

1.

Львівський національний університет імені Івана Франка

Біологічний факультет

Кафедра генетики та біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему:

*Штами і плазміди для кон'югативного перенесення ДНК між
актиноміцетами*

Виконала:

Студентка II курсу, групи БЛБ-24М
спеціальності 091 – Біологія
Багрійчук Катерина Вікторівна

Керівник: д-р біол. наук, проф.

Осташ Богдан Омелянович

Рецензент: канд. біол. наук, доц.

кафедри мікробіології

Галушка Андрій Андрійович



ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Біологічний факультет

Кафедра генетики та біотехнології

Освітньо-кваліфікаційний рівень магістр
(шифр і назва)

Спеціальність 091– біологія
(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри



"15" 09 2023 року

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ (КВАЛІФІКАЦІЙНУ) РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Багрійчук Катерини Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Штами і плазмиди для кон'югативного перенесення ДНК між актиноміцетами

керівник роботи Осташ Богдан Омелянович, д-р біол. наук, проф.

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

затвердені Вченою радою факультету від " " "


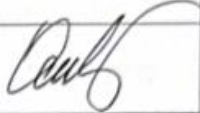


2. Строк подання студентом роботи грудень 2023

3. Вихідні дані до роботи джерела літератури й отримані експериментальні дані

4. 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)
26 рисунків, 4 таблиці

6. Консультанти розділів роботи


Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Огляд літератури	Осташ Б.О.	01.09.2023 	
Експериментальна частина	Осташ Б.О.	01.10.2023 	

7. Дата видачі завдання _____ вересень 2022 р. _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної (кваліфікаційної) роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Опрацювання наукової літератури за темою роботи	Червень-липень 2023 – вересень 2023	виконано
2.	Оволодіння методикою досліджень	Вересень 2022-вересень 2023	виконано
3.	Проведення експериментів	Вересень 2022 – листопад 2023	виконано
4.	Опрацювання результатів	Вересень-грудень 2023	виконано
5.	Оформлення роботи	Листопад-грудень 2023	виконано

Студентка


_____ (підпис)

Багрійчук К.В.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи


_____ (підпис)

Осташ Б.О.
(прізвище та ініціали)

Зміст

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Загальна характеристика кон'югативного перенесення генів у бактерій роду <i>Streptomyces</i>	8
1.1.1. Типи кон'югативних плазмід в <i>Streptomyces</i>	12
1.1.2. Білок TraB – основний компонент кон'югативного перенесення <i>Streptomyces</i> . TraR/Kor, як регулятор генів <i>tra</i>	13
1.1.3. Гени <i>spd</i> – додаткові гени при кон'югативному перенесенні <i>Streptomyces</i>	16
1.2. Приклади перенесення генних кластерів в межах бактерій роду <i>Streptomyces</i> ..	18
1.2.1. Перенесення генетичних кластерів з штамів <i>S. turgidiscabies</i> та <i>S. scabiei</i>	19
1.2.2. Перенесення генів стійкості до тіострептону між бактеріями роду <i>Streptomyces</i>	21
2. Матеріали і методи	24
2.1. Матеріали	24
2.2. Методи.....	28
2.2.1. Міжродова кон'югація <i>Escherichia coli</i> – <i>Streptomyces</i>	28
2.2.2. Кон'югація між штамми <i>Streptomyces albidoflavus</i>	29
2.2.3. Визначення титру спорових суспензій	29
2.2.4. Виготовлення компетентних клітин <i>E.coli</i>	30
2.2.5. Виділення плазмідної ДНК з <i>E. coli</i>	30
2.2.6. Трансформація клітин <i>E. coli</i>	30
2.2.7. Електрофорез зразків в агарозному гелі та елюювання фрагментів ДНК	31
2.2.8. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	31
2.2.9. Лігування фрагментів.....	32
2.2.10. Обробка ДНК ендонуклеазами рестрикції та картування плазмід	32
2.2.11. Виділення сумарної ДНК з клітин стрептоміцетів.....	32
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Біоінформатичний аналіз вибраних білків TraB	33
3.2. Конструювання та картування плазмід	37

3.3.	Конструювання колекції донорних штамів актиноміцетів	43
3.4.	Тестування умов і плазмід для кон'югативного перенесення маркерів у межах виду <i>S.albidoflavus</i>	47
3.4.1.	Внутрішньовидова кон'югація <i>S.albidoflavus</i> КО-1404 рСМА ⁺ – Del14Н.....	47
3.4.2.	Порівняння кон'югативного перенесення з <i>S.albidoflavus</i> рСМА ⁺ та <i>S.albidoflavus</i> рТКА ⁺ в Del14Н.....	49
3.4.3.	Кон'югативне перенесення зі штаму АРЕХ11 в штам-реципієнт <i>S.albidoflavus</i> Del14Н.....	50
3.5.	Перенесення маркерів за рахунок плазміди рСМА з інших актиноміцетів в геном <i>S. albidoflavus</i>	51
3.5.1.	Кон'югативне перенесення <i>S.venezuelae</i> рСМА – Del14Н.	51
3.5.2.	Кон'югативне перенесення з рСМА ⁺ штамів <i>S. cyanogenus</i> J39, <i>S. roseochromogenes</i> , <i>A.teichomyceticus</i> у штами <i>S. albidoflavus</i>	52
3.6.	Міжвидова кон'югація <i>S.venezuelae/S.albidoflavus</i> КО1404 рСМА;.....	52
	Висновки.....	55
4.	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	56

ВСТУП

Потреба у нових ліках відчувається у всіх галузях охорони здоров'я, але особливо гостро постала у лікуванні ракових та інфекційних захворювань. За даними фахівців Всесвітньої організації охорони здоров'я, у 2013 році онкологічні хвороби набули зловісного статусу основної причини смертності у світі. Зокрема, в 2010 році в світі було зафіксовано понад 6 млн. нових випадків захворювань на рак, із них 165 тисяч – в Україні. Медики прогнозують, що до 2020 року ця недуга щороку вражатиме вже понад 200 тисяч громадян України. Тому розробка і провадження нових методів лікування раку має виняткове значення для покращення тривалості і якості життя людства. Не менш гостро за останні роки постала проблема інфекційних захворювань [35].

21 вересня 2016 року усі 193 країни ООН підписали документ, в якому зобов'язалися позбавити світ від так званих “супербактерій” – штамів, стійких до більшості чи навіть усіх наявних у медичному арсеналі антибіотиків. Документ передбачає низку заходів, зокрема й те, що усі країни мають спонсорувати створення нових та модифікацію вже існуючих антибіотиків, що володіють новими механізмами дії і працювати над покращенням діагностики. Отже, є постійна потреба нових ефективних ліків проти раку та інфекційних захворювань. На вищеописані проблеми накладлась коронавірусна пандемія, яка сама по собі вимагає нових противірусних препаратів, і також приводить до безпрецедентного посилення вживання антибіотиків для лікування бактерійних і грибкових інфекцій.

Для України за умов ведення активних бойових дій невідкладним завданням також постає пошук кровоспинних засобів на основі природних, легкодоступних і відновлювальних джерел. Неконтрольоване використання низки антибіотиків “останньої надії” на лінії фронту, за неможливості дотримання асептичності та мінімальної гігієни вже починає звужувати коло антибіотиків, якими можна лікувати поранених (<https://cutt.ly/lwOHLVQe>). Відтак, як у світі так і в Україні виникає пильний інтерес до усіх можливих

джерел нових сполук, які можуть бути використані для попередження вищеописаних загроз.

Одним із найглибших джерел нових біоактивних речовин є актиноміцети – грампозитивні ґрунтові бактерії, дослідження яких привело до виявлення двох третин усіх відомих антибіотиків, і низку протипухлинних та інших типів ліків.

Серед актиноміцетів мабуть найвідомішим є рід *Streptomyces* (стрептоміцети). Хоча цей рід почали досліджувати ще з 40-х рр. минулого століття, як резервуар нових біоактивних сполук, його потенціал досі не є вичерпаним. Про це особливо яскраво засвідчили дані геноміки – в хромосомі навіть найкраще вивчених стрептоміцетів знаходиться більше двох-трьох десятків кластерів генів біосинтезу спеціалізованих метаболітів, хімічна природа яких досі залишається невідомою.

Дуже часто такі генні кластери експресуються на дуже низькому рівні або не експресуються взагалі, тобто є фенотипово мовчазними, або криптичними. Зараз у царині пошуку нових антибіотиків у актиноміцетів можна виокремити два основні виклики: а) як уникнути перевідкриття вже відомих сполук і б) як пришвидшити ідентифікацію спеціалізованих метаболітів, кодованих криптичними генними кластерами. Тому актуально опрацювати способи, які допоможуть швидко аналізувати спеціалізовані метаболоми. Наприклад, практично цікавим є розроблення способів, які б давали змогу переносити генні кластери з відносно маловивчених видів стрептоміцетів у штами-шасі – спеціально сконструйовані види з дуже низьким метаболічним тлом, що спрощує хімічний аналіз їхніх похідних. Серед таких штамів варто згадати *S. coelicolor* M1152, *S. albus* J1074 і похідні, *S. avermitilis* SUKA7.

