

Львівський національний університет імені Івана Франка

Біологічний факультет

Кафедра генетики та біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА

на тему:

*Криптичні гени транспортування у геномах Streptomyces: вивчення  
методами надекспресії*

**Виконала:**

Студентка IV курсу, групи БЛБ-43  
спеціальності 091 – Біологія

Багрійчук Катерина Вікторівна

**Керівник:** канд. біол. наук, доц.

Осташ Ірина Степанівна

**Рецензент:**

Галушка Андрій Андрійович



## ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Біологічний факультет

Кафедра генетики та біотехнологіїОсвітньо-кваліфікаційний рівень бакалавр  
(шифр і назва)Спеціальність 091–біологія  
(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Шемичкина  
Вікторія Іванівна  
"14" вересня 2022 рокуЗАВДАННЯ  
НА ДИПЛОМНУ (КВАЛІФІКАЦІЙНУ) РОБОТУ СТУДЕНТУБагрійчук Катерини Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Критичні гени транспортування у геномах Streptomyces:  
вивчення методами надекспресіїкерівник роботи Осташ Ірина Степанівна, канд. біол. наук, доцент

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)



затверджені Вченою радою факультету від "\_\_\_" 202\_ року № \_\_\_\_\_

2. Строк подання студентом роботи червень 2022 р.3. Вихідні дані до роботи джерела літератури й отримані експериментальні  
дані4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно  
розробити) Вступ, Розділ 1. Огляд літератури, Розділ 2. Матеріали та  
методи досліджень, Розділ 3. Результати та обговорення, Висновки, Список  
літератури

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

3 таблиці, 13 рисунків

6. Консультанти розділів роботи

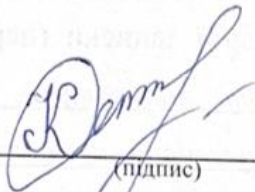
Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Огляд літератури	Осташ І.С.		
Експериментальна частина	Осташ І.С.		

7. Дата видачі завдання вересень 2019 р.

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

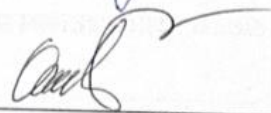
№ з/п	Назва етапів дипломної (кваліфікаційної) роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Опрацювання наукової літератури за темою роботи	Вересень-грудень 2021 – січень-березень 2022	виконано
2.	Оволодіння методикою досліджень	Вересень – грудень 2021	виконано
3.	Проведення експериментів	Вересень 2021 – лютий 2022	виконано
4.	Опрацювання результатів	Лютий – травень 2022	виконано
5.	Оформлення роботи	Квітень – травень 2022	виконано

Студентка

  
(підпис)

**Багрійчук К.В.**  
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

  
(підпис)

**Осташ І.С.**  
(прізвище та ініціали)

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Механізми стійкості до тетрациклінів, рифампіцину, левоміцетину, новобіоцину, еритроміцину .....	6
1.1.1 Механізм стійкості до тетрацикліну.....	6
1.1.2. Механізм стійкості до рифампіцину.....	7
1.1.3. Механізм стійкості до хлорамфеніколу.....	8
1.1.4. Механізм стійкості до новобіоцину.....	9
1.1.5. Механізм стійкості до еритроміцину.....	10
1.2. Гени стрептоміцетів, що надають множинну стійкість до антибіотиків..	11
1.2.1 Взаємозв'язок між множинною стійкістю та кворумною системою (Quorum sensing).....	13
1.3. Ангуцикліни – потенційні протиракові агенти .....	15
1.3.1 Біосинтез ландоміцинів.....	16
1.3.2 Жадоміцини, як протиракові агенти.....	17
1.4. Характеристика транспортерів родини MmpI та RND транспортери .....	19
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1 Матеріали досліджень.....	22
2.2 Методи.....	25
2.2.1 Міжродова кон'югація <i>Escherichia coli</i> – <i>Streptomyces</i> .....	25
2.2.2 Біотест для визначення антибіотичної активності.....	26
2.2.3 Екстрагування вторинних метаболітів.....	26

2.2.4	ТШХ (тонкошарова хроматографія).....	26
2.2.5	Отримання компетентних клітин <i>E.coli</i> .....	27
2.2.6	Виділення плазмідної ДНК з <i>E. coli</i> .....	27
2.2.7	Трансформація клітин <i>E. coli</i> .....	27
2.2.8	Електрофорез зразків в агарозному гелі та елюювання фрагментів ДНК.....	28
2.2.9	Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	28
2.2.10	Лігування фрагментів.....	28
2.2.11	Обробка ДНК ендонуклеазами рестрикції та картування плазмід.....	29
3.	РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
3.1.	Конструювання плазмід для надекспресії генів.....	31
3.1.1.	Конструювання плазмід експресії гена протонзалежного транспортера <i>udfJ2</i> .....	31
3.1.2	Конструювання плазмід експресії гена регулятора <i>S1361_17020</i> .....	33
3.2.	Екстрагування вторинних метаболітів зі штамів та тонкошарова хроматографія.....	36
3.3	Визначення антибіотичної активності.....	38
3.4.	Конструювання штамів <i>S.ghanaensis</i> (dO5(pTES), dO5(pVAVi21), dO5(pVMC)).....	42
3.4.1	Конструювання штаму <i>S.ghanaensis</i> dO5 (pVAVi21).....	42
3.4.2	Конструювання штаму <i>S.ghanaensis</i> dO5 (pVMC).....	43
3.5	Аналіз росту штамів на різних середовищах.....	45
3.6	Дослідження антибіотичної активності транскон'югантних штамів.....	46
	ВИСНОВКИ.....	48
	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	49

## ВСТУП

Вторинні метаболіти бактерій є одними з найважливіших джерел клінічно важливих антибіотиків, імуносупресантів, інсектицидів та інших біологічно активних сполук. Представники бактерій роду *Streptomyces* добре відомі своєю здатністю виробляти широкий спектр вторинних метаболітів, включаючи антибіотики, протигрибкові засоби, протипухлинні засоби тощо. Відкриття нових та збільшення кількості відомих вже вторинних метаболітів залишається актуальним питанням, а метод надекспресії генів є одним з ключових для активації мовчазних кластерів чи підняття рівня біосинтезу вторинних метаболітів.

Бактерії штаму *Streptomyces cyanogenus* S136 синтезують вторинні метаболіти ангуциклінового ряду – ландоміцини. Ландоміцини мають протиракову активність та діють на ракові клітини з множинною стійкістю. Біосинтез ландоміцинів добре досліджений у цьому штамі. Проте, механізм стійкості до ландоміцинів у штамі-продуценті не встановлений. Трансмембранні помпи – білки, що часто виступають факторами резистентності як продуцентів антибіотиків, так і патогенних бактерій. Попри ключову роль помп у стійкості до антибіотиків, ці білки мають значний вплив на рівень синтезу вторинних метаболітів. Наприклад, надекспресія генів *drrAB* призвела до підвищення синтезу доксорубіцину у *S. peucetius*, а підвищений рівень рифампіцину можливий завдяки надекспресії гена транспортера *rifP* в *Amycolatopsis refamycinica*. Загалом, транспорт антибіотика з клітин продуцента можна розглядати як один з етапів його синтезу. Тому вивчення функції і впливу генів транспортерів вторинних метаболітів має важливе біотехнологічне значення для розробки надпродуцентів антибіотиків.

Метою цієї роботи було дослідити вплив низки генів, які кодують трансмембранні білки транспортери, на вторинний метаболізм *S. cyanogenus*, *S. albidoflavus*, *S. ghanaensis*.

**Об'єкти роботи:** *S. cyanogenus*, *S. albidoflavus*, *S. ghanaensis*.

**Предмет роботи:** гени-транспортери та регулятори *S1361\_17020*, *ydfJ2*, *XNR\_2146*, *XNR\_4573*

Для досягнення мети поставлено наступні **завдання**:

- 1) Дослідити роль генів *ydfJ2* та *S1361\_17020* в транспорті ландоміцинів та вплив його надекспресії на вторинний метаболізм *S. cyanogenus*
- 2) Встановити вплив надекспресії генів *ydfJ2* та *S1361\_17020* на стійкість до ландоміцинів та інших антибіотиків *S. albidoflavus*
- 3) Провести міжвидову кон'югацію штамів *S.ghanaensis* dO5 (pVMC), dO5(pAVI21)
- 4) Проаналізувати морфологію штамів do5(pTES), dO5(pVMC), dO5(pAVI21) на різних середовищах
- 5) Оцінити та порівняти антибіотичну активність штамів do5(pTES), dO5(pVMC), dO5(pAVI21)

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Механізми стійкості до тетрациклінів, рифампіцину, левоміцетину, новобіоцину, еритроміцину

#### 1.1.1 Механізм стійкості до тетрацикліну

Тетрациклінові антибіотики добре відомі своїм широким спектром дії, що охоплює грам-позитивних і грам-негативних бактерій, спірохет, облігатних внутрішньоклітинних бактерій, а також найпростіших паразитів [11].

Стійкість до тетрациклінів зазвичай пояснюється такими причинами: появою мобільних генетичних елементів, що несуть гени стійкості до тетрацикліну, мутаціями в рибосомах на місці зв'язування та хромосомними мутаціями, що призводять до посилення експресії внутрішніх механізмів резистентності [11]. Отже, описано кілька основних механізмів, специфічних для класу тетрациклінів: викачування за допомогою транспортерів, захист рибосом та ферментативна інактивація тетрациклінових препаратів.

Найпоширенішим механізмом резистентності до тетрацикліну є активний транспорт з клітин патогенів, наразі визначено 28 різних класів помп. Менш поширені механізми резистентності включають дію продуктів двох різних генів. Перший тип генів кодує монооксигенази, які модифікують тетрацикліни та сприяють їх деградації. Другий тип поява гена 16S рРНК з мутаціями, які знижують зв'язування препарату з рибосомою [21].

Іншим механізмом, який використовується для регуляції генів стійкості до *tet*, є негативний контроль за допомогою білка-репресора Tet (TetR). За відсутності тетрацикліну TetR зв'язується як гомодимер з двома тандемно орієнтованими *tet*-операторами, щоб блокувати транскрипцію трансмембранної помпи. Однак у присутності тетрацикліну препарат

зв'язується з TetR, який відокремлюється від tet-оператора, таким чином індуючи транскрипцію та індукцію експресії гена *tetA* [21].

Тетрацикліни переважно зв'язуються з бактерійними рибосомами та взаємодіють з висококонсервативною мішенню 16S рибосомної РНК (рРНК) у 30S рибосомній субодиниці, таким чином зупиняючи трансляцію шляхом втручання аміноацил-трансферної РНК (тРНК) під час пролонгації [11].

Тетрациклінові рибосомні протеїни (RPP – Tetracycline ribosomal protection protein) є ГТФазами зі значною послідовністю і структурною схожістю з факторами елонгації EF-G і EF-Tu. Ці білки каталізують GTP-залежне вивільнення тетрацикліну з рибосоми. Конформаційні зміни, індуковані RPP, сприяють швидкому зв'язуванню потрійного комплексу, що дозволяє продовжувати трансляцію в присутності тетрацикліну. Механізми RPP надають стійкість до тетрацикліну, моноцикліну та доксицикліну [11,21].

Оскільки більшість бактерій мають декілька копій рРНК, мутації рРНК на основі мішені, що надають стійкість до тетрацикліну, зазвичай виявляються у бактерій з низьким числом копій гена рРНК [11,21].

### **1.1.2. Механізм стійкості до рифампіцину**

Рифампіцин здатен зв'язуватися з каналом виходу мРНК на  $\beta$ -субодиниці бактерійної ДНК-залежної РНК-полімерази, у свою чергу, перешкоджаючи елонгації транскрипту [20].

Стійкість до антибіотика рифаміцину переважно обумовлена точковими мутаціями в мішені, субодиниці  $\beta$  РНК-полімерази. Рифампіцин ADP-рибозилтрансфераза міститься в багатьох грамнегативних резистентних плазмідах.

Більшість мутацій, відповідальних за резистентність до RIF, поділено на три різні локуси, які називають RIF-кластером I, RIF-кластером II і RIF-кластером III, поблизу центру гена *rpoB* [22].

Загалом ідентифіковано три механізми групового перенесення стійкості до рифампіцину: рибозилування АДФ, фосфорилування та глікозилування [28].

Домінуючим механізмом резистентності до RIF є мутація мішені (*rpoB*), де заміни однієї амінокислоти в білку можуть забезпечити високий рівень резистентності. Крім того, ще один механізм стійкості - здатність інактивувати рифампіцин шляхом ферментативної модифікації, змінюючи рифампіцин настільки, що антибіотик не може зв'язуватися зі своєю мішенню [28].

Для бактерій роду *Streptomyces* стійкість до рифампіцину підвищується під час заміни серину 531 на аспарагін у поліпептидному ланцюзі  $\beta$ -субодиниці РНК-полімерази [19].

Крім мутацій у  $\beta$ -субодиниці РНК-полімерази, стрептоміцети можуть надавати стійкості за рахунок глікозилування рифампіцину. Цей процес вперше описано для *S. speibonae*. У бактерій досліджено рамку зчитування *rgt1438*, функцією якої є стійкість до антибіотика. Також для актиноміцетів відкрито регуляторний елемент, який складається з двох повторів, що містять в собі дев'ять нуклеотидів та спейсер між ними. За наявності цього елемента збільшується експресія генів модифікаторів антибіотика [27].

### **1.1.3. Механізм стійкості до хлорамфеніколу**

У прокаріотів хлорамфенікол (Сm) є високоспецифічним і потужним інгібітором біосинтезу білка. Сm-залежне інгібування біосинтезу білка бактеріями в основному пов'язане з попередженням подовження пептидного

ланцюга. Субстратний спектр Cm включає грампозитивні та грамнегативні, аеробні та анаеробні бактерії, а також хламідії, мікоплазми та рикетсії [26].

Найчастішим механізмом стійкості бактерій до хлорамфеніколу є ферментативна інактивація шляхом ацетилювання препарату різними типами хлорамфеніколацетилтрансфераз. Хлорамфеніколацетилтрансферази (САТ) здатні інактивувати Cm, а також тіамфенікол і азидамфенікол. Іншими відомими механізмами резистентності до Cm є, такі як трансмембранні помпи, інактивація фосфотрансферазами, мутації цільової ділянки та бар'єри проникності [26].

