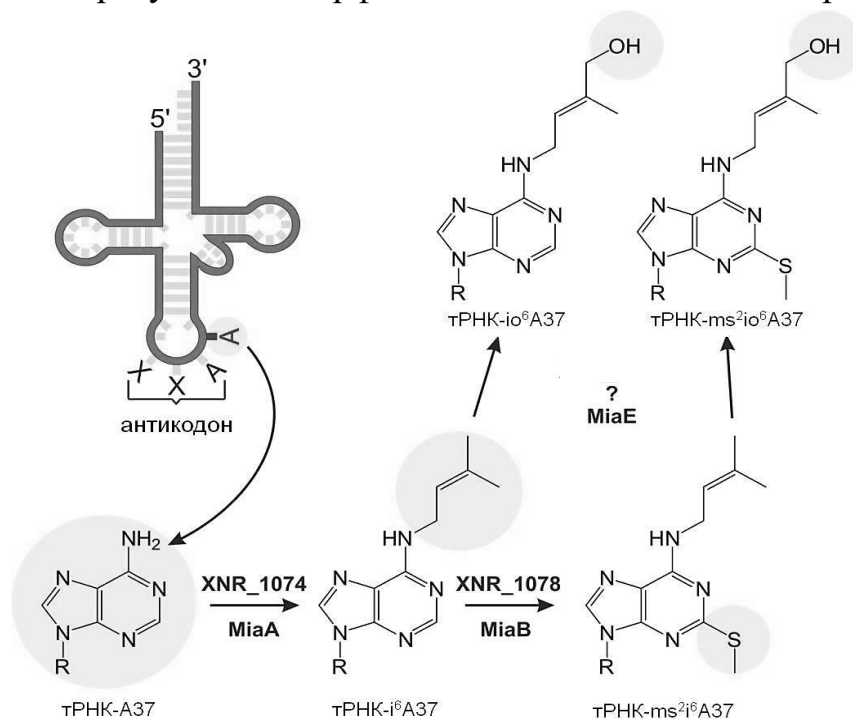


Рис. 9. Mia-залежні модифікації позиції A37 тРНК_{X_{ХХА}} для *S. albus* SAM2.

регулятора AdpA (Nguyen et al. 2003), ген якого містить ТТА-кодон та який, за нашими даними, транлюється на нижчому рівні у штамі $\Delta miaA$. Експресія ТТА-вмісних репортерів (pSAGAtta, pRV3) відбувається слабкіше у штамі $\Delta miaA$. Це помітно за умов низької транскрипції гена (без індуктора кумату у випадку pRV3⁺-штамів) чи на ранніх стадіях росту (pSAGAtta, рис.5). Отже, поперше, експресія ТТА-вмісних генів у штамі $\Delta miaA$ ускладнена. По-друге, чим вищий рівень транскрипції ТТА-вмісного гена (тобто, чим більша кількість UUA-вмісної мРНК), тим вища імовірність ефективної експресії такого гена в $\Delta miaA$. Ми припускаємо кілька причин описаних ефектів: (1) тРНК^{Лей}_{UAA} не здатна ефективно розшифровувати UUA без модифікації ms²i⁶A37; (2) ефективна трансляція UUA-мРНК залежить від рівня транскрипції ТТА-вмісного гена, чим він вищий – тим вища імовірність прочитання UUA кодонів немодифікованою тРНК; (3) можливо, через часову затримку розвитку культури $\Delta miaA$, накопичення тРНК^{Лей}_{UAA} відбувається набагато повільніше, ніж у SAM2, що є перепоною для функціонування регуляторної петлі BldA-AdpA (Higo, Horinouchi, and Ohnishi 2011).

Морфологічний фенотип $\Delta miaA$ комплементується геном *adpA*, в якому ТТА кодон замінений на СТС, але лише частково (рис.7). Фенотипи $\Delta miaA$ і $\Delta bldA$ частково подібні. Для того, щоб з'ясувати, чи фенотип $\Delta miaA$ повністю проявляється через тРНК^{Лей}_{UAA}, ми сконструювали подвійного мутанта $\Delta miaA bldA::aac(3)IV$. Якщо ефекти мутації *miaA* опосередковано лише через тРНК^{Лей}_{UAA}, то $\Delta bldA\Delta miaA$ мутант мав би виявляти фенотип штаму $\Delta bldA$.

Однак, морфотип подвійного мутанта є більш дефектним, ніж фенотипи одинарних мутантів, отже наше припущення хибне. Очевидно, й інші Міа-залежні тРНК та гени, що містять відповідні кодони, є важливими для проходження нормального морфологічного розвитку штамом SAM2.