Типовий штам роду *Streptomyces* містить 20-50 різних кластерів генів для синтезу антибіотиків та інших спеціалізованих метаболітів. Стрептоміцети утворюють великий резервуар генів у ґрунті, які можуть бути передані іншим бактеріям шляхом горизонтального перенесення генів. Серед

таких шляхів маловивченим – для стрептоміцетів – є кон'югація. Загалом, кон'югативне перенесення бактеріальних плазмід є найефективнішим способом горизонтального поширення генів, вони можуть сприяти не тільки власному перенесенню, а й перенесенню сегментів хромосом.

Кон'югацію бактерій роду *Streptomyces* вивчали протягом десятків років, але її молекулярний механізм досі не до кінця вивчений. Як і інші системи кон'югації, кон'югація *Streptomyces* залежить від присутності кон'югативних плазмід. Тим не менш, його основний механізм принципово відрізняється від відомих процесів кон'югації через системи секреції типу IV (T4SS). На відміну від класичної кон'югації, яка характеризується секрецією пілотної білка, ковалентно зв'язаного з одноланцюговою молекулою ДНК, у *Streptomyces* дволанцюгова молекула ДНК транслокується під час кон'югативного переносу. Ця передача включає один кодований плазмідною білок, TraV, та некодувальної ділянки, *clt*-локусу.

Метою нашої роботи є конструювання штамів актиноміцетів та плазмід, які стануть платформою для опрацювання методів ефективного кон'югативного перенесення ділянок актиноміцетних геномів у штам-шасі, зокрема *Streptomyces albus* J1074 і його похідні.

Об'єкти роботи: *Streptomyces albus* J1074 і похідні, інші види актиноміцетів, плазмідні pCMA, pJR301, pSG2.

Предмет роботи: кон'югативне перенесення ДНК в актиноміцетів.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

1. За допомогою біоінформатичного аналізу порівняти амінокислотні послідовності і структури білків TraV, кодованих найкраще вивченими кон'югативними плазмідами актиноміцетів;
2. Сконструювати низку нових плазмід, які будуть використовуватися для створення та аналізу нових штамів методами кон'югативного перенесення ДНК;
3. Сконструювати колекцію донорних штамів актиноміцетів;

4. Дослідити різні умови для перенесення маркерів у межах *S.albidoflavus*;
5. Дослідити можливість передачі хромосомних маркерів (головно генів антибіотикорезистентності) з різних актиноміцетів у *S.albidoflavus*;
6. Дослідити можливість передачі генетичних маркерів з донорного штаму *S.albidoflavus* КО-1404 рСМА⁺ у інші види *Streptomyces*.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика кон'югативного перенесення генів у бактерій роду *Streptomyces*

Кон'югативне перенесення в бактерій — це специфічний процес, за допомогою якого ДНК переноситься від штаму-донора до реципієнта за допомогою спеціалізованого мультибілкового комплексу. Специфікою кон'югації є тісний зв'язок між клітинними поверхнями клітин донора та реципієнта. У грамнегативних бактерій цей фізичний контакт встановлюється за допомогою складних позаклітинних ниток, які називаються статевими пілями (рис.1.1) [6].

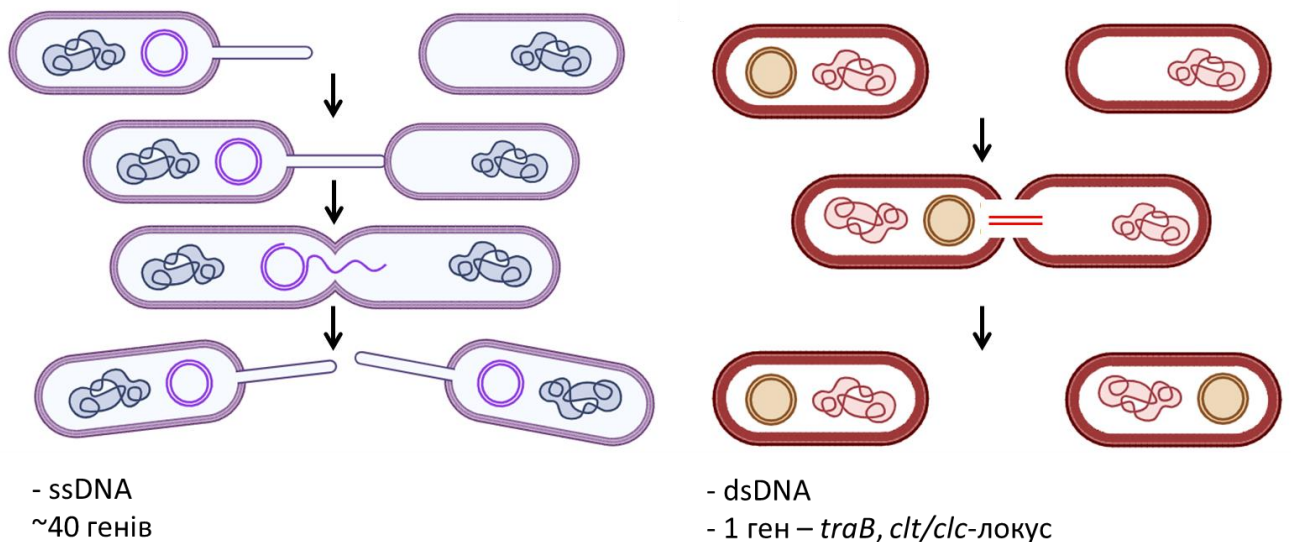


Рис. 1.1 Порівняння кон'югативного перенесення генів. Фіолетовим кольором зображена схема кон'югативного перенесення *E.coli*; червоним — бактерій роду *Streptomyces*

У більшості бактерій кон'югативна плазмідна інтегрується в хромосому в певних положеннях шляхом гомологічної рекомбінації між елементами IS. Закодована плазмідними релаксази ініціює реплікацію в oriT і спрямовує одноланцюгову молекулу ДНК до кодованої плазмідною системи секреції білка IV типу. У *Streptomyces* ДНК-трансфераза TraB нековалентно

зв'язується з локусом *clt* і переносить дволанцюгову молекулу плазмід. Оскільки *TraB* також розпізнає *clt*-подібні хромосомні послідовності, які розподілені по всій хромосомі, *TraB* може напряму переносити хромосомні маркери, не покладаючись на попередню інтеграцію плазмід [27].

Кон'югація ДНК у бактерій роду *Streptomyces* - унікальний процес, що включає перенесення дволанцюгової плазмід від донора до реципієнта та подальше поширення перенесеної плазмід в міцелії реципієнта [29].

У *Streptomyces* і споріднених актиноміцетів навіть невеликі багатокопійні плазмід розміром <10 кб зазвичай самотрансмисивні та здатні мобілізувати гени хромосомної стійкості та ауксотрофні маркери [14]. Ці плазмід зазвичай не надають фенотипових ознак. Ефективність перенесення досягає майже 100% і від 0,1% до 1% транскон'югантів отримують хромосомні фрагменти під час кон'югативного перенесення.

Однією з відмінностей від інших бактерій є те, що стрептоміцети ростуть шляхом апікального розширення верхівки, а не діляться шляхом подвійного поділу, наприклад як: *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis*, які, як і в більшості паличкоподібних бактерій, поділ яких залежить від актиноподібних білків *MreB* [34]. Розширення апікальної верхівки *Streptomyces* відбувається за допомогою *mreB*-незалежного механізму. Включення нових попередників пептидоглікану (PG) на кінчиках залежить від згорнутих білків *DivIVA*, *Scy* і *FilP* [8,9].

Іноді утворюються перегородки та з'являються точки розгалуження. Міцелій *Streptomyces* багатоядерний і містить кілька копій лінійної хромосоми з прикріпленими білками теломерази. Процес, що нагадує поділ клітини, відбувається під час морфологічної диференціації.

Ці особливості росту впливають на процес кон'югативного перенесення ДНК. В обміні ДНК шляхом кон'югації *Streptomyces* задіяний субстратний міцелій [31].

На відміну від кон'югативного перенесення плазмід у інших бактерій, перенесення плазмід у *Streptomyces* не потребує великої кількості генів, лише

один білок TraB, кодований плазмідом, є достатнім для перенесення дволанцюгової молекули ДНК до реципієнта [22].

У плазмідах наявні 4 локуси, залучені до кон'югації: *traB* (*kilA*) - кодує ДНК-транслоказу, кон'югація не спостерігається за відсутності цієї ділянки, *traR* (*korA*) - кодує транскрипційний репресор типу GntR, *clt*-сайт – некодуюча послідовність, необхідна для перенесення плазмід та *spd*- гени, які не важливі для кон'югативного перенесення плазмід, але впливають на розмір поків, відповідають за поширення копій плазмиди в міцелії реципієнта [31].