У продуцента Cm *S.venezuelae* спостерігаються такі механізми стійкості до Cm, як фосфорилування та гідролітична деградація хлорамфеніколу до р-нітрофенілсерінолу [26].

#### **1.1.4. Механізм стійкості до новобіоцину**

Новобіоцин, антибіотик на основі кумарину, тісно пов'язаний з хлоробіоцином і кумерміцином, виробляється *S. niveus* і *S. sphaeroides* і є інгібітором бактерійної ДНК-гірази [4, 15].

Один з механізмів стійкості до новобіоцину включає ген *gyrB*, що кодує субодиницю ДНК-гірази В, яка, на відміну від алеля дикого типу, стійка до новобіоцину [14].

Нетипово для стрептоміцетів, *S. niveus* метаболізує цитрат на перевагу глюкозі. Додавання до середовища цитрату, необхідне для початкових стадій росту, а його пропуск призводить до поганого росту та низького виходу новобіоцину [14]. Додавання цитрату під час фази росту глюкози пригнічує як вироблення новобіоцину, так і метаболізм глюкози, поки цитрат не вичерпується.

Також вчені дійшли до висновку, що новобіоцин може проникати в міцелій і руйнувати його при рН 7,5, але не при рН 8,5, і що підвищення резистентності під час ферментації є наслідком підвищення рН, яке відбувається в небуферному середовищі [14] .

Молекулярні дослідження виявили дві неспоріднені послідовності, клоновані з геномної ДНК *S. niveus*, які експресують резистентність до новобіоцину при трансформації в новобіоцин-чутливий вид *S. lividans*. Однак вони є специфічними для видів *S. niveus* і *S. sphaeroides*, що продукують новобіоцин, і не присутні в ряді видів, які не продукують новобіоцин. Ця послідовність визначає резистентну до новобіоцину субодиницю ДНК гірази В, яка присутня в *S. sphaeroides* на додаток до другого гена *gyrB*, який кодує більш чутливу субодиницю гірази В. Крім того, його експресія індукується новобіоцином та іншими інгібіторами ДНК-гірази [14] .

### 1.1.5. Механізм стійкості до еритроміцину

Макроліди, лінкозаміди і стрептограмін В (MLS) – хімічно різноманітні антибіотики, які мають схожий механізм дії. Еритроміцин належить до макролідів та пригнічує синтез білка рибосомами, що викликає передчасну дисоціацію пептидил-тРНК [9].

Резистентність до MLS пов'язана з такими трьома механізмами: модифікація мішені, ефлюксні насоси та ферментативна модифікація антибіотиків [17] .

Найпоширенішим механізмом є модифікація рибосом у результаті метилювання аденіну в рибосомальних субодиницях 23S рРНК метилазою, що кодується генами *erm*. Конформаційні зміни в рибосомі призводять до зниження зв'язування антибіотиків [17].

За інший механізм резистентності до макролідів у *Streptomyces lividans* відповідають два гени: *irm* і *mgt*, що кодують рРНК-метилтрансферазу і глікозилтрансферазу. Як субстрат глікозилтрансфераза використовує макроліди, як кофактор УДФ-глюкозу. Також білки, що кодує ген *irm* надають рибосомної стійкості до індукторів [3].

Найпоширенішими механізмами резистентності до макролідів є мутація A2058G у місці зв'язування антибіотиків або метилаза, кодована геном *erm*, яка метилює екзоциклічний Нітроген аденінової основи.

Багато бактерій, які продукують інгібітори синтезу білка, мають ферменти - метилтрансферази, які є механізмом стійкості власних рибосом до дії антибіотиків, які вони продукують. Вони здійснюють стійкість за допомогою метилювання рРНК у специфічних сайтах, як кофактор використовують S-аденозилметіонін [16].

## **1.2. Гени стрептоміцетів, що надають множинну стійкість до антибіотиків.**

Стійкість до антибіотиків є глобальною проблемою, яка впливає на ефективність кількох препаратів та різних доступних схем лікування. Надмірна експресія ефлюкських насосів є однією з головних механізмів резистентності бактерій. Види *Streptomyces* є багатим резервуаром ефлюкських насосів, які забезпечують стійкість як до ендогенних, так і до неендогенних антибіотиків. Первинні транспортери, такі як суперсімейство АТФ-зв'язуючих касет (ABC), використовують енергію гідролізу АТФ, тоді як вторинні транспортери, такі як надсімейство основних фасилітаторів (MFS), залежать від протонно-рушійної сили. Крім забезпечення стійкості до різних антибіотиків, надмірна експресія ефлюкських насосів також відіграє

істотну роль у толерантності до токсичних метаболітів, важких металів і розчинників [1].

Виявлено, що багато генів, що кодують трансмембранні помпи, мобілізуються від бактерій роду *Streptomyces* до клінічних патогенів шляхом прямого горизонтального перенесення генів.

Штам *S. coelicolor* SCO4121 має стійкість до багатьох антибіотиків. Штам O4121, в який введена додаткова копія гена *ErmE*, виявив підвищену стійкість до структурно неспоріднених препаратів, які включали наступне: ципрофлоксацин, фторхінон; хлорамфенікол, інгібітор пептидилтрансферази; стрептоміцин, аміноглікозид [1].

Регуляція трансмембранних помп, в основному, відбувається на рівні транскрипції у бактерій через ДНК-зв'язуючий регулятор. SCO4121 регулюється транскрипційно за допомогою регулятора MarR, SCO4122. Як зазначалося раніше, ципрофлоксацин та хлорамфенікол були двома основними препаратами, проти яких у штамів O4121 спостерігалася підвищена резистентність. Далі вивчали участь цих двох препаратів в індукції нативного промотора *sco4121* в клітинах WT і WT86. Підвищення регуляції *sco4121* у 2 рази спостерігалось під час дії інгібуючих концентрацій відповідних антибіотиків, що підтверджує, що *sco4121* регулюється транскрипційно обома препаратами [1].

*sco4121* виявляв підвищену стійкість до різних антибіотиків, включаючи ципрофлоксацин, хлорамфенікол, стрептоміцин і EtBr. SCO4122 бере участь у підвищеній експресії *sco4121* і, отже, підвищеній стійкості до подібних субстратів [1].

Ципрофлоксацин і хлорамфенікол є субстратами багатьох трансмембранних помп у грампозитивних бактерій, таких як PdrM та PrmA у *Streptococcus pneumoniae*, LmrP у *Lactococcus sp.*, Bmr у *Bacillus subtilis*. Резистентність до хлорамфеніколу та стрептоміцину також взаємопов'язана,

як це видно у грамнегативної бактерії *Pseudomonas putida*, де ефлюксий насос TtgABC розпізнає обидва препарати [1].

### **1.2.1 Взаємозв'язок між множинною стійкістю та кворумною системою (Quorum sensing)**

Комунікації клітина-клітина, відомі як quorum sensing (QS) у бактерій, включають сигнальні молекули та відповідні рецептори як регулятори транскрипції. Ці системи відіграють життєво важливу роль для адаптації бактерій та їх виживання в навколишньому середовищі [30].

Сигнальні молекули різноманітні за структурою, включаючи лактони ацилгомосерину (AHL), гамма-бутиролактони (GBL) та антибіотики. Їх відповідні рецептори зазвичай є регуляторами транскрипції, такими як рецептори LuxR, GBL і сімейство TetR. Вони являють собою широко поширені системи передачі сигналу, такі як система визначення кворуму (QS), система множинної лікарської стійкості (MDR) і двокомпонентна регуляторна система [30].

Усі регуляторні системи мають три основні компоненти: сигнальну молекулу, синтазу та відповідний рецептор. У грамполозитивних бактерій роду *Streptomyces* як сигнальні молекули використовуються GBL. Взаємодіючи з спорідненими рецепторами, GBL активують біосинтез вторинних метаболітів. Регуляторна система MDR включає транскрипційні регулятори сімейства TetR і насоси для відтоку багатьох лікарських засобів [30].

На основі кристалічної структури та регуляторних ролей гомологи LuxR включають дві родини: родина-А та родина-Б, що включають LuxR\_Vf, TraR, SdiA, CviR, LasR і QscR і LuxR\_Vh, HarR і SmcR, відповідно [10].

Регулятори родини TetR зазвичай діють як репресори транскрипції і беруть участь у багатьох біологічних процесах, таких як резистентність до антибіотиків, комунікація між клітинами та регуляція метаболізму.

Рецептори-гомологи LuxR розпізнають AHL лише у грамнегативних бактерій та, як згадувалося раніше, GBL-рецептори зв'язують тільки GBL у *Streptomyces* (рис.1) [30].

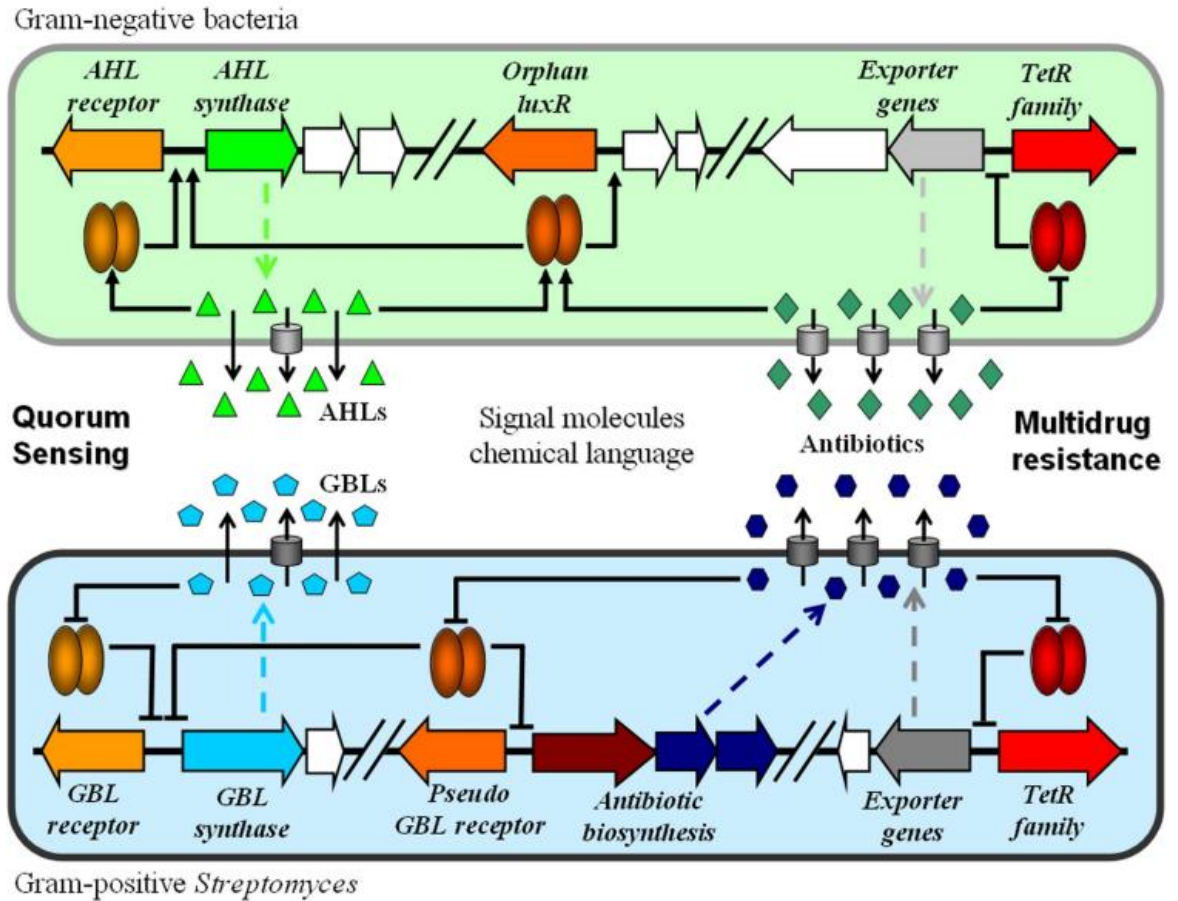


Рис.1 Взаємозв'язок між регуляторними системами QS і MDR у бактерій[30].

Відомо два псевдорецептори GBL можуть розпізнавати ендогенні антибіотики: ScbR2 (*S. coelicolor*) реагують на актинородин та ундецилпродігіозин; JadR2 (*S. venezuelae*) зв'язує жадоміцин і хлорамфенікол. А також, взаємодіючи з ScbR2, ангуциклінові антибіотики джадоміцин можуть функціонувати як сигнали для модуляції вироблення антибіотиків і морфологічної диференціації *S. coelicolor*.

Сигнали QS у високій концентрації мають подібну біологічну активність, як і антибіотики. Наприклад, лактони 3-оксо-N-ацилгомосерину, сигнал хінолону в *Pseudomonas* (PQS) і феназини мають протимікробну дію.

З'являється все більше досліджень, які доводять, що низька концентрація антибіотиків може діяти як сигнальні молекули під час комунікації кворумної системи, тоді як сигнали QS також мають антимікробну активність у високій концентрації. Також, ймовірно, що регуляторні системи QS і MDR можуть мати один і той же шлях до транспортних молекул [5, 13].

Висока концентрація антибіотиків може спричинити надекспресію генів-експортерів для більшої кількості трансмембранних pomp. Ці молекули розпізнаються регуляторами сімейства TetR, які, в свою чергу є регулятори транскрипції відповідають за транспортери витоку. Фізіологічна роль цих pomp може полягати в експорті сигнальних молекул для комунікації клітина-клітина [30].

### 1.3. Ангуцикліни - потенційні протиракові агенти

Ангуциклінова група природних продуктів є найбільшою групою поліциклічних ароматичних полікетидів, багатих на хімічні каркаси та різноманітну біологічну активність, переважно протипухлинну та антибактеріальну [18].

Тетрангоміцин і тетрангулол, були першими описаними представники цього класу антибіотиків виділені з *Streptomyces rimosus* [24].

Ландоміцини належать до найактивніших і найперспективніших ангуциклінових протипухлинних препаратів. *Streptomyces cyanogenus* S136 утворюють глікозильовані вторинні метаболіти ангуцикліну, відомих як ландоміцини. Структурною особливістю ландоміцинів А, В та Е є довгий цукровий ланцюг, який утворює глікозидний зв'язок з агліконовим фрагментом-гексозою. LaВ відрізняється від LaА на одну одиницю сахариду, тобто у LaВ відсутній сахарид родиноза в останньому положенні [12].