Хоча морфологічні та метаболічні дефекти $\Delta miaA$ викликані порушенням декодуванням не тільки кодонів UUA, експресія генів із ТТА-кодонами у $\Delta miaA$ однозначно має суттєвий внесок у досліджені нами явища. Кодон ТТА представлений виключно в генах, що не є життєво важливими, зокрема і в генах морфогенезу й синтезу антибіотиків. Тому кодон UUA і тРНК^{Лей}_{UAA} можна вважати модельною системою для дослідження ролі посттранскрипційних модифікацій тРНК у біології прокариотів. Перевагами такої системи є відносно невелика кількість генів, в складі яких присутні ТТА кодон(и); життєва неважливість цих генів; наявність лише однієї копії гена *bldA*, продуктом якого є єдина тРНК^{Лей}_{UAA}, що цей кодон декодує, а також виразні фенотипи, які є результатом неоптимального функціонування згаданої тРНК. Зокрема, до таких фенотипів можна віднести морфологічні дефекти і зміни продукції вторинних метаболітів, КГБ яких або містять ТТА-кодони, або контролюються BldA-залежними регуляторами. Тому, при описанні ролі модифікації ms²iо⁶A37 в *S. albus*, як приклад, ми використовуємо тРНК^{Лей}_{UAA} та гени з ТТА-кодонами, що вона розкодує (рис.10). При цьому варто пам'ятати, що реалізація функції




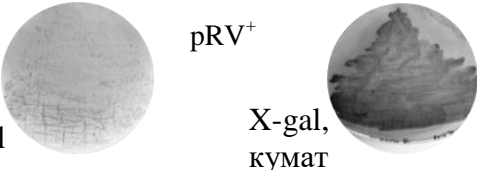

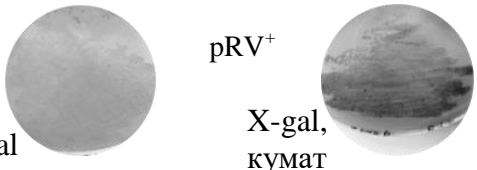
	SAM2 тРНК ^{Лей} _{UAA} -ms ² iо ⁶ A37	$\Delta miaA$ тРНК ^{Лей} _{UAA} -A37
Вегетативний ріст	<ul style="list-style-type: none"> Низька концентрація тРНК Гіпомодифіковані тРНК  <p>Неефективна трансляція UUA-вмісних мРНК</p>	<ul style="list-style-type: none"> Низька концентрація тРНК Відсутність модифікації  <p>Абортивна трансляція UUA-вмісних мРНК</p>
Утворення повітряних гіфів і спор	<ul style="list-style-type: none"> Підвищення концентрації тРНК Зрілі тРНК <p>Ефективна трансляція UUA-вмісних мРНК...</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> Морфогенез, спорулювання Синтез ТТА-залежних ВМ </div> <p>...незалежно від кількості мРНК</p>  <p>X-gal pRV⁺ X-gal, кумат</p>	<ul style="list-style-type: none"> Підвищення (сповільнене) концентрації тРНК Відсутність модифікації <p>Ускладнена трансляція UUA-вмісних мРНК...</p>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> Ускладнений та сповільнений морфогенез Відсутній синтез ТТА-залежних ВМ </div> <p>...та вища імовірність трансляції при високих кількостях мРНК</p>  <p>X-gal pRV⁺ X-gal, кумат</p>

Рис. 10. Роль модифікації ms²iо⁶A37 в метаболізмі *S. albus* на прикладі лейцил-тРНК та кодону UUA, що декодується цією тРНК.

ms^2io^6A37 відбувається і через пул інших тРНК_{ХХА} та трансляцію їхніх відповідних кодонів. Отже, Міа-контрольовані модифікації тРНК відіграють важливу роль в нормальному розвитку культури, а їх відсутність веде до виникнення складних фенотипів. Цікавим напрямком стало б дослідження внеску модифікації ms^2io^6A37 (і інших модифікацій тРНК) на експресію кластерів генів біосинтезу різних класів антибіотиків. Швидше всього, така експресія значним чином залежить від кодонного складу генів вторинного метаболізму.