При контакті з бічними стінками гіфів індукуються експресія *traB*, потенційно у відповідь на невідомий сигнал. Тим часом пептидогліканові шари як донора, так і реципієнта повинні бути розчинені за допомогою пептидоглікангідролази. TraB утворює гексамерну мембранну пору і, можливо, також індукуює злиття мембран донора та реципієнта та використовує енергію гідролізу АТФ для переміщення дволанцюгової молекули плазмиди до реципієнта (рис.1.2) [6, 16].

TraB спрямовує перенесення плазмиди, специфічно розпізнаючи некодуючий локус *clt*. Делеція *clt* має негативну дію на кон'югативне перенесення плазмиди, але не впливає на перенесення хромосомних генів [25]. Це свідчить про те, що хромосоми *Streptomyces* містять власні локуси *clt*. Оскільки, послідовність розпізнавання TraB містить лише мотив довжиною 8п.н., ймовірно, що *clt*-подібні послідовності можуть також присутні на хромосомах *Streptomyces* [6,18].

Процес кон'югації у *Streptomyces* дуже відрізняється від генетичного обміну в інших бактеріях не лише за його молекулярним механізмом, але й за його фенотиповим виглядом. Кон'югація відбувається лише на твердих середовищах і на ранній фазі росту. Кінчики міцелію донора і реципієнта знаходять один одного на твердому середовищі без участі системи агрегації, кодованої плазмідами. Невідомий сигнал, випущений реципієнтом, ймовірно, індукуює експресію *traB* у донора.

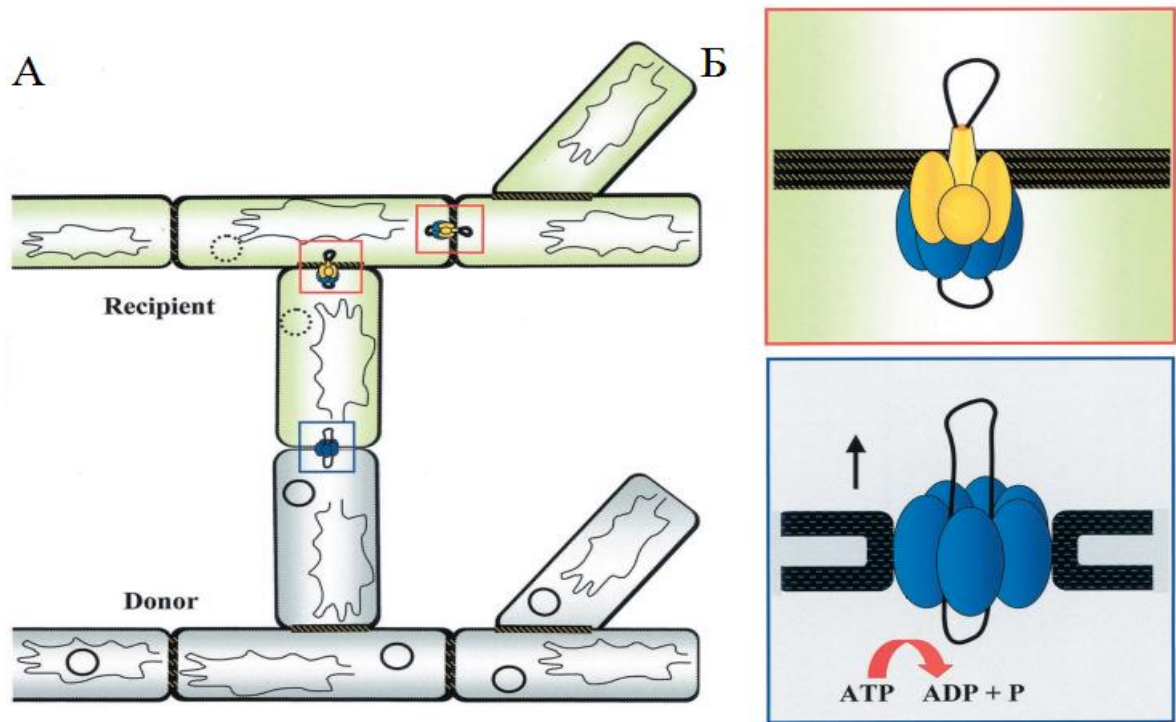


Рис. 1.2 Модель кон'югативного перенесення плазмід у бактерій роду *Streptomyces*. А) У присутності білка Tra відбувається злиття гіфів. Тра-комплекс утворює кільцеподібну гексамерну структуру навколо дволанцюгової плазмиди. Б) Залежно від гідролізу АТФ молекула плазмиди транслокується через Тра-пору в реципієнт. Нова плазміда згодом поширюється в сусідні ділянки міцелію через гідрофобні білки Spd, які утворюють пороподібну структуру в поперечних стінках перегородки [5].

TraV рекрутує білки механізму синтезу PG для прямого злиття шарів PG на кінчиках гіф. Гексамери TraV збираються в локусі плазмиди *clt* і утворюють при частковому злитті мембран структуру пор для реципієнта. При гідролізі АТФ дволанцюгова плазмідна ДНК транслокується. Для цього етапу можуть знадобитися додаткові білки, кодовані хромосомами, наприклад, топоізомераза. Після первинного перенесення щойно перенесена ДНК поширюється через поперечні стінки перегородки до сусідніх компартментів, що призводить до швидкої

колонізації міцелію реципієнта вхідною плазмідом. Розповсюдження плазмід включає різні кодовані плазмідами білки Spd на додаток до TraB [27].

Оскільки частини міцелію реципієнта, які щойно отримали вхідну плазмиду, не мають функціонального репресора транскрипції TraR, індукуються транскрипція генів *tra*. Ця тимчасова надлишкова експресія цих генів призводить до пригнічення росту та уповільнення морфологічної диференціації, що проявляється характерними видимими зонами, які називаються поками. Тобто якщо донора, що несе плазмиду, поміщають на чашки з агаром разом із спорами штаму-реципієнта, що не містить плазмід, утворюються характерні порожнисті структури, які видно неозброєним оком завдяки макроскопічно видимим зонам пригнічення росту, що й свідчить про перенесення плазмід. У цій структурі морфологічна диференціація реципієнтного міцелію, який щойно отримав плазмиду, тимчасово сповільнюється. Ці структури мають діаметр кількох міліметрів і вказують на область, де реципієнт отримав плазмиду. Наприклад, у *S.lividans* це пригнічення росту супроводжується індукцією синтезу пігментованого антибіотика актинородину. Перенесення плазмід за допомогою кон'югації у *Streptomyces* було виявлено саме за рахунок утворення цих морфологічно змінених структур на поверхні газонів [1, 5].

Якщо для перенесення ділянки від донора до реципієнта потрібна лише дія одного основного гена, для поширення через поперечні стінки в міцелії реципієнта потрібні три-п'ять додаткових генів. Ці розповсюджені гени часто трансляційно поєднані та кодують невеликі гідрофобні білки, які не виявляють великої подібності послідовностей один до одного або до будь-якого іншого білка в базах даних. Якщо інактивувати один ген *spd* поки не будуть утворюватися.

1.1.1. Типи кон'югативних плазмід в *Streptomyces*

Першим типом кон'югативних плазмід роду *Streptomyces* – великі лінійні плазмиди. Наприклад, плазмиди SCP1 з *S.coelicolor* була однією з

перших плазмід *Streptomyces*, на яких вивчали кон'югативне перенесення ДНК. Зокрема, виділили штами, що містять дану плазмиду, які переносили хромосомні маркери з підвищеною частотою. Ці лінійні плазмиди, ймовірно, часто рекомбінують з лінійною хромосомою, що призводить до обміну кінців плазмиди та хромосоми. Оскільки хромосомні кінці *Streptomyces* не містять основних генів, втрата хромосомного кінця зазвичай не є летальною для штамів [6].

Плазмиди *Streptomyces* також включають інтегративні плазмиди, такі як pSAM2 або pMEA300. Ці елементи можуть існувати автономно або інтегруватися в хромосому за допомогою сайт-специфічної рекомбінації. Інтеграція відбувається шляхом сайт-специфічної рекомбінації, опосередкованої інтегразою через сайт приєднання, який перекривається з геном хромосомної тРНК. Різні плазмиди інтегруються в різні гени тРНК. Оскільки тРНК досить консервативні, діапазон господарів інтеграційної системи є ширшим, ніж діапазон господарів для автономної реплікації. Для кон'югативного переносу pSAM2 необхідне її вирізання та автономна реплікація [6].

Ще один тип плазмід включає великі стабільні низькокопійні плазмиди. Загалом, охарактеризовано небагато плазмід з низьким числом копій. Найкраще вивченим представником є SCP2, перша плазміда *Streptomyces*, яка була фізично виділена. SCP2, яка допускає клонування великих фрагментів, що кодують шляхи біосинтезу антибіотиків [6].

1.1.2. Білок TraB – основний компонент кон'югативного перенесення *Streptomyces*. TraR/Kor, як регулятор генів *tra*.