### 1.3.1 Біосинтез ландоміцину

Ацетат слугує стартовою сполукою і взаємодіє з малонатом утворюючи проміжний продукт. Згодом, цей продукт модифікується з утворенням преядоміцину. В 12 положенні Карбону приєднується ОН-група, що супроводжується відновленням 6-кето групи з утворенням 11-дезоксиландоміцинону. Реакція каталізується оксигеназою С-12. 11-дезоксиландоміцинон модифікується глікозилтрансферазою після додавання D-оливози.

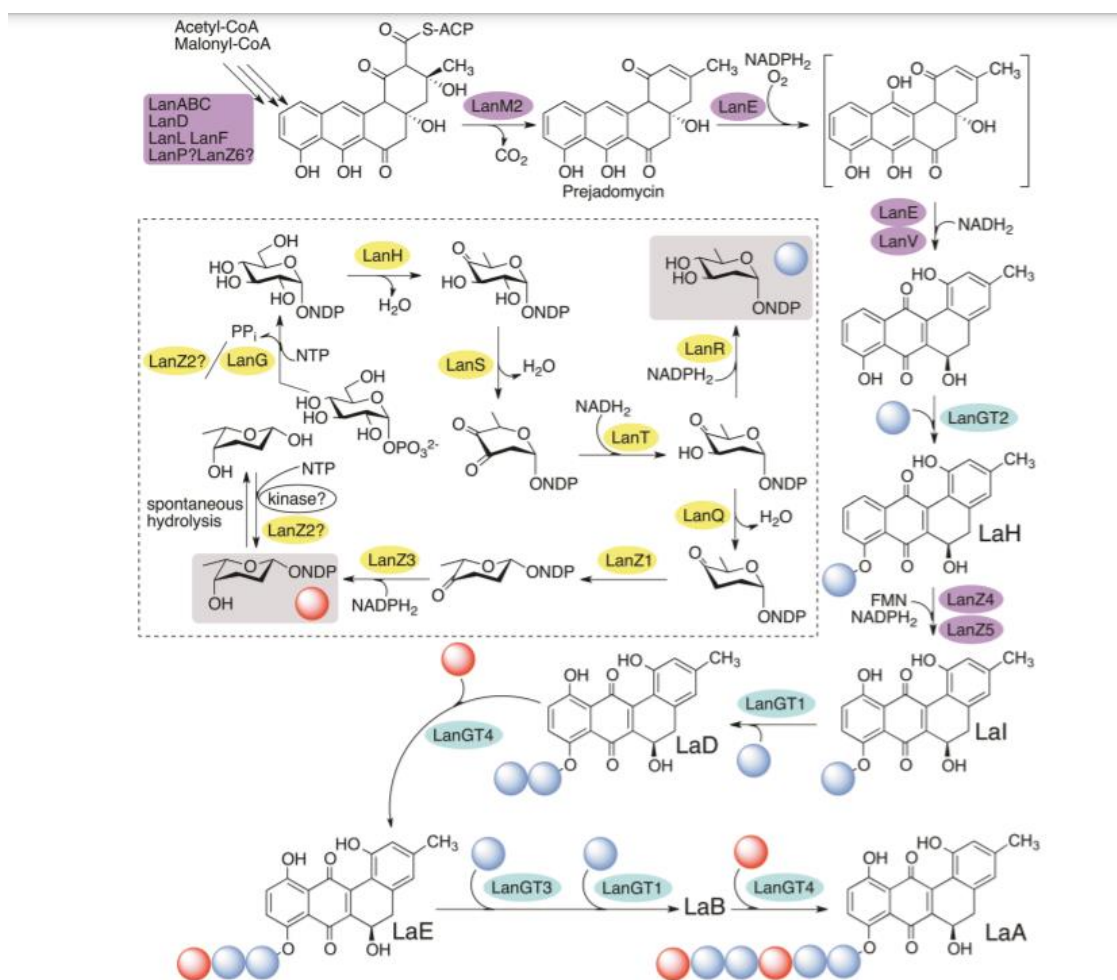


Рис.1.1. Біосинтез Ландоміцину А(LaA). Овалами зображені білки жовтим кольором ті, які беруть участь у біосинтезі дезоксисахарози; фіолетовим – беруть участь у синтезі глікозиду; синім кольором зображені глікозилтрансферази [32].

Глікозилювання каталізується LanGT2 та супроводжується процесом оксигенації C-11, що каталізується флавінредуктазою LanZ4 та біфункціональною оксигеназо-дегідратазою LanZ5, в результаті утворюється LaI. Згодом, трисахаридний ланцюг розширюється з утворенням гексасахаридної одиниці і як кінцевий продукт утворюється ландоміцин А. [29]

### 1.3.2 Жадоміцини, як протиракові агенти

Жадоміцини належать до молекул, що походять з полікетидів типу II, і продукуються бактеріями *S. venezuelae* в стресових умовах лікування етанолом, фагової інфекції або теплового шоку. Жадоміцини виявляють подібну до хлорамфеніколю протимікробну дію проти грампозитивних і негативних бактерій. Крім того, жадоміцини демонструють протиракові властивості проти раку печінки, легенів, множинної мієломи, шийки матки, товстої кишки та раку молочної залози [32].

Жадоміцин А був першим відкритим і структурно ідентичний жадоміцину В, але містить гідроксильну групу на D-кільці замість дезокси цукру. Жадоміцини з триазольною групою, приєднаною до E-кільця виявляють цитотоксичну дію щодо різних ракових клітин, тоді як приєднання з нетриазольною групою демонструє незначну цитотоксичну активність або взагалі не демонструє активності. Це підтверджує те, що, хоча кільця А, В, С і D беруть участь у протипухлинному ефекті жадоміцинів, прикріплення кільця глікону на D-кільці та структурна різноманітність навколо E-кільця найбільше беруть участь у зміні потенції та ефективності жадоміцинів [32].

Типи клітин на, які впливають жадоміцини:

1. Клітини T-47D: Жадоміцини DT і S мають полярні карбоксильні бічні ланцюги, які можуть забезпечувати здатність індукувати загибель ракових клітин. Ароматичні амінокислоти також перешкоджають взаємодії

жадоміцину з раковими клітинами, як жадоміцин Н і Y з гістидином і групи тирозину, відповідно, були менш ефективними, ніж жадоміцини з неароматичними групами [32].

2. Клітини BT474 і SKBR3: Цитотоксичність жадоміцину була перевірена на людських лініях клітин раку молочної залози ER+/PR+/HER2+ BT474 і ER-/PR-/HER2+ SKBR3. Жадоміцин В, F і S мали подібну цитотоксичність у клітинних лініях BT474, SKBR3, MDA-MB-231 і MCF7-CON із незначною зміною потужності. Ці результати вказують на те, що цитотоксичність жадоміцину, ймовірно, не залежить від гормональних рецепторів [32].

Основними механізмами інгібування жадоміцинів є перетворення Cu(II) в Cu(I), що призводить до виробництва АФК і подальшого пошкодження ДНК, пошкодження ДНК викликане жадоміцинами, інгібує АВК і запобігає мітозу і проліферація клітин раку молочної залози. Жадоміцини В, S і F також продемонстрували здатність інгібувати або отруювати топоізомеразу II, що призводить до подальшого пошкодження ДНК і апоптозу (рис. 2) [32].

Отже, жадоміцини індукують розщеплення ДНК, апоптоз і цитотоксичність у клітинах раку молочної залози MDR через зниження Cu(II), відбувається інгібування топоізомерази II. Інгібують АВК, що призводить до припинення мітозу та проліферації клітин і в кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин раку молочної залози [32].

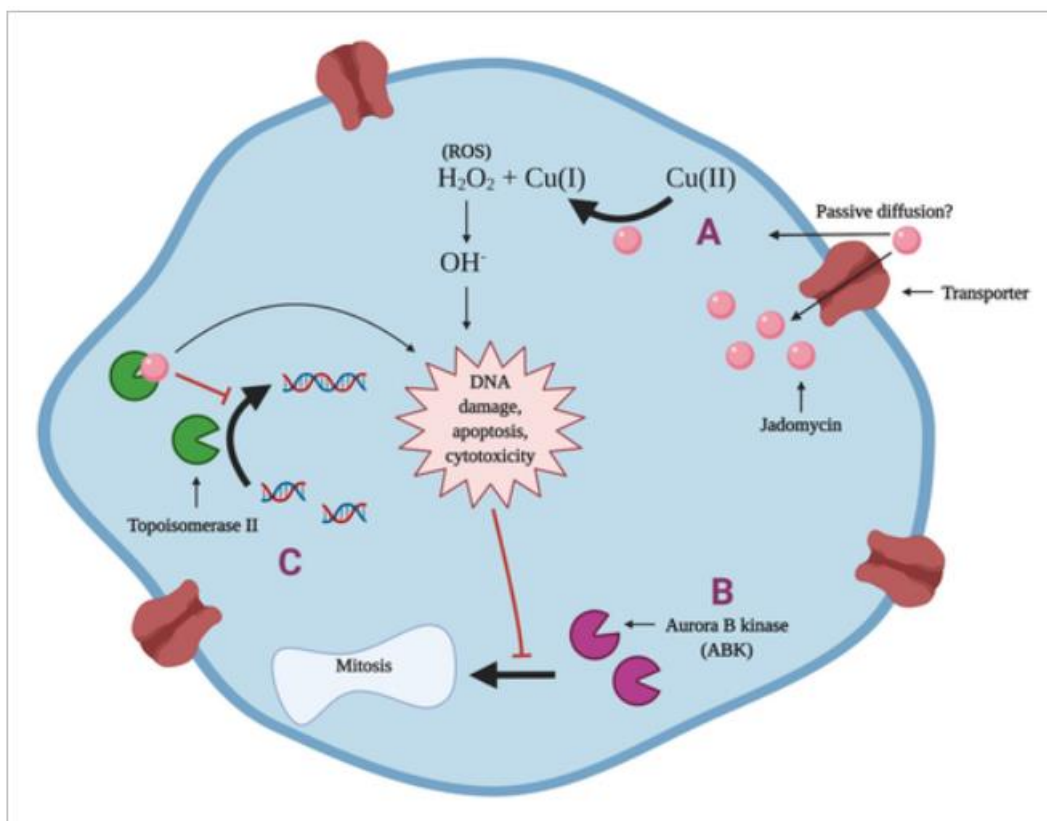


Рис.2 Схема впливу жадоміцинів на клітини раку молочної залози [32].

#### 1.4. Характеристика транспортерів родини Mmp1 та RND транспортери

Трансмембранні помпи – білки, що часто виступають факторами резистентності як продуцентів антибіотиків, так і патогенних бактерій. Ці транспортери поділяються на 2 групи: ABC – це група, що містять АТФ-зв’язуючу касету, яка використовує енергію, що виробляється в результаті гідролізу АТФ для викачування антибіотиків з клітин та інша група, вторинні транспортери, які використовують протони, або електрохімічний градієнт, генерований іонами натрію, щоб стимулювати викачування антибіотиків з клітин [25].

Вторинні транспортери, у свою чергу, діляться на чотири групи, а саме: major facilitator superfamily (MFS), multidrug and toxic efux (MATE), resistance nodulation division (RND) and small multidrug resistant (SMR) [25].

Транспортери родини RND широко поширені серед грамнегативних бактерій, і каталізують активне викачування багатьох антибіотиків і інших сполук. Транспортери цієї родини керуються протонно-рушійною силою (PMF) [25].

Ці білки складаються 12  $\alpha$ -трансмембранних спіралей (ТМН) і двох великих гідрофільних петлей між ТМН1-2 і ТМН7-8. Ці транспортери з отримують енергію від PMF при цьому транслокація протонів відбувається через домен ТМ [25].

Трансмембранні помпи RND родини можуть надавати стійкості до широкого спектру антибактеріальних засобів, а також є основною причиною множинної антибіотичної резистентності багатьох грамнегативних патогенних бактерій, наприклад: *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*, *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* тощо [25].

Mycobacterial membrane protein Large (MmpL) являють собою підклас транспортерів RND, які беруть участь у експорті ліпідних компонентів через клітинну оболонку. Ці експоновані на поверхню ліпіди з незвичайною структурою відіграють ключову роль у фізіології мікобактерій та можуть діяти як фактори вірулентності та імуномодулятори [29].

На основі геномної послідовності *M. tuberculosis* H37Rv, цей організм містить 14 різних білків MmpL. MmpL3, MmpL4, MmpL5, MmpL7, MmpL8, MmpL10 і MmpL11 необхідні для повної вірулентності *Mtb*. Подібно до насосів витоку RND грамнегативних бактерій, деякі з цих транспортерів MmpL, працюють у поєднанні з меншими додатковими білками, які називаються малим мікобактеріальним мембранним білком (MmpS) [6].

Транспортери MmpL та їх допоміжні білки MmpS відповідають за переміщення жирних кислот і ліпідних компонентів клітинної стінки, таких як мономіколат трегалози, сульфоліпіди, димікоцерозат фтіоцеролу, діацилтрегалозу тощо [6].

Роль білків MmpL у патогенності трансмембранних pomp RND пов'язана з експортом факторів вірулентності. Наприклад, вихідний насос MexABOprM MexABOprM посилює вірулентність *P. aeruginosa*, сприяючи виведенню сполуки фуранози, яка виступає інгібітором кворуму та взаємодіє з LasR і, відповідно, послаблює вірулентність патогенна [25].

Кількість білків MmpL варіюється, наприклад геном *Mycobacterium tuberculosis* кодує 14 анотованих білків MmpL, тоді як геном *Corynebacterium glutamicum* кодує лише чотири MmpL-подібні транспортери, позначені CmpL [29].

Білки родини MmpL беруть участь у транспорті ліпідів. Добре охарактеризовані кластери біосинтезу та транспортних генів GPL та трегалози поліфлеату (TRP) знаходяться поруч один з одним у *M. smegmatis*. Ортологи багатьох генів у цих кластерах, включаючи гени, які беруть участь у біосинтезі GPL або TRP можна знайти у *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae* та *M. marinum*, які не продукують ні GPL, ні TRP, однак ці гени поширені в геномах мікобактерій. Транспорт цих речовин здійснюється білком MmpL4 [25,29].