Окремо слід відзначити практичне значення отриманих результатів. За матеріалами роботи опубліковано патент України на корисну модель “Спосіб підвищення продукції полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074”, що полягає у додатковому внесенні алеля $rpsL^{L90K}$ (Кошла та Осташ 2017). Враховуючи, що отриманий меродиплоїд L90K_ex надсинтезує аранціаміцин (майже у п'ять разів, порівняно з диким типом), штам може служити як основа для подальшого вдосконалення надпродуцентів полікетидних антибіотиків. Виявлено надсинтез кандидинів штамом $\Delta bldA$, порівняно з диким типом (Koshla et al. 2017) та надсинтез антиміцинів штамом $\Delta miaA$ (Koshla et al. 2019). Обидва штами є цікавими для подальшого вивчення докладних механізмів надсинтезу згаданих антибіотиків та вдосконалення, як надпродуцентів.

ВИСНОВКИ

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

1. Поєднання у геномі *Streptomyces albus* SAM2 алелів гена рибосомного білка S12 дикого типу та його алеля з точковими мутаціями викликає низку фенотипових змін. Так, внесення мутантного алеля гена $rpsL^{G192}$ порушує нормальний перебіг морфогенезу на агаризованих середовищах, а внесення $rpsL^{K88E}$ підвищує стійкість до стрептоміцину. Стрептоміцин-стійкість останнього штаму на пізніх стадіях росту можна тлумачити як поступове накопичення в культурі рибосом, які містять мутантний білок S12(K88E).

2. Внесення алеля $rpsL^{L90K}$ у штам SAM2 виявляється у надпродукції гетерологічного антибіотика аранціаміцину та активізації ендogenous вторинного метаболізму. Штам *Streptomyces albus* L90K_ex є перспективним для подальшого вдосконалення та використання як господаря для надекспресії кластерів генів біосинтезу полікетидних антибіотиків.

3. Делеція гена $bldA$ у *Streptomyces albus* SAM2 призводить до кондиційних (залежних від умов вирощування) порушень морфогенезу, однак не спричинює повного блокування розвитку повітряного міцелію і спор. Штам

ΔbldA практично не продукує пауломіцину – власного антибіотика *S. albus*, гени біосинтезу якого містять ТТА-кодони. Незначний рівень експресії *ΔbldA* мутантом деяких ТТА-вмісних репортерних генів вказує на містрансляцію цього кодону, зокрема, у складі гена плейотропного транскрипційного фактора *adrA*.

4. В *Streptomyces albus* SAM2 ген *XNR_1074 (miaA)* кодує тРНК (аденозин (37)-N6)-диметилалілтрансферазу, а ген *XNR_1078 (miaB)* – тРНК (N6-ізопентеніл аденозин (37)-C2)-метилгіоттрансферазу, що задіяні в синтезі гіпермодифікованого залишку аденозину, ms²io⁶A37, в 37-й позиції тРНК_{ХХА}.

5. Делеція гена *miaA* в *Streptomyces albus* SAM2 призводить до суттєвого гальмування росту та морфологічного розвитку, та пригнічення експресії кластерів генів вторинного метаболізму, що містять гени з ТТА кодонами. Делеція гена *miaB* не мала суттєвого впливу на ріст і морфологічний розвиток *S. albus*.

6. Порівняно із диким типом, *ΔmiaA* мутант накопичує підвищені кількості антиміцинів та виявляє підвищену чутливість до пероксиду водню. Цей мутант також відрізняється від батьківського штаму за ростом і синтезом вторинних метаболітів за культивування при підвищених температурах (37 °C і 42 °C).

7. Морфологічні та метаболічні дефекти *ΔmiaA* мутанта особливо виразні на початкових етапах розвитку (24-48 год росту) і викликані неефективним декодуванням не лише кодона UUA, але й інших кодонів родини UXX.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

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

5. Sehin, Y., **O. Koshla**, Y. Dacyuk, R. Zhao, R. Ross, M. Myronovskyi, P. Limbach, A. Luzhetskyu, S. Walker, V. Fedorenko, and B. Ostash. 2019. “Gene *ssfg_01967* (*miaB*) for tRNA Modification Influences Morphogenesis and Moenomycin Biosynthesis in *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672.” *Microbiology* 165(2):233–245. doi:10.1099/mic.0.000747. Внесок здобувача – виділення загальної фракції тРНК зі штамів *S. ghanaensis*, аналіз посттранскрипційних модифікацій тРНК та обговорення результатів.

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

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

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

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

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

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

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

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

14. **Koshla, O.**, I. Rokytskyu, J. Sehin, L. Kirsebom, A. Luzhetskyu, and B. Ostash.