Родина транслоказ FtsK/SpoIIIE включає білки, які беруть участь у перенесенні бактеріальної хромосоми. Білки FtsK і SpoIIIE відіграють важливу роль під час сегрегації хромосом у бактерій, у процесах поділу клітин і спорування [21].

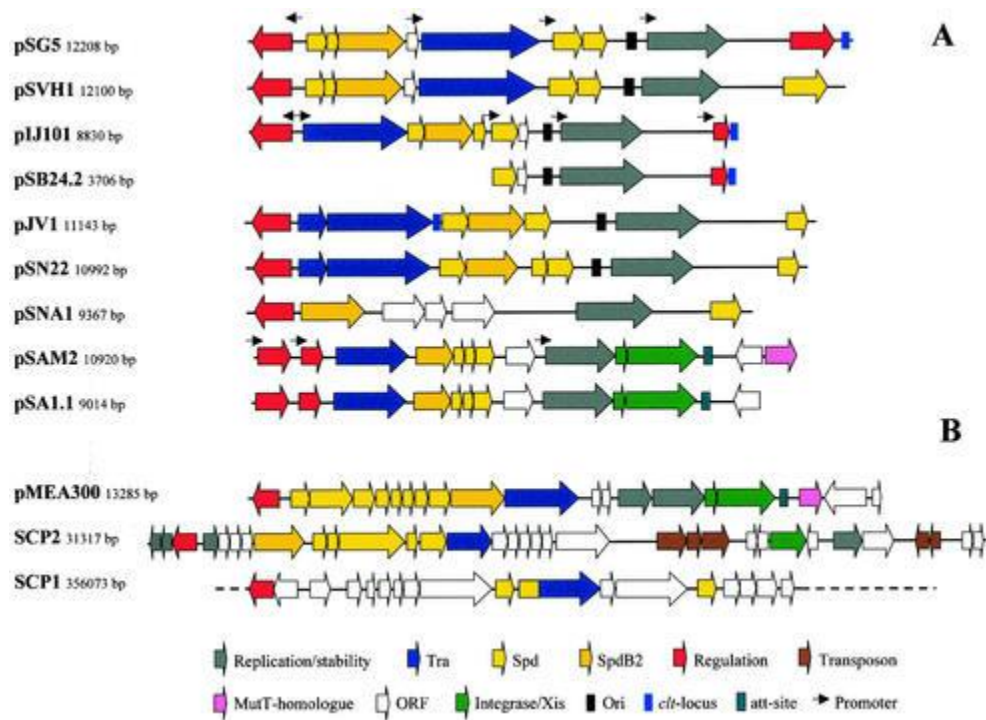


Рис. 1.3 Порівняльна характеристика генетичної організації кон'югативних плазмід актиноміцетів. Усі плазмиди взяті, починаючи з регуляторного гена типу GntR. Ідентичні кольори вказують на подібну функцію. Регуляторні гени наведено червоним кольором; гени, залучені до внутрішньо міцеліального поширення плазмиди жовтим кольором; помаранчевий, *spdB2*; синім гени *tra*; сірим, гени залучені до реплікації; зелений, ген інтеграції/вирізання/рекомбінації; коричневий, транспозон. Стрілки вказують регіони з активністю промотора. (А) Кільцеві плазмиди *Streptomyces*. (В) Плазмиди актиноміцетів не кільцеві [6].

Ці білки складаються з N-кінцевого домену із кількома трансмембранними спіралями; домену, який є спільним для всіх ResA-подібних гексамерних АТФаз; і С-кінцевого γ -домену, який надає специфічність у зв'язуванні ДНК і визначає спрямованість перенесення ДНК. Зокрема, С-кінцевий домен бере участь у специфічному до певної послідовності зв'язуванні ДНК [28].

Було виявлено близький гомолог цих білків, що бере участь у кон'югативному перенесенні плазмід у бактерій роду *Streptomyces* – білок TraV. Передбачена структура, доменна організація та характеристики зв'язування ДНК TraV дозволяють припускати, що система кон'югації TraV походить від FtsK-подібного предка [28].

TraV формують кільцеві гексамери, з N-кінцевими трансмембранними спіралями, доменом АТФази та С-кінцевий домен, який має будову спіралі-повороту-спіралі (wHTH) [4]. TraV мають високоспецифічну ДНК-зв'язувальну активність, кожен з яких розпізнає повтори TRS довжиною 8 п.н. у локусі *clt*. Області *clt* різних плазмід *Streptomyces* не виявляють жодної подібності послідовностей, але часто містять повторювані послідовності, які мають здатність утворювати вторинні структури [7].

Змодельована структура TraV демонструє шестикратну симетрію з діаметром $\sim 11,8$ і порою $\sim 3,1$ нм, достатньою для транслокації дволанцюгової молекули ДНК (рис.1.4 F). [31] Також показана їх здатність взаємодіяти з пептидогліканом під час транслокації ДНК між клітинами донора та реципієнта [30].

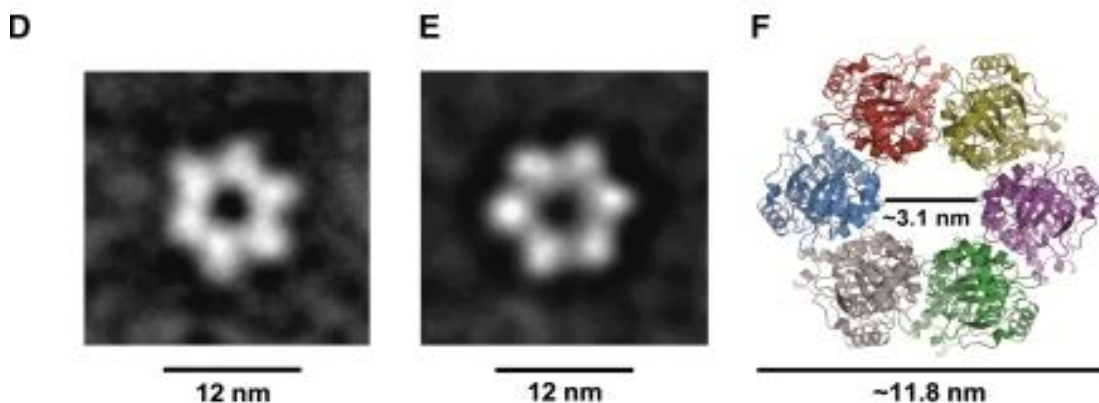


Рис. 1.4 D,E- електронно-мікроскопічні зображення гексамерів TraV; F- Модель домену TraV_{pSVH1} ДНК-транслокази [28].

Гени *tra* більшості плазмід *Streptomyces* знаходяться під транскрипційним контролем репресора типу GntR (TraR/Kor). Нерегульована

експресія *tra* є токсичною, тому спочатку ген *tra* називали *kill* [5]. Відомо різні механізми регуляції даних генів, зокрема для плазміди *S. lividans* pIJ101 було показано, що клонування N-домену Tra достатньо для токсичної дії. Припускається, що, оскільки, N-кінець містить гідрофобну область Tra з трансмембранною спіраллю, надмірна експресія мембранозв'язуючого домену білка Tra заважає цілісності мембрани [6].

Однак, білки Tra виділені з інших плазмід, таких як: pSA1.1 з *S. azureus* і pSG5 з *S. ghanaensis* не мають такого негативного впливу. Нерегульована експресія цих генів викликає пригнічення утворення спор або, у випадку pSG5, тимчасову затримку процесу диференціювання [6].

Усі кон'югативні плазміди *Streptomyces* кодують транскрипційний репресор TraR типу GntR [12]. Показано, що TraR перекриває токсичні ефекти нерегульованої експресії TraV шляхом зв'язування з так званими повторами *tre* в промоторній області *traV* [26].

У більшості плазмід репресор TraR/KorA транскрибується з *tra* і зв'язується з повторами, розташованими в міжгенній області, пригнічуючи транскрипцію гена *tra* [6,28].

1.1.3. Гени *spd* – додаткові гени при кон'югативному перенесенні *Streptomyces*

Як вже було пояснено раніше, для перенесення від донора до реципієнта потрібен лише TraV, але є кілька білків, що кодуються плазмідами (Spd), які беруть участь у поширенні плазміди вздовж гіфів. Кон'югативні плазміди *Streptomyces* зазвичай містять два або більше генів *spd*, які кодують гідрофобні білки різних розмірів, не виявляють ідентичності послідовності до будь-яких інших білків у базах даних, тобто є унікальними, винятком є білок SpdB2 [10, 17].

Гідрофобні білки Spd, ймовірно, утворюються разом із Tra, пороподібною структурою в поперечних стінках перегородки реципієнта, і

також допомагають поширювати плазмиду до інших частин колонії *Streptomyces*. Поширення плазмиди забезпечує колонізацію більшої частини міцелію реципієнта плазмидою. Оскільки компартменти міцелію реципієнта, які щойно отримали вхідну плазмиду, не мають функціонального репресора транскрипції TraR, індукується транскрипція *tra*. Ця тимчасова надлишкова експресія Tra призводить до пригнічення росту та уповільнення морфологічної диференціації, що проявляється характерними структурами поків [6].