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Матеріали

**Бактерійні штами та плазміди.** Штами бактерій та рекомбінантні молекули ДНК, які були використані, наведено у таблицях 2.1 та 2.2

**Таблиця 2.1**

Штами бактерій, використані у роботі:

Штам	Характеристика
<i>E. coli</i> ET12567	Штам, який використовувався для кон'югаційного перенесення ДНК, F <sup>+</sup> .
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Штам для трансформації, мутантний за такими, як генами: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>lacZΔM15</i>
<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672	Продуцент моеноміцину А. Тест-культура для виявлення протибактерійної антибіотичної активності
<i>Streptomyces ghanaensis</i> dO5	Похідний ATCC14672 з заміною гена <i>moeO5</i> на ген стійкості до гігроміцину <i>hug</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC19637	Тест-культура для виявлення протибактерійної антибіотичної активності
<i>Bacillus subtilis</i> Hb0933Sp.	Тест-культура для виявлення протибактерійної антибіотичної активності
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Тест-культура для виявлення протибактерійної антибіотичної активності

<i>Streptomyces ghanaensis</i> AVi21	Похідний <i>S.ghanaensis</i> . Містить ген-траспортер <i>XNR_4573</i> .
<i>Streptomyces ghanaensis</i> VMC	Похідний <i>S.ghanaensis</i> . Містить ген-траспортер <i>XNR_2146/</i>
<i>S. albus</i> SAM2	Похідний J1074;
<i>S. albus</i> VAB	Похідний SAM2, в який введено плазмиду pVAB (сконструйовано в цій роботі)
<i>S. albus</i> VKB	Похідний SAM2, в який введено плазмиду pVKB (сконструйовано в цій роботі)
<i>S. albus</i> VMC	Похідний SAM2, в який введено плазмиду pVMC із геном експортера лінкоміцину <i>XNR_2146</i>
<i>S. cyanogenus</i> S136	Штам дикого типу, продуцент ландоміцину А
<i>S. cyanogenus</i> VAB	Похідний <i>S. cyanogenus</i> S136, в який введено плазмиду pVAB (сконструйовано в цій роботі)
<i>S. cyanogenus</i> VKB	Похідний <i>S. cyanogenus</i> S136, в який введено плазмиду pVKB із геном транспортера родини MMPL <i>S136_4397 S. cyanogenus</i> S136 (сконструйовано в цій роботі)
<i>S. cyanogenus</i> Δ2	Штам в якого видалені гени транспортерів <i>lanJ</i> і <i>s136_3375</i> , які є паралогами
<i>S. cyanogenus</i> Δ2 VAB	Похідний <i>S. cyanogenus</i> Δ2, в який введено плазмиду pVAB (сконструйовано в цій роботі)
<i>S. cyanogenus</i> Δ2 VKB	Похідний <i>S. cyanogenus</i> Δ2, в який введено плазмиду pVKB (сконструйовано в цій роботі)

**Таблиця 2.2**

Плазміди, використані у роботі:

Плазміда	Характеристика
pTES	Вектор експресії, AmR; похідна pSET152; містить attP, фланкований сайтами <i>loxP</i> , та промотор <i>ermEr</i> .

pVMC	Похідна pTES, містить ген <i>XNR_2146 S. albus</i> SAM2 (надано студ. Цедуляк М.-В.)
pVAB	Похідна pTES, містить ген-регулятор <i>S1361_17020 S. cyanogenus</i> S136
pVKB	Рекомбінантна плазміда, сконструйована на основі вектора pTES, містить ген-транспортер родини MMPL <i>ydfJ2 S. cyanogenus</i> S136
pAVi21	Рекомбінантна плазміда, сконструйована на основі вектора pTES, містить ген-транспортер <i>XNR_4573</i>

### Середовища та умови культивування:

Вівсяне середовище (OM): вівсяне толокно – 36 г; агар – 24 г; вода водопровідна – до 1 л; рН 7.2. Після стерилізації додавали  $MgCl_2$  до кінцевої концентрації 1 мМ.

Соево-манітолове середовище (SFM): соєве борошно – 20 г; манітол – 20 г; агар – 18 г; вода водопровідна – до 1 л.

Триптон-соєвий бульйон (TSB): TSB сухий – 30 г; вода дистильована – до 1 л.

Триптон-соєве агаризоване середовище (TSA): TSB сухий – 30 г; агар – 20 г; вода дистильована – до 1 л.

NL5 (NaCl 1 г/л,  $KH_2PO_4$  1 г/л,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  0,5 г/л, Trace elements solution 2 мл/л, гліцерол 25 г/л, L-глутамін 5,84 г/л)

Середовище SG2: глюкоза – 20 г, сойтон – 10 г, дріжджовий екстракт – 5 г, агар – 20 г; рН 7,2, вода дистильована – до 1 л. Після стерилізації:  $CoCl_2$  – 1 мг.

L-агар (триптон 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, H<sub>2</sub>O 1л)

Середовище ВСА:  $KH_2PO_4$  – 3 г,  $K_2HPO_4$  – 7 г, натрій цитрат – 0,5 г,  $MgSO_4$  – 0,1 г,  $(NH_4)_2SO_4$  – 1 г, глюкоза – 2 г, агар – 16 г, пептон – 0,2 г; вода дистильована – до 1 л.

Для заливок з м'якого агару використовували 0,7 % середовище з агаром.

Кон'югацію проводили на вівсяному середовищі (*E.coli* – *Streptomyces*)

**Реактиви.** У роботі використовували такі антибіотики: тетрациклін, рифампіцин, левоміцетин, новобіоцин, еритроміцин, ландоміцин.

Для екстракції антибіотиків використовували метанол, ацетон, етилацетат.

Для ТШХ використовували хлороформ, метанол.

## 2.2. Методи

### 2.2.1 Міжродова кон'югація *Escherichia coli* – *Streptomyces*

Кон'югацію проводили за такою методикою. Попередньо висіяні спори штаму-акцептора(*Streptomyces*) на вівсяне середовище та вирощували протягом 5 днів. Вирощували нічку культуру *Escherichia coli*, яка була донорним штамом та складалася з відповідної плазмід.

У мікропробірки вносили 400 мл води та збирали спори штаму-донора *S.ghanaensis* чи *S.albus* з ¼ чашки. Інкубували на водяній бані при 50°C протягом 10 хв для того, щоб індукувати проростання спор. Коли суспензія охолола до кімнатної температури вносили культуру донорного штаму(1/2 чашки). Якщо штамом-акцептором виступали колонії виду *S. cyanogenus*, то шокувати клітини не потрібно.

Суміш ресуспендували та висівали на чашку з вівсяним середовищем до якого додавали  $MgCl_2$ . Інкубували протягом ночі та заливали розчином з антибіотиками, стійкість до яких визначається маркерними генами досліджуваної плазмід і для того, щоб призупинити ріст грам(-) бактерій. Інкубували протягом 4-5 діб та аналізували.

### **2.2.2 Біо-тест для визначення антибіотичної активності**

Біо-тест для визначення антибіотичної активності проводили методом дифузії антибіотиків в агар та методом агарових блоків. У м'який агар (0,7 % агару) додавали попередньо вирощену культуру у рідкому середовищі відповідного штаму, виливали його на чашку з агаризованим середовищем, стерильно накладали диски чи блочки з тест-культурами. Аналізували за 24 години.

### **2.2.3 Екстрагування вторинних метаболітів**

З попередньо вирощеної культури протягом 48 годин у середовищі SG-D, відібрали по 5 мл культури у попередньо зважені пробірки. Центрифугували протягом 4-5 хв та висушили для того щоб порівняти кількість культур, які вирости.

У інші пробірки відібрали ще по 5 мл культури, центрифугували. Супернатант відібрали в інші пробірки. До супернатанту додали відповідний об'єм етилацетату, до біомаси по 5 мл суміші метанол:ацетон(4:6). Струщували протягом 30 хв. Центрифугували протягом 2 хв для розділення органічної та неорганічної фаз. Органічну відібрали в епендорфи та випровували. Екстракти розчинили у 30мкл метанолу та сконцентрували в 1 епендорф.

### **2.2.4 ТШХ (тонкошарова хроматографія)**

Проводили на спеціальних алюмінієвих пластинках(не рухома фаза). Зразки наносили на точки і залишали висохнути. Далі пластинку ставили в хроматографічну камеру з розчином хлороформ:метанол(9:1).

### **2.2.5 Отримання компетентних клітин *E.coli***

Культуру *E.coli* через ніч інкубували в рідкому середовищі TSB при 37 °С. Якщо трансформували клітини штаму ET, потрібно додати антибіотик – канаміцин, натомість, штами GB та DH5 $\alpha$  культивуються без додавання антибіотиків. Наступного дня нічну культуру всіваємо в свіже середовище і інкубуємо протягом 2 годин. Переносимо на лід, осаджуємо в центрифугу протягом 10 хв. Зливаємо супернатант і до біомаси додаємо 10 мл 0.1M CaCl<sub>2</sub>, залишаємо на льоді на 1 годину. Центрифугуємо, додаємо охолоджений 0.1M CaCl<sub>2</sub>+10%Glycerol. По 100 мкл в різні мікропробірки. Зберігаємо при -80°C.

### **2.2.6 Виділення плазмідної ДНК з *E. coli***

За допомогою методу лужного виділення виділяли плазмідну ДНК з клітин *E. coli*. У 15 мл рідкого середовища TSB/ LB додавали колонію досліджуваної культури. Перелили культур в мікропробірки і двічі центрифугували. Додали 100  $\mu$ l буферу I, ресуспендували і залишили на 3 хв. Додали 200  $\mu$ l буферу II і залишили на 2 хв. Додали 150  $\mu$ l буферу III і поставили на лід на 10 хв. Розчин центрифугували протягом 10 хв. Супернатант перенесли в інші мікробробірки та додали 750  $\mu$ l ізопропанолу, центрифугували 10 хв. Зливали супернатант, в результаті утворився білий осад до якого додали 700  $\mu$ l 70% етанолу, центрифугували 5 хв, зливали супернатант, відібрали останню краплю та висушили при 37°C до зникнення запаху спирту. Залишок розчинили у 55  $\mu$ l бідистильованої води.

### **2.2.7 Трансформація клітин *E. coli***

До компетентних клітин *E. coli* GB2005 на льоді додавали 5  $\mu$ l лігазної суміші та ресуспендували. Помістили на 1 хвилину на 42°C і на 1 хвилину на лід. Далі додали 1000  $\mu$ l середовища TSB та інкубували на шейхері 1,5год при 37°C. Висіяли на 2 чашки Петрі з агаризованим середовищем TSA з

апроміцином: в одну чашку додали 150  $\mu$ l культуральної рідини, а іншу чашку висіяли після того як від центрифугували, злили рідину та ресуспендували.

### **2.2.8 Електрофорез зразків в агарозному гелі та елювання фрагментів ДНК**

Електрофорез проводили в 1% агарозному гелі ( 1г агарози + 100 трис-ацетатного буферу (ТАЕ) + 20  $\mu$ l бромистого етидію) протягом 20-30 хв в напрузі 120В. Використовуючи маркер GeneRuler 1 kb визначали молекулярну масу фрагментів ДНК.

Для елювання фрагмент гелю з досліджуваною ДНК внесли у попередньо зважену пробірку, зважили ще раз з гелем та внесли такий ж об'єм буферу для елюції (Binding buffer). Поставили на водяну баню на 50°C до повного розчинення гелю. Розчин перенесли на колонку і центрифугували протягом 1 хв. Зливали супернатант, додали 600 $\mu$ l Wash buffer. Центрифугували, злили супернатант, центрифугували порожню колонку. Колонку перенесли у нову мікропробірку, на центр мембрани додали 50 $\mu$ l бідистильованої води, центрифугували 1 хв.

### **2.2.9 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)**

Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували метод полімеразної ланцюгової реакції. Для проведення ПЛР використовували: 10  $\mu$ l буферу, 10  $\mu$ l Geenhanser, 5 $\mu$ l dntP, 0,5  $\mu$ l Polymerase(Q5 DNA), 0,5  $\mu$ l праймерів, 1  $\mu$ l ДНК та 23,6  $\mu$ l води. Праймери: EcoRI\_4397gp та XbaI\_4397cp; EcoRI\_4396gp та XbaI\_4397cp. Після проведення ПЛР отримано продукт з відповідними довжинами, що відповідають довжинам даної фрагментів.

### **2.2.10 Лігування фрагментів**

Оброблені ендонуклеазами рестрикції фрагменти ДНК лігували у вектор з використанням лігази T4 та буферу для неї. Відповідно використовували 2

μl вектора, 1 μl буферу для лігази, 0,5 μl T4 лігази та 6,5 μl вставки. Інкубували при 22°C 30 хвилин. Згодом проводили трансформацію.

### **2.2.11 Обробка ДНК ендонуклеазами рестрикції та картування плазмід**

Елюйовані фрагменти ДНК піддавалися розщепленню ферментами рестрикції EcoRI та XbaI у співвідношенні 2:4, у буфері Tango 10x. Далі інкубували 1 годину при 37°C.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Надекспресія генів є одним з ключових методів дослідження вторинних метаболітів. В цій роботі ми використали три штами роду *Streptomyces*: *S. cyanogenus*, *S. albidoflavus*, *S. ghanaensis*. Ключовим етапом нашої роботи було дослідження генів, які, ймовірно, задіяні у викачуванні ландоміцинів.

Гени, розташовані у межах кластера біосинтезу вторинних метаболітів, зазвичай, надають стійкості до антибіотиків. Основним метаболічним продуктом *S.cyanogenus* S136 є відомі метаболіти ангуциклінової природи – ландоміцини, зокрема ландоміцин А (LaA), він містить гексасахаридний ланцюг, який формується з чотирьох залишків D-олівози і двох L-родинози. Кластер генів LaA містить два компоненти, що регулюють стійкість до відповідного антибіотика: ген протон-залежного транспортера *lanJ* та ген *lanK*, який кодує регулятор TetR-родини [23].