2017. “Switch of the Switch? Posttranscriptional tRNA Modifications as Regulators in *Streptomyces* Biology.” Abstracts of EMBO conference Bacterial networks (BacNet17), Sant Feliu de Guixols, Spain, September 9-14.
15. Борис, О., та **О. Кошла**. 2017. “Антибіотична активність штамів *Streptomyces albus* SAM2, меродиплоїдних за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнар. конф. молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.
16. Кравець, В., та О. Кошла. 2017. “Деякі властивості мутантних штамів *Streptomyces albus* SAM2 за геном *rpsL*.” Матеріали XII Міжнар. конф. молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, Листопад 29 – Грудень 1.
17. **Koshla, O.**, Y. Sehin, and B. Ostash. 2018. “The Role of *miaA* and *miaB* Genes in *Streptomyces albus* SAM2 Metabolism.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
18. Sehin, Y., **O. Koshla**, and B. Ostash. 2018. “Streptomycete Genes Controlling Post-transcriptional Modification of tRNA with ХАА Anticodons.” Abstracts of XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, April 10–12.
19. Борис, О., **О. Кошла**, та Б. Осташ. 2018. “Синтез антибіотиків штамми *Streptomyces albus*, що містять *rpsL* мутації отримані за допомогою спонтанного мутагенезу та генетичної інженерії.” Збірник тез доповідей XIV Міжнар. конф. студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.
20. Кравець В., **О. Кошла**, та Б. Осташ. 2018. “Деякі властивості *miaA*- та *miaB*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2.” Збірник тез доповідей XIV Міжнар. конф. студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 10–12.
21. **Koshla, O.**, O. Yushchuk, I. Ostash, V. Kravets, R. Suessmuth, G. Jäger, A. Bystrom, B. Ostash, and V. Fedorenko. 2018. “Post-transcriptional Modifications of tRNA Modulate Secondary Metabolism of *Streptomyces*.” Program and Abstracts Book for International conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”, Lviv, October 29–31.
22. Кравець, В., Б. Осташ, та **О. Кошла**. 2019. “Властивості *mia*-мутантів *Streptomyces albus* SAM2”. Збірник тез доповідей XV Міжнар. конф. студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, Квітень 9–11.

АНОТАЦІЯ

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

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

У роботі запропоновано нову експериментальну модель для вивчення процесів та механізмів, що впливають на експресію певних груп генів через зміни в будові деяких компонентів трансляційного апарату, на основі штаму *Streptomyces albus* SAM2. Охарактеризовано вплив додатково внесених мутантних алелів гена *rpsL* на фенотип та вторинний метаболізм згенерованих меродиплоїдних штамів. Сконструйовано та описано властивості мутанта *S. albus* за геном *bldA*, що кодує єдину тРНК^{Leu}_{UAA} для UUA кодону. Ідентифіковано можливих ортологів білків, що посттранскрипційно модифікують нуклеозиди тРНК стрептоміцетів. Вперше сконструйовано нокаутні штами *S. albus* за генами, що кодують ортологів MiaA та MiaB, описані їх властивості. Доведено роль цих генів в утворенні гіпермодифікованої позиції ms²io⁶A37 частини тРНК з антикодонами ХХА досліджуваних штамів. Обговорені та пояснені можливі механізми, що приводять до фенотипових змін досліджуваних штамів. На різних етапах цієї роботи описано конструювання штамів, що надпродукують ті чи інші класи антибіотиків.

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

АННОТАЦИЯ

Кошля О.Т. Изучения механизмов трансляционной регуляции экспрессии генов в *Streptomyces albus* SAM2. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика (091 – Биология). – ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины”, Киев, 2019.

В работе предложена новая экспериментальная модель для изучения процессов и механизмов, влияющих на экспрессию определенных групп генов из-за изменений некоторых компонентов трансляционного аппарата, на примере штамма *Streptomyces albus* SAM2. Охарактеризовано влияние дополнительно внесенных мутантных аллелей гена *rpsL* на фенотип и вторичный метаболитизм созданных меродиплоидных штаммов. Сконструированы и описаны свойства мутанта *S. albus* по гену *bldA*, кодирующего единственную тРНК^{Leu}_{UAA} для кодона UUA. Идентифицированы возможные ортологи белков, которые посттранскрипционно модифицируют нуклеозиды тРНК стрептомицетов. Впервые сконструированы нокаутные штаммы *S. albus* по генам, что кодируют ортологов MiaA и MiaB, описаны их свойства. Доказана роль этих генов в образовании гипермодифицированной позиции ms²io⁶A37 части тРНК с антикодонами ХХА. Обсуждены и объяснены возможные механизмы, что приводят к фенотипическим изменениям штаммов.

Ключевые слова: *S. albus* SAM2, трансляция, меродиплоид, тРНК, посттранскрипционные модификации тРНК.

ANNOTATION

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

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

In this work we have established a new experimental model for studying the mechanisms and processes which change expression of certain gene groups via manipulations of translational machinery components. *Streptomyces albus* SAM2 was chosen as a model organism.