За допомогою біоінформатичного аналізу вторинної структури виявлено, що більшість Spd-білків є мембранними білками. Жоден з Spd-білків не має значної подібності до функціонально охарактеризованого білка, що ускладнює прогнозування їх молекулярних функцій. Лише Spd-білки плазмиди pSVH1 були охарактеризовані щодо взаємодії з ДНК, зв'язування з PG та білок-білкової взаємодії [27,31].

Відомо, що інтегральний мембранний білок SpdB2 плазмиди *S.venezuelae* pSVH1 має неспецифічну активність зв'язування ДНК і олігомеризується до більших структур. Також показано, що SpdB2 взаємодіє з TraV і Spd79, що свідчить про існування багатобілкового механізму, який бере участь у поширенні плазмід [31].

SpdB2 утворює нестабільні пори в ліпідних шарах, що підвищує ймовірність того, що утворення пор SpdB2 може бути залучено до інтраміцеліального поширення через поперечні стінки реципієнта [16,17].

SpdB2, кодований опероном *spdB3–spd79–spdB2*, є єдиним білком Spd, який має чіткий гомолог у всіх кон'югативних плазмідах *Streptomyces*. Експресія SpdB3 з pSVH1 в *E. coli* є токсичною, цей білок взаємодіє сам з собою та SpdA [24].

Численні взаємодії TraV і різних Spd-білків свідчать про мультибілковий комплекс ДНК-транслокації, який бере участь у поширенні внутрішньоміцеліальної плазмиди.

Також гомологи SpdB2 також були виявлені на актинофагах де вони могли відігравати роль у розподілі фагової ДНК до сусідніх компартментів [31].

Функції білків SpdA різноманітні в різних плазмідах. Показано, що SpdA2 pIJ101 впливає на стабільність сегрегації [15,28]. В плазміді pSN22 роль SpdA полягає у поширенні плазміди, тоді як інактивація *spdA* в pJV1 не викликала фенотипових змін [13,23]. SpdA з плазміди pSVH1 зв'язується з консервативною паліндромною послідовністю, пов'язаною з кодуючою областю, взаємодіє з SpdB3, Spd79, SpdB2 і TraB. Припускають, роль SpdA полягає в з'єднанні реплікації/сегрегації плазміди з апаратом транслокації ДНК.

1.2. Приклади перенесення генних кластерів в межах бактерій роду *Streptomyces*

Перші експериментальні докази нового механізму кон'югативної системи переносу ДНК *Streptomyces* на прикладі *Streptomyces ambofaciens* pSAM2, який був чутливим до присутності системи рестрикції/модифікації SalI у реципієнта. Використовували різні маркери резистентності: *S. lividans* (TK23, стійкий до спектиноміцину; TK24, стійкий до стрептоміцину) і два штами похідні pSAM2 (pOS924 - AmR; pOS923 - HygR), щоб дослідити можливість генетичний обмін між двома донорськими штамми, TK23(pOS924) і TK24(pOS923). Частка резистентних до гігроміцину TK23 або апраміцин-стійких клонів TK24, отриманих після спарювання, становила лише 0,1%. У 80% випадків була присутня лише одна похідна pSAM2; у 20% випадків обидва похідні pSAM2 були інтегровані разом. У випадку коли переносили 2 плазміди, було виявлено, що 90% клонів, отриманих після одного циклу споруляції без селективного тиску, втратили одну з двох похідних [20,36].

У цьому дослідженні похідний pSAM2 не можна було перенести в *S.lividans* TK23, що експресує SalI, тоді як pSAM2 було ефективно перенесено в TK23 без системи рестрикції SalI. Оскільки перенесена ДНК, очевидно, була деградована SalI і оскільки SalI розпізнає лише дволанцюгову ДНК як субстрат, але не одноланцюгову ДНК, вхідна ДНК має бути дволанцюговою [20,36].

1.2.1. Перенесення генетичних кластерів з штамів *S. turgidiscabies* та *S. scabiei*

Прикладом успішного перенесення ділянок хромосоми між стрептоміцетами є перенесення острова патогенності з штамів *S. turgidiscabies* та *S. scabiei* в інші види роду *Streptomyces* [36].

У дослідженні, як штами – донори використовували *S. turgidiscabies* Car811 з маркером стійкості до тіострептону (thio^R), і мутантний штам *S. scabiei* у якому замінили гени біосинтезу лантибіотиків *lanA* і *lanB*, розташованих у TR, маркером резистентності до гігроміцину В (hyg^R) - *S. scabiei* Δ *lanAB* [36].

Вторинним метаболітом цих штамів є такстомін А (ThxA). Для його біосинтезу потрібні дві синтетази, кодовані *txtA* і *txtB*, монооксигеназа P450 (TxC), синтаза оксиду азоту (TxD) і цитохром P450 (TxTE) [3,36].

ThxA має унікальний механізм дії як детермінанта патогенності: він пригнічує синтез целюлози в клітинах рослин. Зараження рослин спричиняє гіпертрофію клітин і затримку росту. Тіотоксини мають потенціал для використання як природні гербіциди. У *S.scabiei* біосинтетичний кластер ThxA розташований у мобільному острові патогенності (PAI) розміром 177 кб, який називається токсигенною ділянкою (TR). У *S.turgidiscabies* кластер генів синтезу ThxA розташований на острові патогенності розміром 674 кб (PAIst) (рис.1.5) [36].

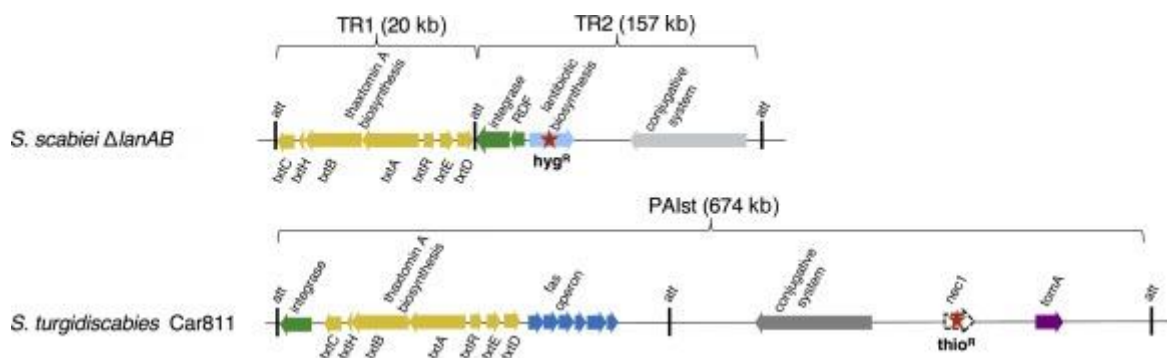


Рис. 1.5 Схематична генетична організація патогенних ділянок *S.scabiei* ΔlanAB (TR) і *S.turgidiscabies* Car811 (PAIst) з маркерами стійкості до антибіотиків. Поля зі стрілками показують розташування та орієнтацію відкритих рамок зчитування. Червоні зірочки - розташування маркерів стійкості до антибіотиків, зокрема *hyg^R* – резистентність до гігроміцину В; *thio^R* – стійкість до тіострептону; *att*, сайт прикріплення [36].

Метою досліджень було перевірити гіпотезу: чи генетичне походження реципієнта PAIst може вплинути на те, чи надає придбання PAIst фенотип патогенності. Для цього провели кон'югативне перенесення *S. turgidiscabies* і *S. scabiei* з непатогенними штамами різних видів *Streptomyces* і створили десять непатогенних штамів *Streptomyces* або з *S. turgidiscabies* 674-kb PAIst, або *S. scabiei* 177-кб TR. Штами – реципієнти схрестили з *S. albus*, *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. avermitilis*, в які було клоновано плазмиду pSET, яка має маркер стійкості до апраміцину та *S. diastatochromogenes* (*str^R*) [36]. В результаті були отримані транскон'юганти - *S. albus*/PAIst, *S. coelicolor*/PAIst, *S. lividans*/PAIst, *S. avermitilis*/PAIst стійкі до тіострептону + апраміцину та штам *S. diastatochromogenes* /PAIst стійкий до тіострептону+стрептоміцину, що підтверджує перенесення ділянки хромосоми з *S. turgidiscabies* 674-kb PAIst .