Описано, що ген *lanJ*, не є ключовим у викачуванні цього антибіотика з клітини. Тому досить актуальним є пошук генів поза кластером біосинтезу LaA. Гени, які розташовані поза кластером генів біосинтезу ландоміцинів, можуть відігравати ключову роль у стійкості до цих антибіотиків. У цій роботі нами сконструйовано систему надекспресії гена - гомолога *XNR\_2104*.

Іншим аспектом роботи було дослідити вплив такої надекспресії на мутантний штам *Streptomyces ghanaensis* dO5, у якому ключовий ген біосинтезу моеноміцину *moeO5* замінений на ген стійкості до гігроміцину *hyg*.

### 3.1. Конструювання плазмід для надекспресії генів

#### 3.1.1. Конструювання плазміди експресії гена протонзалежного транспортера *ydfJ2*.

Першим етапом нашої роботи, було сконструювати плазміди для надекспресії генів. Плазміди були побудовані на основі вектора pTES.

Ген *ydfJ2* є транспортером родини MMPL, функція представників якої поки що невідома, але, ймовірно, вони беруть участь у транспорті ліпідів. Цей ген має високу спорідненість до гена *XNR\_2104*, продукт якого задіяний у множинній стійкості до антибіотиків (неопубліковані дані, отримані к.б.н. Ю.В. Ребцем).

BLAST-аналіз продукту гена *ydfJ2* має найвищий рівень подібності серед усіх ймовірних білків *S. cyanogenus* S136 подібність до білка *XNR\_2104*, амінокислотні послідовності були практично ідентичні, дані два протеїни мають не значну різницю у розмірі: 720 і 731 амінокислотний залишок, відповідно. Ймовірно, що це може бути делеція у гені *S. cyanogenus ydfJ2*, або вставка у *S. albidoflavus XNR\_2104*.

Використовуючи відповідні праймери (XbI4397up (TCTAGA tgccsagccg aaccsacgac) і EcoRI4397rp (GAATTC tcaggcgcgtaccagctcctt), за допомогою ПЛР ми ампліфікували ген *ydfJ2* і отримали продукт розміром 2260 п.н. . За допомогою методу елюювання ми виділили фрагмент з гелю. Обробили фрагмент ендонуклеазами рестрикції XbaI та EcoRI, у співвідношенні 4:2. Лігували у вектор pTES. Отриману лігазну суміш трансформували в клітини *E.coli* DH5 $\alpha$  та пересіяли на чашки з додаванням апраміцину та канаміцину. Виділяли плазмідну ДНК та за допомогою електрофорезу аналізували наявність відповідної плазмідної ДНК у клонів.

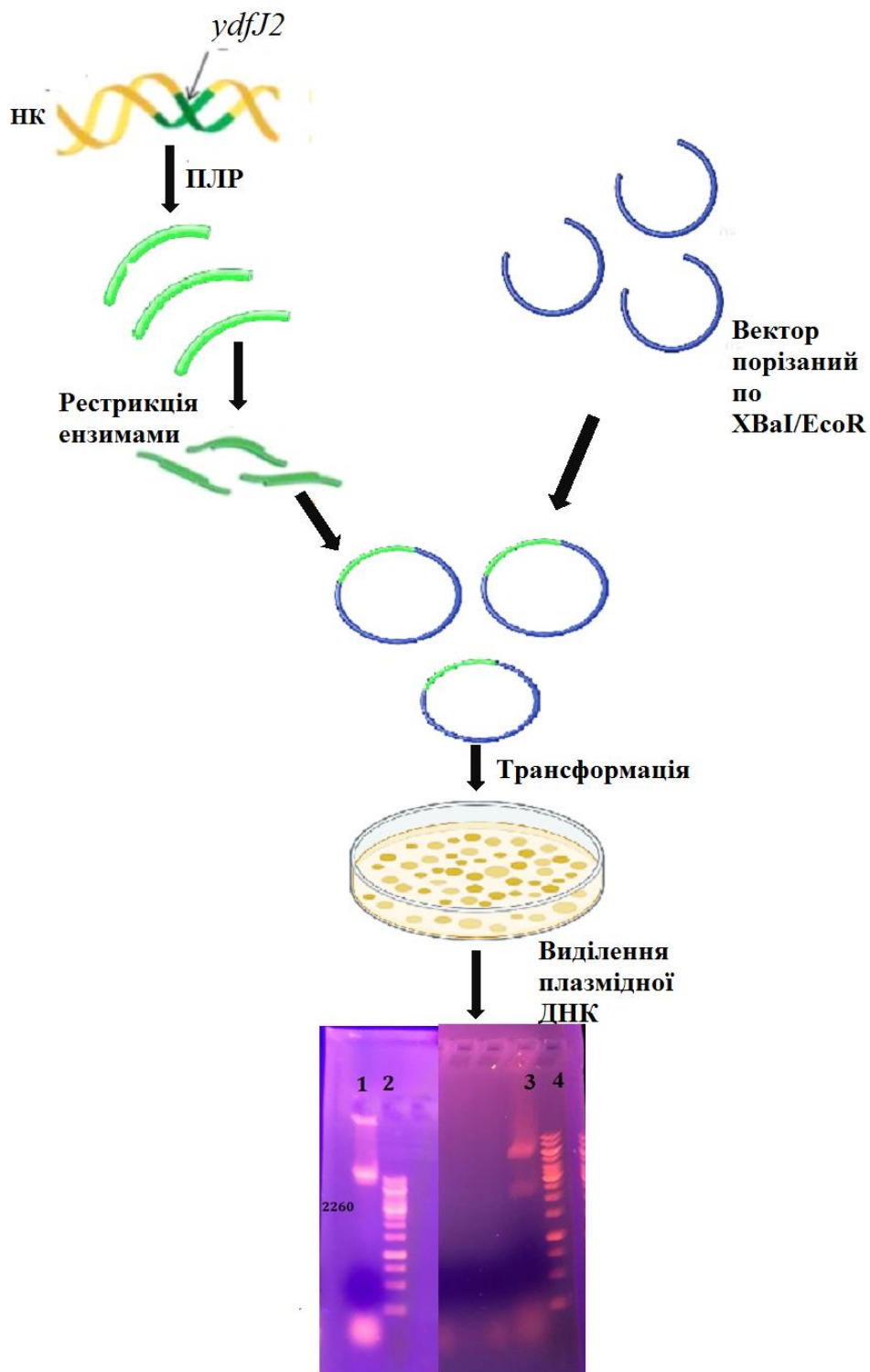


Рис. 3.1 Схема конструювання плазміди pVKВ, що містить ген *ydfJ2*.

Електрофореграма: 1-плазмідна ДНК; 2, 4 – молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™), 3 - . плазмідна ДНК/EcoRI/XbaI

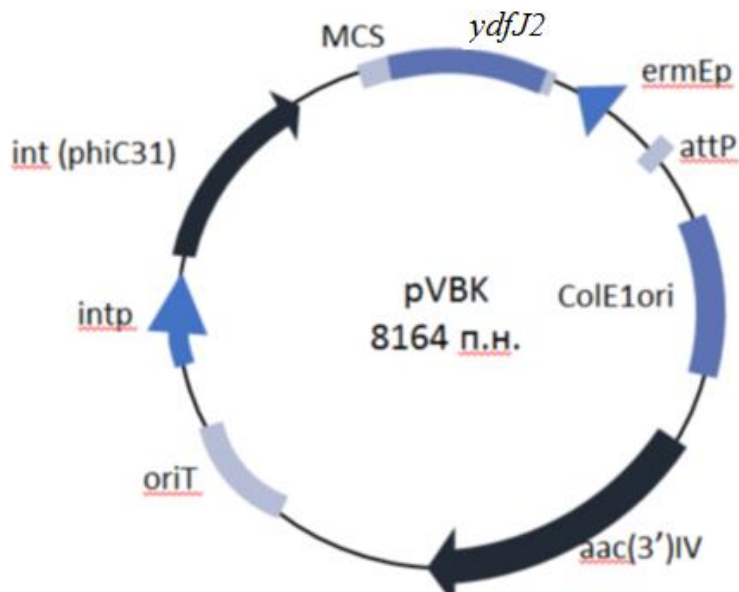


Рис. 3.2 Карта плазмиди pVBK.

Умовні позначення: oriT – ділянка ініціації кон'югативного перенесення; aac(3)IV - ген стійкості до апраміцину; attP - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; int (φC31) - інтеграза фага φC31, яка кодується геном int (ген int забезпечує сайт-специфічну інтеграцію); ermEp - промотор; ColE1ori - ділянка ініціації реплікації в E.coli; loxP – сайт-розпізнавання рекомбінази Cre; XbaI та EcoRI– сайти вставки гена adpA; ydfJ2-ген- траснпортер

### 3.1.2 Конструювання плазмиди експресії гена регулятора *S1361\_17020*

Оскільки ген регулятора *S1361\_17020* є суміжним з геном транспортером *ydfJ2*, то, ймовірно, він регулює експресію останнього.

Даний ген кодує регулятор родини TetR. Білки цієї родини регулюють гени біосинтезу антибіотиків, транспортерів низькомолекулярних речовин, контролюють катаболічні шляхи. Гомодимер TetR складається з двох

ідентичних мономерів, які складаються в 10  $\alpha$ -спіралей із сполучними витками та петлями. Загальні структурні особливості білків сімейства TetR можна розділити на два домени, які складаються з N-кінцевого ДНК-зв'язуючого домену і С-кінцевого домену, який виконує роль розпізнавання ліганду [32].

ДНК-зв'язувальний домен складається з першої, другої і третьої  $\alpha$ -спіралі, друга і третя формують мотив «спіраль-поворот-спіраль». У складі С-кінцевого домену містяться інші спіралі. Цей домен розділяють на піддомени: п'ята, шоста, сьома спіралі формують центр взаємодії з лігандом, а восьма та дев'ята – відповідають за димеризацію [32].

Для ампліфікації гена ми використали такі праймери: XbaI4396bp (TCTAGA GAGGTACGAAGACGGAAAGCC) та EcoRI4396bp (GAATTC GAGCGTGGATCAGGAGGTGC) та отримали продукт бажаного розміру – 600 п.н.

Відомо, що білки родини TetR регулюють експресію транспортерів низькомолекулярних речовин, тому ми розглядали гіпотезу, що продукт гена *S1361\_17020* регулює експресію гена транспортера *udfJ2*.

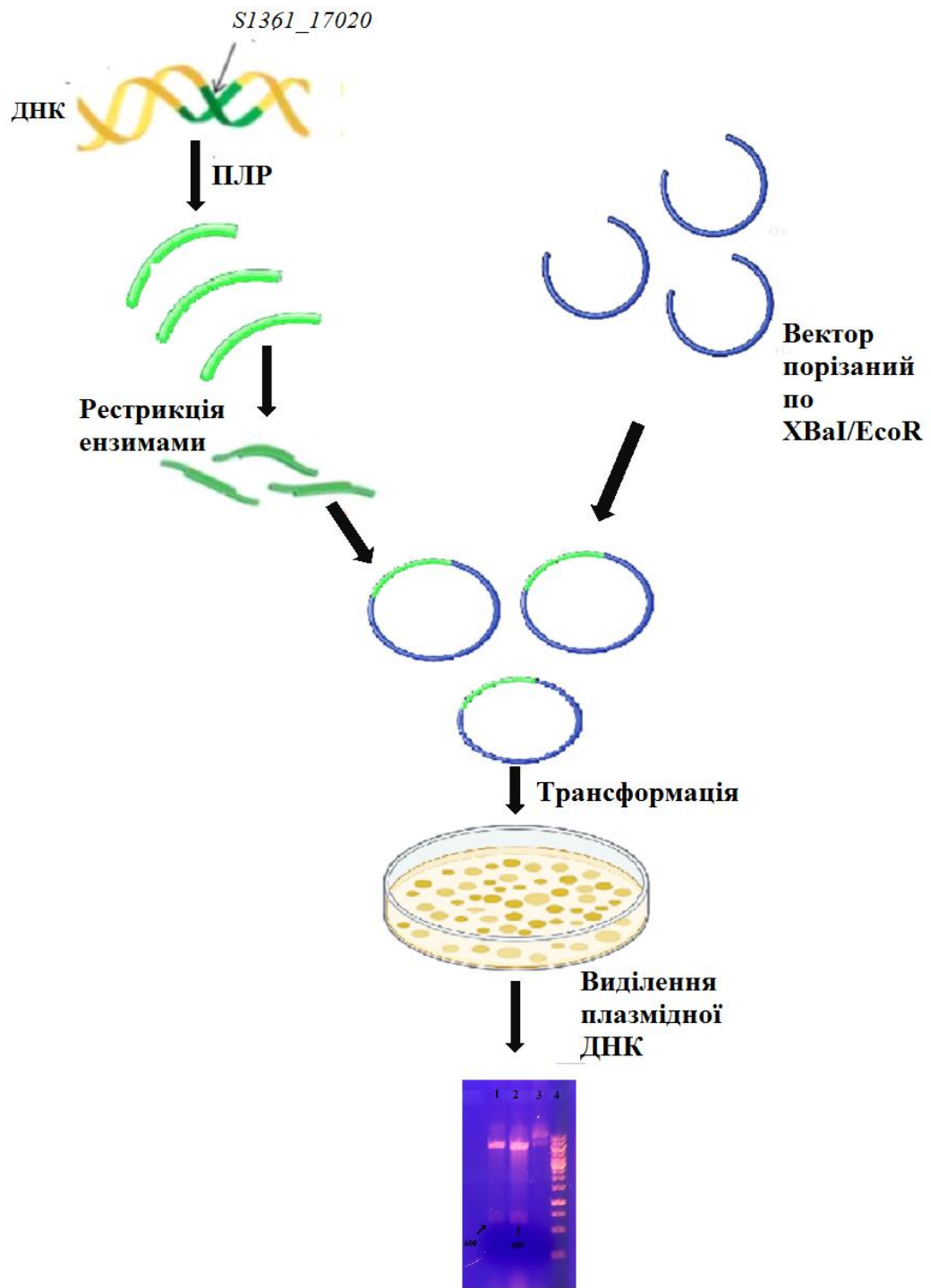


Рис. 3.3 Схема конструювання плазміди рVAB, що містить ген *S1361\_17020*.

Електрофореграма: 1-2 – виділена плазмідна ДНК. 3- нативна ДНК. 4 - молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™).