Using SAM2, we studied influence of merodiploid state of *rpsL* gene (encodes S12 ribosomal protein) on *Streptomyces* metabolism. In particular, presence of two different alleles of *rpsL* in one genome confers the strains to ability to produce heterogeneous population of ribosomes carrying either wild type or mutated S12 proteins. The impact of such mixed ribosomal population on antibiotic production is unclear, as well as molecular mechanisms linking the former to a variety of phenotypes. Merodiploids showed altered phenotypes depending on the type of S12 aminoacid substitution encoded by additional *rpsL* alleles. Strain L90K_ex showed the highest increases in antibiotic titers. Therefore, merodiploids are of practical interest as a platform for strain improvement.

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

The generation of *bldA* gene knock-out was necessary part of this work, since the properties of *bldA* mutant for *S. albus* were not described. The $\Delta bldA$ strain did not reveal classic “Bald colony” phenotype and was able to form aerial mycelium and spores on most solid mediums. However, strain did not produce metabolites directed by gene clusters carrying TTA-containing (TTA⁺) genes. The $\Delta bldA$ did not express TTA⁺ reporter gene *SCO3479* (*lacZ*). Yet, we were able to detect low level of *adpA-gusA* reporter fusion expression. This could be the evidence for UUA mistranslation in *adpA*-mRNA in the absence of tRNA^{Leu}_{UAA}. It is possible that *adpA* expression in *S. albus* is not under strict translational control of tRNA^{Leu}_{UAA} and low amount of AdpA in $\Delta bldA$ is enough to escape morphological arrest. *bldA* knock-out resulted in candicidin overproduction. Hence, depletion of tRNA^{Leu}_{UAA} could be an interesting

strategy for overexpression of TTA-independent antibiotics. The detailed mechanisms of such activation of secondary metabolism require future studies.

For *S. albus* J1074 strain a large group of genes was bioinformatically identified that possibly control formation of different tRNA modifications. It was decided to study two of those genes, *XNR_1074* and *XNR_1078*, encoding possible MiaA and MiaB orthologues, respectively. It is known that Mia-proteins take part in ms²i⁶A37 formation for most tRNA_{XXA}. tRNA^{Leu}_{UAA} could be one of those. We generated *XNR_1074* and *XNR_1078* knockouts for deeper study of mentioned genes role in SAM2. The final product of Mia-dependent modifications in wild type is ms²io⁶A37 derivative. Sequential action of proteins MiaA (*XNR_1074*), MiaB (*XNR_1078*) and MiaE yields the final hypermodified nucleoside. We were not able to unambiguously identify MiaE homolog in SAM2.

We studied the properties of $\Delta miaA$ and $\Delta miaB$ strains. Knock-out of *miaB* practically does not affect morphology of native secondary metabolites production, but reduces the accumulation of *bldA*-dependent aranciamycin and moenomycin. At the same time, the *miaA* knock-out leads to considerable delay in morphological differentiation (as compared to SAM2), and practically abolished production of TTA-containing antibiotics. Interestingly, $\Delta miaA$ overproduced different forms of antimycins. Strains $\Delta miaA$ and $\Delta bldA$ exhibited similar phenotypes. Besides, expression of TTA-containing reporter genes was affected in $\Delta miaA$. Lower level of *adpA* expression and delay of TTA⁺-*gusA* expression was detected for $\Delta miaA$. Considering partial complementation of $\Delta miaA$ phenotype with TTA-free *adpA*, we assume that delayed and complicated expression of TTA-containing genes could be the component of defective $\Delta miaA$ phenotype. It is possible that the absence of ms²io⁶A37 in tRNA^{Leu}_{UAA} complicates UUA decoding.

The Mia-proteins modify not only tRNA^{Leu}_{UAA} but a wider set of other tRNA_{XXA}, which also contribute to normal metabolism of SAM2. The double mutant *S. albus* $\Delta mia/bldA::aac(3)IV-oriT$ phenotype support such a conjecture, since it exhibited morphogenetic defects more severe than that of single mutants $\Delta miaA$ or $\Delta bldA$. In summary, tRNA modifications are important for *Streptomyces* metabolism and their absence results in specific phenotypes. The mechanisms of such phenotypes formation and role of tRNA modifications in expression of particular gene groups deserve further studies for fundamental and practical reasons.

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

Підписано до друку 12.12.19
Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Друк на різнографі. Зам. №12/12-1
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Видавництво “Галич-Прес”
Видавець ФОП Король І.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924
Свідоцтво ДК №5353 від 24.05.2017 р.