Також після схрещувань, донором в яких виступав *S. scabiei* 177-кб TR отримали транскон'юганти: *S.albus*/ TR, *S.coelicolor*/TR, *S.lividans*/ TR,

S. avermitilis/ TR стійкі до гігromіцину + апраміцину та штам *S. diastatochromogenes* / TR стійкий до гігromіцину + стрептоміцину. Згодом, оцінювали синтез ThxA в цих 10 штаммах з п'яти транскон'югантів, що схрещували з *S. scabiei* TR, чотири виробляли Thx, але в різних кількостях. *S. diastatochromogenes* /TR і *S. avermitilis* /TR виробляли ThxA у значно більшій кількості, ніж *S. scabiei*. Проте, *S. albus*/TR і *S. coelicolor*/TR виробляли значно меншу кількість ThxA, а *S. lividans* /TR не виробляв виявленого рівня ThxA [36]. Серед п'яти транскон'югантів, в схрещувань який донорним штамом був *S. turgidiscabies* PAIst, лише *S. diastatochromogenes*/PAIst і *S. avermitilis*/PAIst продукували ThxA [36].

1.2.2. Перенесення генів стійкості до тіострептону між бактеріями роду *Streptomyces*

Іншим прикладом перенесення великих фрагментів ДНК від одного штаму *Streptomyces* до іншого було перенесення між штамми-донорами *S. coelicolor* та штамом-реципієнтом *S. lividans* Для цього творили плазмиди: рНУ207, похідну плазмиди кишкової палички рUC119, що містить сегмент *actI-ORF3 – actVII-actIV* кластера генів біосинтезу актинородину (*act*), касета *korAB-tra* з рIJ101 з одного боку та ген стійкості до тіострептону *tsr* з іншого; контрольна плазміда рНУ205, яка була подібна до рНУ207, але не мала касети *korAB-tra*. Далі ці плазмиди трансформували в *S. coelicolor* CH1, які використовували як штамми-донори в наступних експериментах. Зокрема, в штам *S. coelicolor* HZ207 клонували рНУ207, а *S. coelicolor* HZ205 - рНУ205. Обидва штамми мали фенотипову ознаку – блакитний колір та ген стійкості до тіострептону, який перенесли разом з плазмідною. Штамом-реципієнтом у кожному випадку був *S. lividans* K4-114, похідний ТК24 (*Str^r*), у якому весь *act* кластер делетували і замінили на ген *ermE* [1136]. Схеми геномів штамів-донорів та реципієнтів можна побачити на рис.1.6.

Ефективність перенесення кластера генів актинородину від *S. coelicolor* до *S. lividans*, вимірювали, як частки колоній Str^r , які також були Thio^r , становила 10^{-5} , 10^{-5} , 10^{-7} та 10^{-5} у чотири незалежні експерименти, проведені на HZ207. У випадку HZ205 колонії $\text{Thio}^r\text{Str}^r$ не виявлено - межа виявлення 10^{-8} . Зокрема, як і очікувалося, всі $\text{Thio}^r\text{Str}^r$ колонії, отримані в експерименті з HZ207, виробляли синій пігмент, що свідчить про біосинтез актинородину. Щоб підтвердити, що перенесення залежить від експресії гена *tra* в донорі, було сконструйовано рНУ219, який ідентичний рНУ207, за винятком того, що касету *korAB-tra* замінено злиттям *ermEp*-tra*. Тому очікувалося, що ген *tra* буде експресуватися на вищому рівні з цієї плазміди, ніж з рНУ207. Ефективність перенесення *act* кластера з *S. coelicolor* до *S. lividans* зростає від 10^{-5} до 10^{-3} , у присутності злиття *ermEp**.

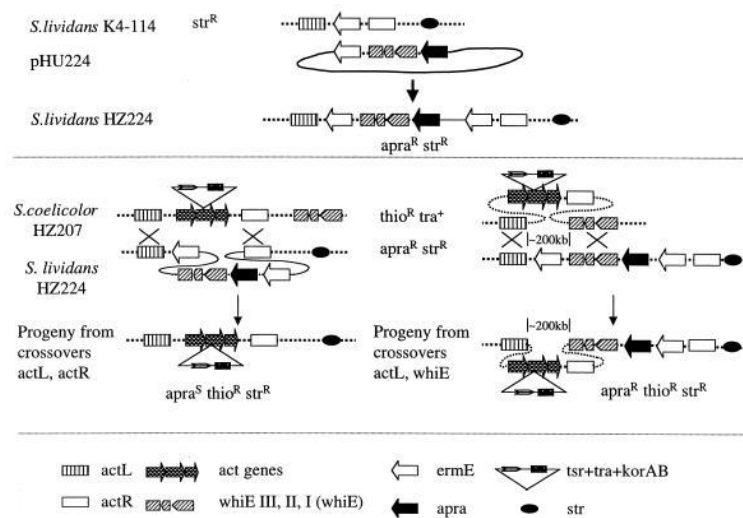


Рис. 1.6 Кон'югативне перенесення ділянки *act-whiE* з *S.coelicolor* в штам *S.lividans*. Можливі два варіанти перенесення: Ліворуч, коли лише кластер генів *act* переноситься та інтегрується шляхом кон'югації та гомологічної рекомбінації від HZ207 до HZ224(екскон'юганти мають бути $\text{Act}^+ \text{Thio}^r$, але Apr^s). Праворуч, коли переноситься весь сегмент хромосоми між кластерами генів *act* і *whiE* (екскон'юганти $\text{Act}^+ \text{Thio}^r \text{Apr}^r$) [11].

Для оцінки перенесення більших ділянок хромосомної ДНК визначали частоту, з якою переносяться ділянки *act* і локуси *whiE*. Для цього сконструювали штам похідний *S. lividans* K4-114, в якому касета розміром 5,2 кб, що складається з локусу *whiE S.coelicolor* і маркерного гена резистентності до апраміцину, була інтегрована в ген *ermE S. lividans* K4-114.

Плазмиду pHU224 інтегрували у хромосому *S. lividans* K4-114 шляхом гомологічної рекомбінації з утворенням штаму *S. lividans* HZ224. Провели кон'югативне перенесення використовуючи штам HZ207, як донор та штам HZ224, як реципієнт. Передбачалося, що екскон'юганти Thio^r Str^r Act⁺ можна отримати двома способами. 1) Якби тільки кластер гена *act* був перенесений в геном реципієнта, екскон'югант був би чутливим до апраміцину. З іншого боку, якщо *act* і кластери генів *whiE* були спільно перенесені з генома донора в геном реципієнта, тоді екскон'югант був би стійким до апраміцину. Були проведені два незалежні експерименти з кон'югації зі співвідношенням спор HZ207/HZ224 1:5 і 1:250. Фракції Thio^rStr^rAct⁺ колоній, які також були Apr^r, становили 24 і 4% відповідно, з понад 1000 оцінених колоній. Цей результат свідчить про те, що перенесення великого сегменту геномної ДНК можливе і частота перенесення такого сегмента є досить значною [11].

2. Матеріали і методи

2.1. Матеріали

Бактерійні штами та плазміди. Штами бактерій, які були використані, наведено у таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Штами бактерій, використані у роботі

Штам	Характеристика
<i>E. coli</i> ET12567	Штам, який використовувався для кон'югаційного перенесення ДНК, F ⁺ .
<i>E. coli</i> DH5α	Штам для трансформації, мутантний за такими, як генами: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>lacZΔM15</i>
<i>E. coli</i> GB2005	Штам для рутинного клонування ДНК; F-
<i>Streptomyces albidoflavus</i> APXH1 pCMA ⁺	Похідний <i>S.albidoflavus</i> , ауксотрофн за триптофаном та гістидином, містить ген <i>lacZ</i> інтегрований в <i>attB</i> ^{φC31} та плазмиду pCMA, Am ^r
<i>S. albidoflavus</i> KO-1404	Похідний KO1307, стійкий до стрептоміцину, лінкоміцину, еритроміцину, рифампіцину (Str ^r Lin ^r Ery ^r Rif ^r)
<i>S.albidoflavus</i> Del14H	Похідний <i>S.albidoflavus</i> , штам, позбавлений 14 генних кластерів, містить ген стійкості до гігроміцину (плазміда pS12L90KH, інтегрована в сайт актинофага phiBT1)
<i>S.venezuelae</i> ATCC10712	Продуцент хлорамфеніколу дикого типу
<i>S.venezuelae</i> pCMA ⁺	Похідний ATCC10712. Містить плазмиду

	pCMA(Am ^R)
<i>E.coli</i> ET12567 pCMA	Штам, який використовувався для перенесення pCMA в актиноміцети
<i>E. coli</i> ET12567 pTKA	Штам, який використовувався для кон'югаційного перенесення ДНК, містить плазмиду pTKA, в яку клоновано ділянку <i>tra-korA</i> , ампліфіковану з pCMA (Am ^R)
<i>E. coli</i> GB2005 pTKA	Штам для трансформації, містить плазмиду pTKA, в яку клоновано ділянку <i>tra-korA</i> , ампліфіковану з pCMA (Am ^R)
<i>S. albidoflavus</i> APEX 11	Похідний APEX1 (LacZ ⁺ Trp ⁻ His ⁻). Несе плазмиду pS12_L90KC (Am ^R) інтегровану в сайт VWB та реплікативну <i>traB</i> ⁺ плазмиду pJR301 (Km ^R Th ^R)
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL18488	Продуцент такролімусу дикого типу
<i>S.tsukubaensis</i> NRRL18488 pCMA ⁺	Похідний NRRL18488. Містить pCMA
<i>S.tsukubaensis</i> NRRL18488 pTKA ⁺	Похідний NRRL18488. Містить pTKA (Am ^R)
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i> NRRL B-16726	Продуцент тейкопланіну дикого типу
<i>A. teichomyceticus</i> pCMA ⁺	Похідний NRRL B-16726. Містить плазмиду pCMA (Am ^R)
<i>S. roseochromogenes</i> NRRL 3504	Продуцент хлоробіоцину дикого типу
<i>S. roseochromogenes</i> NRRL 3504 pCMA ⁺	Похідний NRRL 3504. Містить плазмиду pCMA (Am ^R)
<i>S. cyanogenus</i> J39	Штам-похідний дикого типу (S136) із заміщенням гена <i>lanJ</i> на ген стійкості до