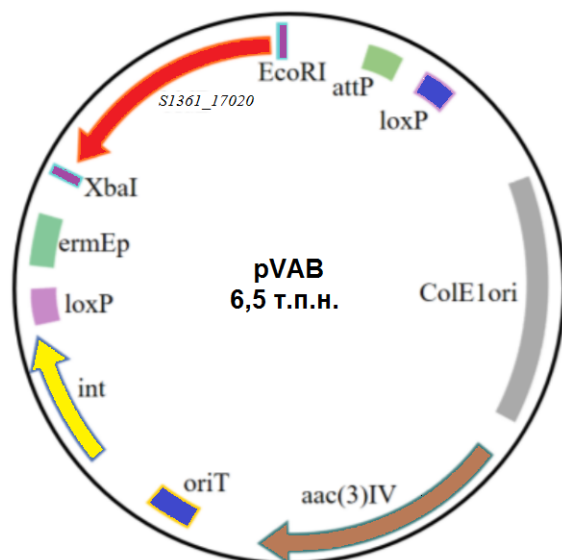


Рис. 3.4 Карта плазмиди pVAB.

Умовні позначення: oriT – ділянка ініціації кон'югативного перенесення; aac(3)IV - ген стійкості до апраміцину; attP - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; int (φC31) - інтеграза фага φC31, яка кодується геном int (ген int забезпечує сайт-специфічну інтеграцію); ermEp - промотор; ColE1ori - ділянка ініціації реплікації в *E.coli*; loxP – сайт-розпізнавання рекомбінази Cre; XbaI та EcoRI– сайти вставки гена *adrA*; *adrA* – ген-регулятор.

### 3.2. Екстрагування вторинних метаболітів з штамів та тонкошарова хроматографія

Для того, щоб дослідити вплив на вторинний метаболізм у штамів *S.cyanogenus* S136 та *S.cyanogenus* Δ2, ми надекспресували гени *S1361\_17020* та *udfJ2* в даних штамів. Ми припустили, що введення додаткової копії гена транспортера чи регулятора збільшить стійкість до ландоміцинів у *S.cyanogenus* Δ2, який має знижену життєздатність за ферментативних умов (неопубліковані дані) або підвищить рівень синтезу у штамі дикого типу.

Екстракцію та аналіз вторинних метаболітів здійснювали у штамів: *S.cyanogenus* S136, *S.cyanogenus* S136 (pVAB), *S.cyanogenus* S136 (pVKB), *S.cyanogenus* Δ2, *S.cyanogenus* Δ2( pVAB), *S.cyanogenus* Δ2(pVKB).

Для екстрагування вторинних метаболітів попередньо вирощену культуру переносили в рідке середовище SG-D та вирощували протягом 48 годин. У попередньо зважені пробірки відбирали однакові кількості культур, центрифугували, висушували та порівнювали біомаси різних штамів. В інші пробірки відбирали по 5 мл культури. Центрифугували та супернатант зміщували з етилацетатом, а до біомаси додавали таку ж кількість суміші метанол:ацетон у співвідношенні 4:6. Перемішували протягом пів години. Для розділення органічної та неорганічної фаз центрифугували протягом 10 хв. Органічну фазу відбирали в мікропробірки та випаровували. Вміст розчиняли у 30 мкл метанолу.

Згодом проводили аналіз вторинних метаболітів за допомогою ТШХ (тонкошарової хроматографії). ТШХ проводили за допомогою спеціальних алюмінієвих пластинок, які слугували нерухомою фазою. Зразки наносили на попередньо відміряну відстань та залишали висохнути. Хроматографічну камеру заповнювали розчином хлороформ:метанол у співвідношенні 9:1 та коли камера наповнювалася випарами, пластинку ставили у камеру. Через пів години аналізували результати.

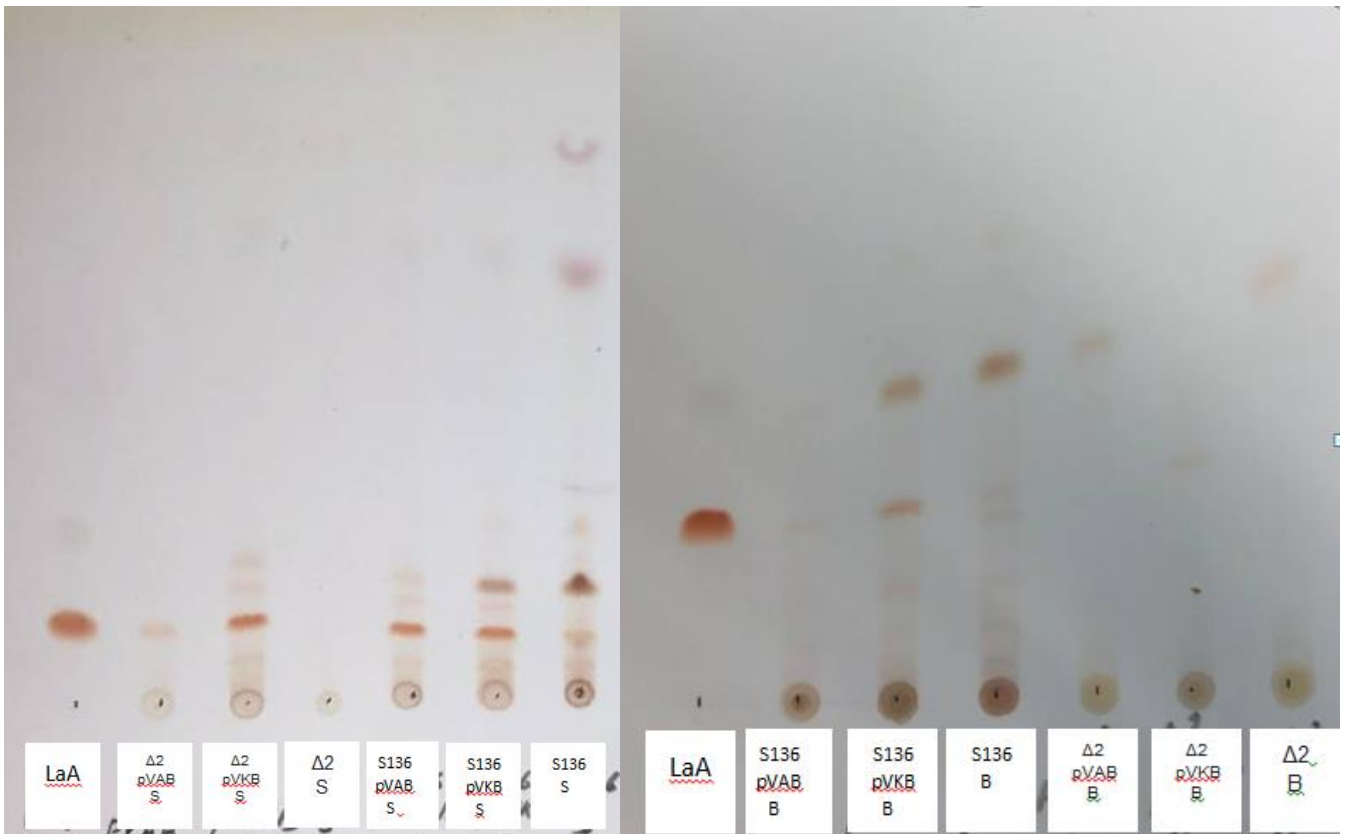


Рис. 3.5 Тонкошарова хроматографія

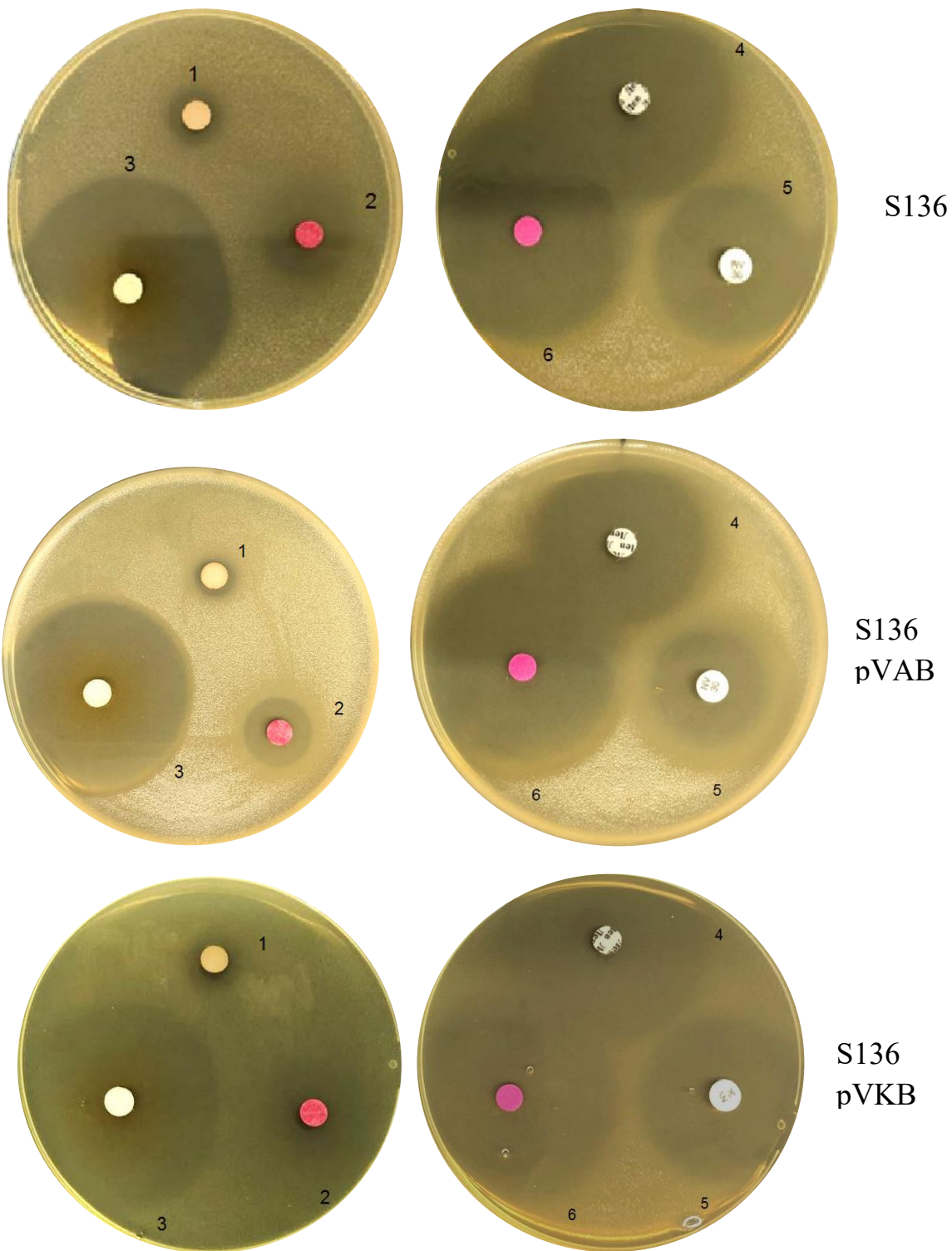
З результатів (рис.3.5) можемо сказати, що порівняно з диким типом, *S. suanogenus* S136, концентрація LaA збільшується при надекспресії генів транспортера і незначно зростає при надекспресії регулятора. Також порівнюючи штами S136 та  $\Delta 2$ , можемо побачити зменшення концентрації LaA, ймовірно, пов'язаних з делецією двох генів. Аналізуючи концентрації екстрактів в штамах  $\Delta 2$ ,  $\Delta 2(pVKB)$  та  $\Delta 2(pVAB)$ , можна сказати, що кількість ландоміцинів збільшується при додатковій копії генів транспортера (*ydfJ2*) та регулятора (*S1361\_17020*), що відповідає очікуваним результатам у випадку транспортера.

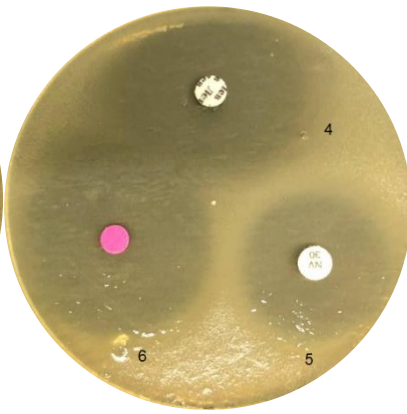
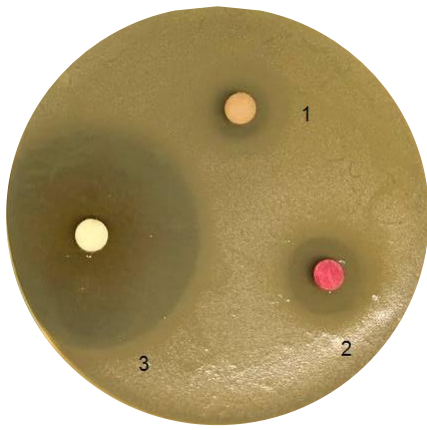
### 3.3 Біотест для визначення антибіотичної активності

Біотест для визначення антибіотичної активності проводили методом дифузії антибіотиків в агар. Чашки з газоном бактерій, на які накладали

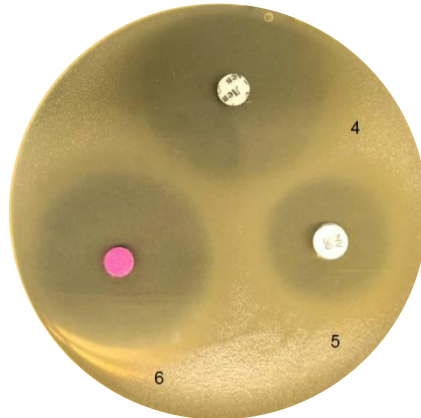
диски з антибіотиками, інкубували 1 добу при 37 °С, а потім вимірювали зони пригнічення росту.

A)

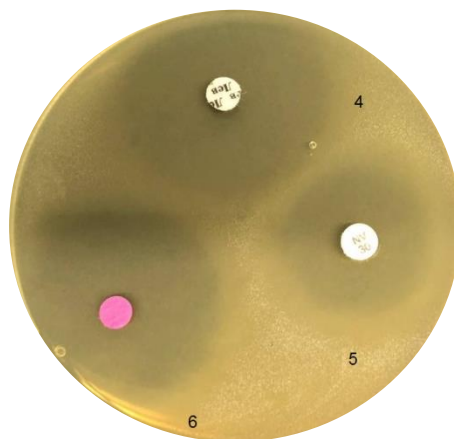
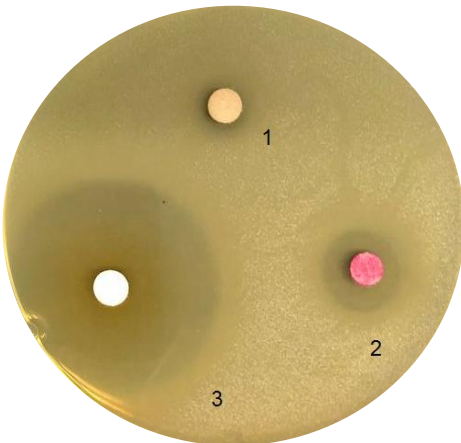




$\Delta 2$



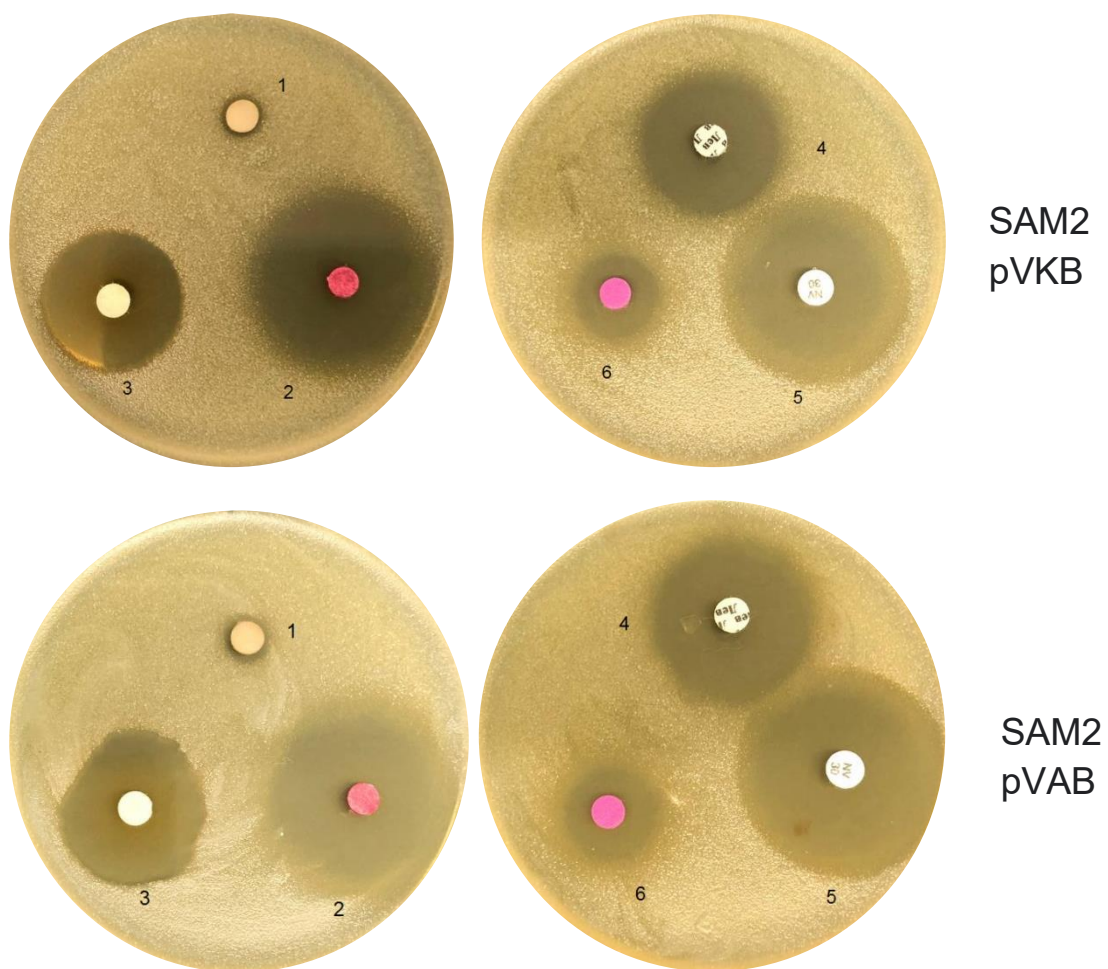
$\Delta 2$   
pVAB



$\Delta 2$   
pVKB



SAM2



Б)

	S136	S136 (pVAB)	S136 (pVKB)	$\Delta 2$	$\Delta 2$ (pVAB)	$\Delta 2$ (pVKB)	SAM2	SAM2 (pVAB)	SAM2 (pVKB)
1.La's	13	11	12	11	10	9	10	7	8
2.Tet	16	16	22	16	15	16	37	35	33
3.Rif	48	43	46	43	41	40	32	28	24
4.Lev	43	38	46	37	37	38	30	28	26
5.Nv	37	30	35	34	29	30	34	35	35
6.Ert	48	44	46	40	38	40	18	18	17

Рис. 3.5 а) Зони пригнічення росту культур *S. cyanogenus*, б) Результати вимірювання зон пригнічення штамів *S. cyanogenus* S136 дикого типу,  $\Delta 2$ , SAM2 і з надекспресією у цих штаммах pVAB та pVKB, розмір зон у мм

Аналізуючи дані таблиці (рис3.5) можемо сказати, що істотних змін в стійкості до ландоміцинів не було. Стосовно тетрацикліну штам S136(pVKB) проявляє меншу стійкість, а штам SAM2(pVKB), навпаки, більш стійкий порівняно з диким типом S136 та SAM2, відповідно. Резистентність до рифампіцину збільшується при надекспресії гена регулятора, у штамі S136 (pVAB) та SAM2(pVAB), а також при надекспресії транспортера у штамі SAM2(pVKB). Штами S136(pVAB) та SAM2(pVKB) стають більш стійкі до левоміцетину порівняно з дикими типами. Зменшення зон при дисках з новобіоцином спостерігається при введенні додаткової копії генів регуляторів у штаммах *S.cyanogenus*. Стійкість до еритроміцину не змінюється при введенні додаткових копій генів. Отримані результати можна пояснити тим, що даний транспортер може надавати множинну стійкість до різних антибіотиків як це виявлено в попередніх дослідженнях у *S. albus*.

### **3.4. Конструювання штамів *S.ghanaensis* (dO5(pTES), dO5(pVMC), dO5(pAVI21))**

#### **3.4.1 Конструювання штаму *S.ghanaensis* dO5(pAVI21)**

Для введення в dO5 гена транспортера було використано, плазмиду pVAVi21, яка містить ген *xnr\_4573*. Плазміда побудована на основі вектора pTES. Ген був виділений з штаму *S.albidoflavus*. Продукт цього гена кодує білок резистентності до метиленоміцину А та належить до родини MFS.

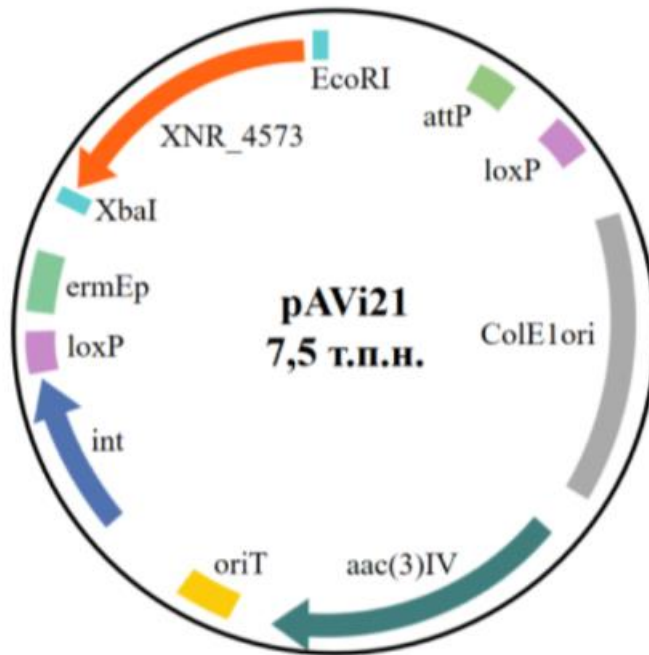


Рис. 3.6 Карта плазмиди pAVi21.

Умовні позначення: attP - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; loxP – сайт-розпізнавання рекомбінази Cre; ColE1ori- ділянка ініціації реплікації в E.coli; aac(3)IV - ген стійкості до апраміцину; oriT - ділянка ініціації кон'югативного перенесення; int (φC31) - інтеграза фага φC31, яка кодується геном int (ген int забезпечує сайт-специфічну інтеграцію); ermEp – ген промотор; XbaI та EcoRI– сайти вставки гена XNR\_4573; XNR\_4573 – ген, що кодує трансмембранний транспортер.

### 3.4.2 Конструювання штаму *S.ghanaensis* dO5(pVMC)

Дана плазмідна створена для вивчення впливу надекспресії ефлюксної помпи XNR\_2146 на стійкість лінкоміцину. Ген *XNR\_2146* є транспортером надродини MFS - це транспортери, які забезпечують переміщення різних субстратів через біомембрану. Білки цієї родини мають широкий спектр субстратів, включаючи неорганічні та органічні іони, нуклеозиди, амінокислоти, короткі пептиди та ліпіди [15].

Плазмиду pVMC ввели в дикий тип SAM2 на основі вектора pTES. Активну транскрипцію гена *XNR\_2146* забезпечує конститутивний протомор *ermEp*. Даний ген впливає на експорт лінкоміцину і забезпечує стійкість до відповідного антибіотика.

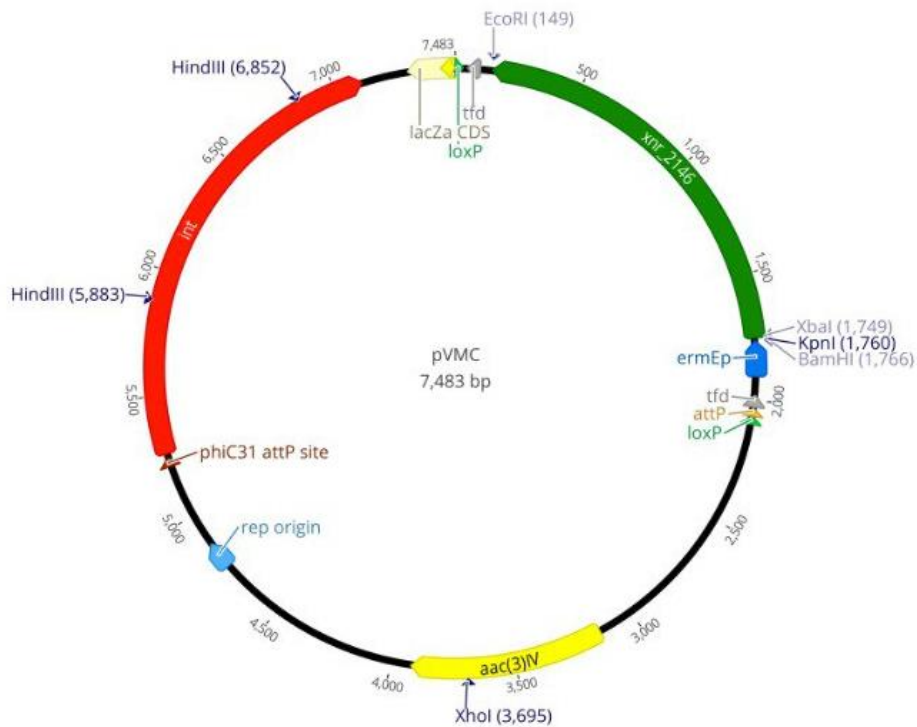


Рис. 3.7 Карта плазмиди pVMC.

Умовні позначення: *oriT* – ділянка ініціації кон'югативного перенесення; *aac(3)IV* - ген стійкості до апраміцину; *attP* - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; *int* ( $\phi$ C31) - інтеграза фага  $\phi$ C31, яка кодується геном *int* (ген *int* забезпечує сайт-специфічну інтеграцію); *ermEp* - промотор; *ColE1ori* - ділянка ініціації реплікації в *E.coli*; *loxP* – сайт-розпізнавання рекомбінази Cre; *XbaI* та *EcoRI*– сайти вставки гена *adrA*; *adrA* – ген-регулятор; *xnr\_2146* – ген стійкості до лінкоміцину

### 3.5 Аналіз росту штамів на різних середовищах

Ми проаналізували ріст штамів dO5, dO5(pVMC), dO5(pAVI21) на таких середовищах, як: GYM, NL5, TSA і OM. Результати наведено на рис. 3.8.