	гігроміцину <i>hug</i>
<i>S. cyanogenus</i> J39 pCMA ⁺	Похідний J39, містить плазмиду pCMA
<i>S. viridosporus</i> dO5	Похідний дикого типу (ATCC14672), із заміщенням гена <i>toeO5</i> на ген стійкості до гігроміцину <i>hug</i>

Рекомбінантні молекули ДНК, які ми використовували в роботі, наведено у таблиці 2.2

Таблиця 2.2

Плазмиди, використані у роботі

Плазміда	Характеристика
pCMA	Похідна pIJ101 <i>S.lividans</i> , містить ділянку <i>clt-traB-korA</i> , яка відповідає за кон'югативне перенесення між штамми (Am ^R)
pTKA	плазміда, сконструйована на основі вектора pSET, містить ділянку <i>traB-korA</i> з pCMA (Am ^R)
pSET152	Вектор експресії, Am ^R
pTES	Вектор експресії, Am ^R ; похідна pSET152; містить attP, фланкований сайтами <i>loxP</i> , та промотор <i>ermEp</i> .
pTESKA	Сконструйована на основі вектора pTES, містить ген <i>traB S.viridosporus</i> dO5 (Am ^R)
pJR301	реплікативна плазміда на репліконі pGM190, містить <i>traB</i> pSVH1 під тіострептон-індуцибельним промотором. Th ^R Km ^R
pJET	вектор, призначений для вставки ПЛР-продуктів та експресії рекомбінантних білків у <i>E.coli</i> (Amp ^r)
pJETKAtra	Похідна pJET, в яку клоновано ділянку <i>tra-korA</i> , ампліфіковану з pCMA
pJT	Похідна pJET, в яку клоновано ділянку <i>traB</i> , ампліфіковану з pSG-2
pGCumRP21	Вектор експресії на основі pSET152 (<i>int-attP</i> φC31); cumR-P21, Am ^r Ap ^r Sp ^r

Середовища використанні в роботі:

Вівсяне середовище (OM): вівсяне толокно – 20 г; агар – 18г; H₂O – до 1 л; рН 7.2. Після стерилізації додавали MgCl₂ до кінцевої концентрації 1 мМ.

Соево-манітолове середовище (SFM): соєве борошно – 20 г; манітол – 20 г; агар – 18 г; H₂O – 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; , dH₂O – до 1 л.

Мінімальне середовище (MM): (L-аспарагін – 0,5 г, K₂HPO₄ – 0,5 г, MgSO₄*7H₂O – 0,2 г, FeSO₄*7H₂O - 0,01 г, глюкоза – 10 г, агар – 10 г, dH₂O – 1 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: CoCl₂ – 1 мг.

Середовище LA: триптон – 10 г; дріжджовий екстракт – 5 г; NaCl – 5 г; агар – 12 г; вода дистильована – 1 л.

Середовище LB: триптон – 10 г; дріжджовий екстракт – 5 г; NaCl – 5 г; вода дистильована – 1 л.

Середовище GYM: глюкоза – 4 г; дріжджовий екстракт – 4 г; мальтозний екстракт – 10 г; CaCO₃ – 2 г; агар – 12 г; вода дистильована – 1 л.

Рідке середовище R5 (сахароза – 103 г, K₂SO₄ – 0,25 г, MgCl₂*6H₂O – 10,12 г, глюкоза – 10 г, Difco casaminoacids – 0,1 г, Trace element solution – 2 мл, дріжджовий екстракт – 5 г, TES buffer – 5,73 г, дистильована вода – 1 л, K₂HPO₄(0,5%) – 1 мл, CaCl₂*2H₂O(5M) – 0,4 мл, L-пролін - 1,5 мл, NaOH (1 н) – 0,7 мл)

Реактиви. У ході приготування поживних середовищ використовували наступні реактиви: L-аспарагін, триптон, дріжджовий екстракт, агар, D-мальтозу ,манітол, D-глюкозу, соєве борошно та вівсяне толокно.

Для селекції штамів кишкової палички та стрептоміцетів використовували наступні антибіотики: апраміцин, фосфоміцин, гігроміцин, тіострептон, рифампіцин, хлорамфенікол, .

Тіострептон використовували для індукції промоторів.

Реакції ферментативної обробки ДНК (обробка рестриктазами, лігування, полімеразна ланцюгова реакція) виконували, використовуючи ферменти та буфери згідно умов, вказаних фірмою-виробником.

Для гель-електрофорезу: бромистий етидій, ТАЕ-буфер, 1% агарозний гель.

Для полімеразної ланцюгової реакції: ДНК-полімераза Phusion, Q5, Platinum TAQ Hot-Start, диметил сульфоксид (DMSO), дезоксинуклеотидфосфати (dNTPs), праймери, буфери та енхансери для відповідної полімерази.

Для виділення плазмідної ДНК *E.coli* та сумарної з актиноміцетів: буфер №1 (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ ЕДТА, рН = 8), буфер №2 (0,2 М NaOH, 1% SDS), буфер №3 (3М CH₃COOH, рН = 6), етанол, ізопропанол, ProK, лізоцим, хлороформ, 5М NaCl.

2.2. Методи

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

Вирощували нічну культуру штаму-донора *E.coli* та штаму-акцептора (*Streptomyces*), який вирощували протягом 5 діб на вівсяному середовищі чи на SFM.

У мікропробірки додавали 400 мкл фіз.розчину або рідкого середовища TSB, збирали спори штаму- акцептора з ¼ чашки. Деякі штами для того, щоб індукувати проростання спор шокували на водяній бані при 50°C протягом 10 хв.

Згодом вносили культуру донорного штаму з ½ чашки. Суміш ресуспендували та висівали на чашку з SFM до якого додавали MgCl₂.

Інкубували 5 годин та заливали розчином фосфоміцину (для контрселекції донорного штаму) і антибіотиком (-ами), стійкість до яких визначається маркерними генами плазмід. Вирощували 5-7 діб, отримували аксенічні культури транскон'югантів та аналізували за ознаками антибіотикорезистентності чи іншими маркерами.

2.2.2. Кон'югація між штамми *Streptomyces albidoflavus*.

В дві мікропробірки вносили по 300 мкл рідкого середовища TSB, додавали спори попередньо вирощених культур штаму-донора (pCMA⁺) й реципієнта. Відбирали по 200 мкл у нову мікропробірку і змішували. Половину суміші висівали на середовище SFM, половину – на OM. Чашки інкубували упродовж 5-9 діб, до утворення щільного газону. Транскон'юганти виявляли за допомогою реплік газону на селективні середовища, як описано у Результатах.

Розведення для визначення титру спор висівали на чашки з вівсяним середовищем чи SFM, в які попередньо додавали MgCl₂. Підраховували кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) суспензіях за формулою:

$$\frac{n \times 10}{|10^m|}$$

де n – кількість колоній на чашці, 10^m – кратність розведення, висіяного на чашку.

2.2.3. Визначення титру спорових суспензій

Визначали титр спор: до 900мкл дистильованої води додавали 100мкл досліджуваної спорової суспензії, ресуспендували. Потім 100 мкл отриманої суспензії переносимо у наступну мікропробірку з 900 мкл дистильованої води і так до 10⁻⁶ розведення.

2.2.4. Виготовлення компетентних клітин *E.coli*

Культуру *E.coli* через ніч інкубували в 3 мл рідкого середовища LB при 37°C. Наступного дня нічну культуру всіаємо в свіже середовище і інкубуємо протягом 2 годин. На льоді розподіляли по 2 мл в різні пробірки і центрифугують 1 хвилину при 13 тис. об./хв, зливали супернатант і до біомаси додаємо 1 мл охолодженого 0.1М MgCl₂, центрифугували, зливали супернатант, тричі додавали CaCl, центрифугували, додавали по 100 мкл охолодженого 0.1М CaCl₂+10% гліцеролу в різні мікропробірки. Зберігали при -80°C.