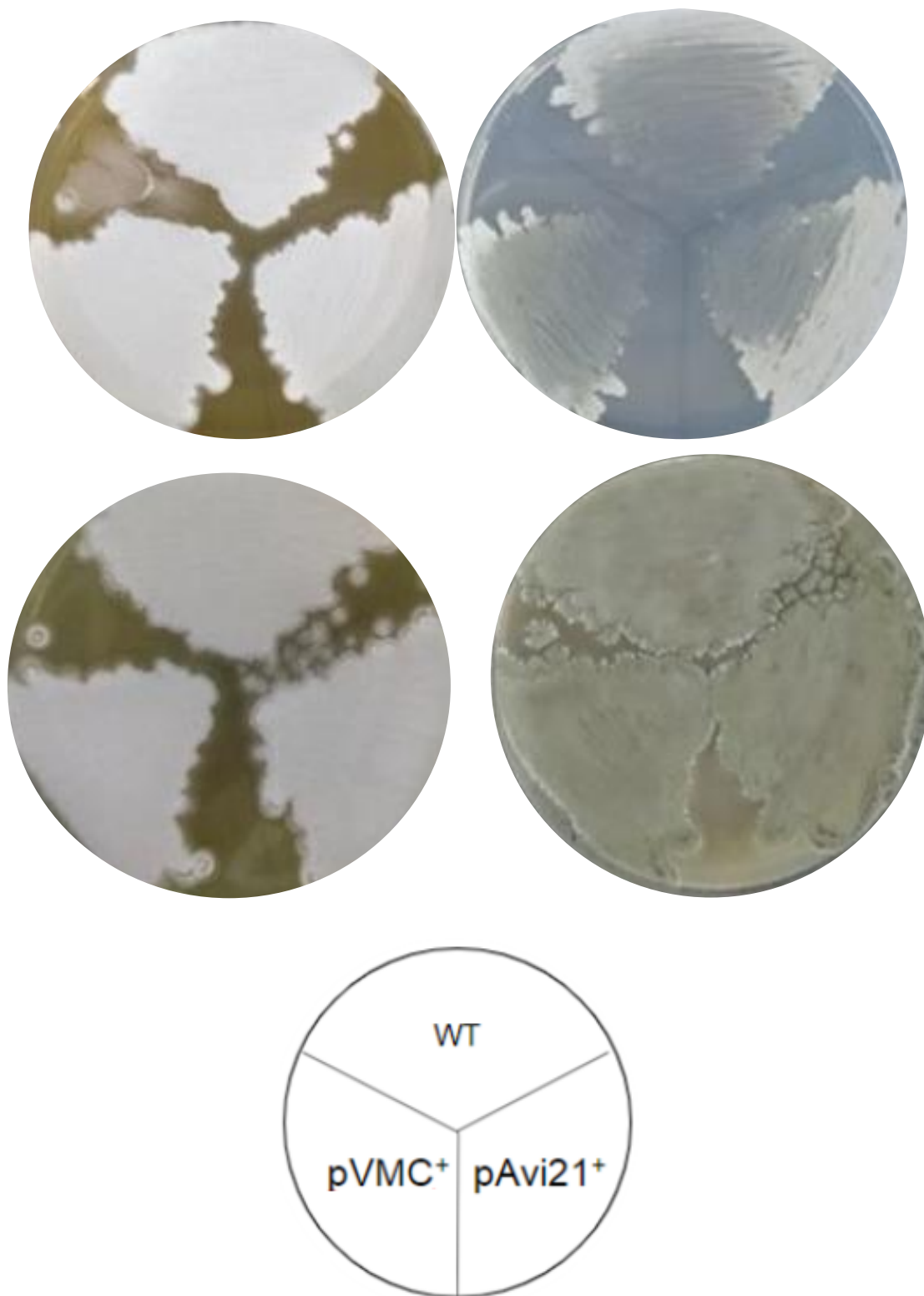


Рис. 3.8 Ріст штамів dO5, dO5(pVMC), dO5(pAVI21) на різних середовщах

Згідно з результатами (рис.3.8) можна сказати, що наявність транспортерів не впливає на ріст штамів на жодному з середовищ.

### 3.6 Дослідження антибіотичної активності транскон'югантних штамів

Для дослідження антибіотичної активності використовували метод дифузії в агар за допомогою агарових блочків. Штами *D. hansenii* VKM Y-9, *B. subtilis* HB0933, *B. cereus* ATCC19637 вирощували протягом 5 днів, вирізали блочки на поміщали на газони тест-культур. Штами dO5, dO5(pVMC), dO5(pAVI21) вирощували у рідкому середовищі, додавали в 0,7% агаризоване середовище. Через 24 години вимірювали зони.

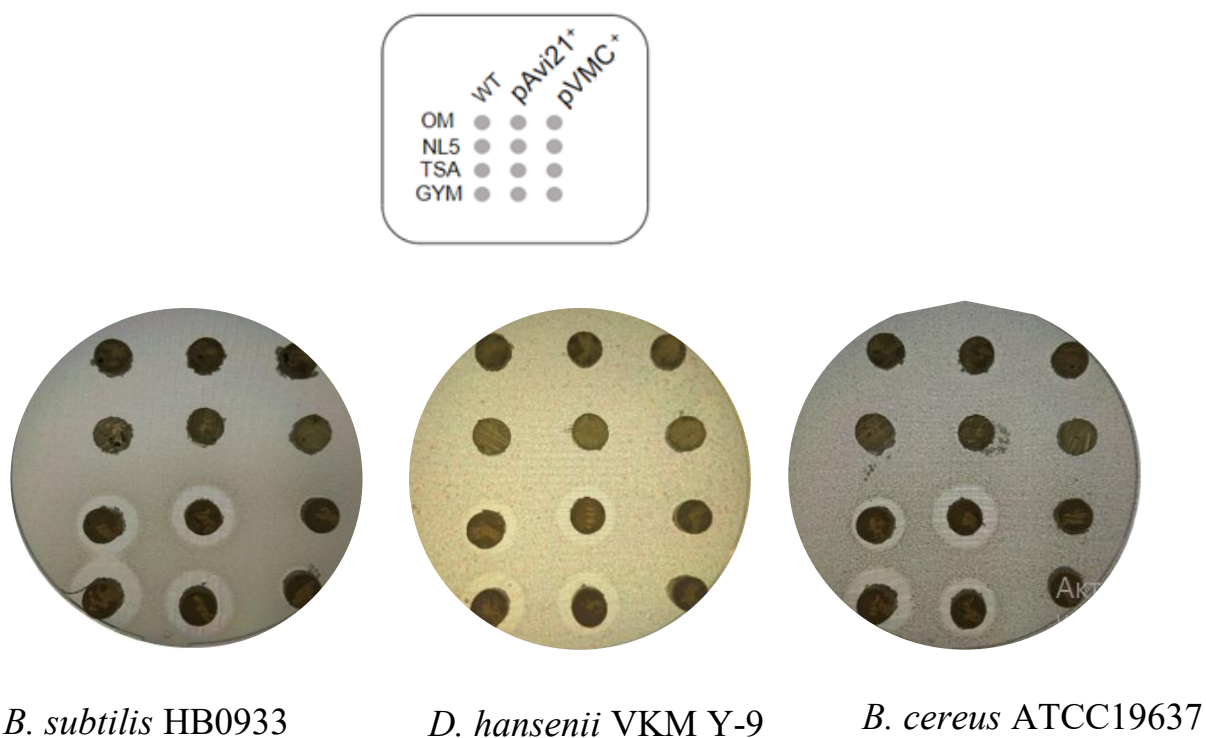


Рис. 3.9 Зони пригнічення росту штамів, вигляд чашок з дисками на 24 год росту

Підсумовуючи результати біотестів можемо сказати, що штамми dO5 та dO5(pAVI21) утворюють зони пригнічення росту зі всіма трьома культурами: *B. subtilis* HB0933, *D. hansenii* VKM Y-9 та *B. cereus* ATCC19637 вирощених

на середовищах TSA та GYM, натомість на середовищах OM та NL5 не утворюються зони. Але якщо порівнювати вихідний штам та dO5(pVMC) видимих змін не відбулося. Проте, штам dO5(pVMC) не утворює зон пригнічення росту з жодною культурою вирощеною на відповідних середовищах, що відрізняється від вихідного штаму.

За цими результатами можемо сказати, що введення копії гена *XNR\_2146* підвищує антибіотичну активність штаму *Streptomyces ghanaensis* dO5 VMC, ймовірно, через здатність помпи *XNR\_2146* викачувати ендогенні антибіотики.

Отже, надекспресія генів транспортерів не впливає на ріст штамів на середовищах, але впливає на їх антибіотичну активність.

## ВИСНОВКИ

1. Сконструйовано плазмиди pVAB та pVKВ, що містять гени *S1361\_17020* та *udfJ2*, відповідно, для дослідження впливу надекспресії цих генів.
2. Штами, що містять плазмиди pVAB та pVKВ збільшують синтез ландоміцинів порівняно з штамами дикого типу.
3. Надекспресія гена транспортера родини MMPL *udfJ2* та гена регулятора родини TetR *S1361\_17020* у штаммах *S.cyanogenus* S136, *S. cyanogenus* Δ2 та *S. albidoflavus* SAM2 не підвищує рівень стійкості до ландоміцинів.
4. Уведення плазмід pAVI21 та pVMC у штам dO5 не впливає на ріст штамів на середовищах
5. Штам dO5, що містить плазмиду pVMC, виявляє антибіотичну активність проти *B. subtilis* HB0933, *D. hansenii* VKM Y-9 та *B. cereus* ATCC19637 порівняно з диким типом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Ankita Nag, a Sarika Mehraa. A Major Facilitator Superfamily (MFS) Efflux Pump, SCO4121, from *Streptomyces coelicolor* with Roles in Multidrug Resistance and Oxidative Stress Tolerance and Its Regulation by a MarR Regulator. (2020). doi: 10.1128/AEM.02238-20.
2. Butler M., Blaskovich M., Cooper M. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // *J Antibiot (Tokyo)*. – 2017. – Vol. 70, №1. – P. 3-24. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.72>.
3. Cundliffe E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea* // *Gene*. – 1992. – Vol.115, №1-2. – P. 75-84.
4. Dangel, V., Harle, J., Goerke, C., Wolz, C., Gust, B., Pernodet, J.-L., & Heide, L. (2009). Transcriptional regulation of the novobiocin biosynthetic gene cluster. *Microbiology*, 155(12), 4025–4035. doi:10.1099/mic.0.032649-0
5. De Silva, R. S., Kovacicova, G., Lin, W., Taylor, R. K., Skorupski, K., & Kull, F. J. (2007). Crystal Structure of the *Vibrio cholerae* Quorum-Sensing Regulatory Protein HapR. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5683–5691. doi:10.1128/jb.01807-06
6. Delmar, J. A., Chou, T.-H., Wright, C. C., Licon, M. H., Doh, J. K., Radhakrishnan, A., ... Yu, E. W. (2015). Structural Basis for the Regulation of the MmpL Transporters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28559–28574. doi:10.1074/jbc.m115.683797
7. Deng, W., Li, C., & Xie, J. (2013). The underling mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors. *Cellular Signalling*, 25(7), 1608–1613. doi:10.1016/j.cellsig.2013.04.003
8. Esther P. Bonitto<sup>1</sup>, Brendan T. McKeown<sup>1,2</sup>, Kerry B. Goralski<sup>1,2,3,4</sup>. Jadomycins: A potential chemotherapy for multi-drug resistant metastatic breast cancer, 2021, DOI: 10.1002/prp2.886

9. González I., Niebla A., Lemus M. et al. Ecological approach of macrolide-lincosamides-streptogramin producing actinomyces from Cuban soils // Lett Appl Microbiol. – 1999. - Vol.29, №3. – P. 147-50.
10. Gray, K. M., & Garey, J. R. (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology*, 147(8), 2379–2387. doi:10.1099/00221287-147-8-2379
11. Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387. doi:10.1101/cshperspect.a025387
12. HENKEL, T., ROHR, J., BEALE, J. M., & SCHWENEN, L. Landomycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces* sp. I. Structural studies on landomycins A-D. *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43(5), 492–503. doi:10.7164/antibiotics.43.492
13. Hirakawa, H., & Tomita, H. (2013). Interference of bacterial cell-to-cell communication: A new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00114
14. Hoggarth, J. H., & Ritchie, D. A. (1995). Expression of novobiocin resistance genes in the novobiocin-producing organism *Streptomyces niveus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(5), 543–547. doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03097.x
15. Hoggarth, J. H., Cushing, K. E., Mitchell, J. I., & Ritchie, D. A. (1994). Induction of resistance to novobiocin in the novobiocin-producing organism *Streptomyces niveus*. *FEMS Microbiology Letters*, 116(2), 131–136. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06691.x
16. Jenkins G., Zalacain M., Cundliffe E. Inducible ribosomal RNA methylation in *Streptomyces lividans*, conferring resistance to lincomycin // *J Gen Microbiol.* – 1989.- Vol.135, №12. – P. 3281-3288. doi: 10.1099/00221287-135-12-3281
17. Juda, M., Chudzik-Rzad, B., & Malm, A. (2016). The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and

streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(3), 155–160. doi:10.1590/0074-02760150356

18. Kharel, M. K., Pahari, P., Shepherd, M. D., Tibrewal, N., Nybo, S. E., Shaaban, K. A., & Rohr, J. (2012). Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 29(2), 264–325. doi:10.1039/c1np00068c

19. Kim H., Kim SH., Ying YH. et al. Mechanism of natural rifampin resistance of *Streptomyces* spp. // *Syst Appl Microbiol.* – 2005. - Vol.28, №5. – P. 398-404. doi: 10.1016/j.syapm.2005.02.009

20. Koteva K., Cox G., Kelso JK. et al. Rox, a Rifamycin Resistance Enzyme with an Unprecedented Mechanism of Action // *Cell Chem Biol.* – 2018. - Vol.25, №4. – P. 403-412. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.009

21. Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5). doi:10.1515/hsz-2013-0292

22. Nusrath Unissa, A., & Hanna, L. E. (2017). Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. *Tuberculosis*, 105, 96–107. doi:10.1016/j.tube.2017.04.008

23. Ostash, I., Ostash, B., Luzhetskyy, A., Bechthold, A., Walker, S., & Fedorenko, V. Coordination of export and glycosylation of landomycins in *Streptomyces cyanogenus* S136. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 285(2), 195–202. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01225.x

24. Rohr, J., & Thiericke, R. (1992). Angucycline group antibiotics. *Natural Product Reports*, 9(2), 103. doi:10.1039/np9920900103

25. Sandhu, P., & Akhter, Y. Evolution of structural fitness and multifunctional aspects of mycobacterial RND family transporters. *Archives of Microbiology*, - 2017- 200(1), 19–31. doi:10.1007/s00203-017-1434-6

26. Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
27. Spanogiannopoulos P., Waglechner N., Koteva K. et al. A rifamycin inactivating phosphotransferase family shared by environmental and pathogenic bacteria // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. - Vol.111, №19. – P. 7102–7107. doi: 10.1073/pnas.1402358111
28. Spanogiannopoulos, P., Thaker, M., Koteva, K., Waglechner, N., & Wright, G. D. (2012). Characterization of a Rifampin-Inactivating Glycosyltransferase from a Screen of Environmental Actinomycetes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5061–5069. doi:10.1128/aac.01166-12
29. Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., & Kremer, L. (2017). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Molecular Microbiology*, 104(6), 889–904. doi:10.1111/mmi.13675
30. Xu, G.-M. (2016). Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00958
31. Yan, N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 2015, 44(1), 257–283. doi:10.1146/annurev-biophys-060414-033901
32. Yushchuk, O., Kharel, M., Ostash, I., & Ostash, B. Landomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, doi:10.1007/s00253-018-09601-1