2.2.5. Виділення плазмідної ДНК з *E. coli*

Плазмідну ДНК виділяли методом лужного виділення. У 4 мл рідкого середовища TSB чи LB додавали колонію досліджуваної культури. Клітини осадили (двічі центрифугували), додавали 100 µl буферу I, ресуспендували і залишили на 5 хв, додавали 200 µl буферу II, додавали 150 µl буферу III залишили на 10 хв на льоді. Розчин центрифугували протягом 10 хв. Попередньо в мікропробірки додавали 700 мкл ізопропілового спирту та внесли супернатант, центрифугували 10 хв. В результаті утворився білий осад до якого додали 700 µl 70% етанолу, центрифугували 5 хв. Злили супернатант, відбирали останню краплю та висушили при 37°C до зникнення запаху спирту. Після цього в мікропробірку додавали 30 мкл дистильованої води.

2.2.6. Трансформація клітин *E. coli*

До попередньо приготованих компетентних клітин *E. coli* GB2005 чи *E.coli* ET12567 на льоді додавали 3-5 µl лігазної суміші та ресуспендували. Переносили на 1 хвилину на 42°C і на 1 хвилину на лід. Додавали 1 мл середовища LB та інкубували на шейхері при 37°C 1,5 год. Відцентрифугували суспензію, осад ресуспендували та висіяли на чашки з

агаризованим середовищем LA або TSA з відповідними селективним антибіотиками.

2.2.7. Електрофорез зразків в агарозному гелі та елювання фрагментів ДНК

Електрофорез ДНК проводили у горизонтальному 0,7-1,0 % агарозному гелі (100 мл трис-ацетатного буферу, 1г агарози, 20 μ л бромистого етидію). Використовуючи маркер GeneRuler 1 kb визначали молекулярну масу фрагментів ДНК.

Для елювання фрагмент гелю з досліджуваною ДНК внесли у мікропробірку, зважили та внесли буфер для елюції (Binding buffer) у співвідношенні 3:1. Залишили на водяній бані при 50°C до повного розчинення гелю. Розчин переносили на колонку, залишили на 5 хв, центрифугували протягом двох хвилин. Злили супернатант та додали 500 μ л Wash Buffer. Центрифугували протягом 2 хв, злили супернатант та центрифугували порожню колонку теж 2 хв. Колонку перенесли у нову мікропробірку, на центр мембрани додали 50 μ л бідистильованої води, залишили на 5 хвилин та центрифугували протягом 2 хв.

2.2.8. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням стандартного протоколу та наступних компонентів реакційної суміші: 1 мкл матричної ДНК, по 30 пмоль кожного з пари праймерів, 1 мкл ДНК-полімерази, 10 мкл 10-кратного полімеразного буферу, 0,2 нМоль кожного з чотирьох дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTPs) та 10% диметилсульфоксиду (DMSO). Загальний об'єм реакційної суміші становив 50 мкл.

2.2.9 Лігування фрагментів

Фрагменти ДНК після обробки ендонуклеазами рестрикції використовували для лігування у векторну ДНК з використанням ДНК-лігази T4 та відповідного лігазного буферу. Реакційна суміш лігування містила: 2 μ л векторної ДНК, 1 μ л буферу для T4 лігази, 0,5 μ л ферменту T4 ДНК-лігази та 6,5 μ л фрагменту ДНК для вставки у вектор. Реакційну суміш інкубували при 22°C протягом 30 хвилин, після чого використовували для трансформації компетентних клітин *E.coli*.

2.2.10. Обробка ДНК ендонуклеазами рестрикції та картування плазмід

Обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції та картування плазмід проводили згідно з рекомендаціями компанії-виробника.

2.2.11. Виділення сумарної ДНК з клітин стрептоміцетів.

У фальконах об'ємом 15 мл міцелій ресуспендували у 100 мкл розчину лізоциму у TE буфері для лізису. Інкубували суміш при 37°C протягом 60 хв поки лізат не стане прозорим.

Додавали 200 мкл протеїнази (ProK) та 800 мкл SDS. Інкубували суміш при 56 °C протягом 1-2 годин. Після інкубування додавали 2,6 мл 5M NaCl, перемішували, додавали 6 мл хлороформу, знову перемішували протягом 30 хв. Центрифугували при 6000 обертів 10 хв. В новий фалькон відібрали водну фазу та додавали ізопропанол об'ємом 1:1 до перенесеної водної фази. При виділенні ДНК, на запаяну піпетку Пастера намотували ДНК та промивали 70% етанолом, зразок висушували та розчиняли у 500 мкл H₂O.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Біоінформатичний аналіз вибраних білків TraB

Білки TraB стрептоміцетів є різноманітними, проте множинне вирівнювання гомологів TraB, виділених з різних плазмід, демонструє лише обмежену подібність послідовностей – менше 20% ідентичності [32]. Відомо, що ці білки структурно та функціонально пов'язані з септальними транслокаторами ДНК родини FtsK/SpoIIIЕ. Вони збираються у структури гексамерних каналів та утворюють пори в ліпідних мембранах.

Необхідні амінокислотні та нуклеотидні послідовності ми завантажували з NCBI. Далі ми побудували філогенетичне дерево 10 білків TraB, виявлених у різних плазмідах (рис. 3.1).

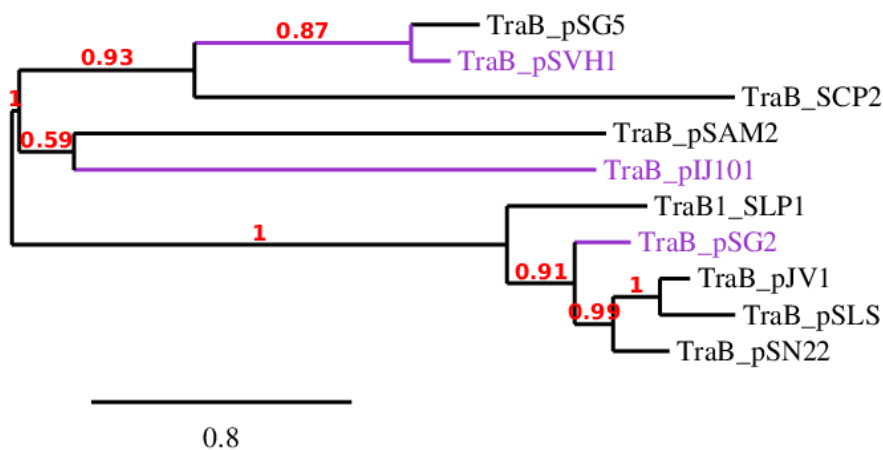


Рис. 3.1 ML-дерево білків TraB. Фіолетовим кольором виділені білки, третинну структуру яких далі моделювали. Червоні цифри на нодах – індекси надійності дерева aLRT

Бачимо, що різні TraB знаходяться на різних кладах, а отже мають доволі відмінну еволюцію, і структуру. Тому ми глибше проаналізували первинну та третинну структуру трьох віддалених TraB – з плазмід pSVH *S. venezuelae*, pIJ101 *S. lividans* та pSG2 *S. viridosporus* (див. рис. 3.1). Множинне вирівнювання виконували за допомогою алгоритму MUSCLE (рис. 3.2).

```

TraB_pSG2          -----LPDRI-----
TraB_pSVH1         MTEHLTEKNPAPADFDSDIATVTFILRPTLPAPASVPEDNWTSDMPDDTDPVAVIIPMPPTVA
TraB_pIJ101       -----MAPTL-----
                  :
                  :

TraB_pSG2          -----
TraB_pSVH1         PAIGSDERTVVLETARVILDKTPAVEPVVRPGRFAGTVLDLDDFDAPLI PAWMYSAEGWA
TraB_pIJ101       -----APFAARWDAEAD-----

TraB_pSG2          -----RPGAPRTTTRHDHPKG-ADMARSKHSNSTGGSPAEEQRHEEQLTGT
TraB_pSVH1         AWAGVFYRARRRDFRRWVRRQPTQGHVRFGRGTRRAHEWVVGFEGRVQVSAAHTAHLV
TraB_pIJ101       -----RRMALRTP---EHLKALMDAQK-----GYNSAR-----STAAT
                  * . * . * . * . * . * .

TraB_pSG2          ARGDGLTGYVLHRAKPYLPPWLGAAALGVALPAHWQWGDSSAAAGVGLTLASVALTGATW
TraB_pSVH1         TREARLAA---RHARFTPRILGS---KKELAMKAADKATKAAEEAVLLHKKAKKDRN-
TraB_pIJ101       AKSQRATA---RAASKNP--LST---VRRRAARTADKAARTHROAKTKLKAARKDYP
                  :. :. * * * : . . . * ..

TraB_pSG2          WAGRSTTEQRRRLHSAVTVAAGS-AWLTAALAGPTTGPLPDLY-----LMGAP--ALAL
TraB_pSVH1         --RVRNLRAGVYGPPLTAIGT-GYVMGGGL-GLAAGLLSTFAGGA---FVGRKPYDEEA
TraB_pIJ101       TLRARAVQAHAMHAVPGAGISALGWDQAGAW--PVAGSLALIAANVAALVIGRRKVAVAV
                  :. :. . : : . . . : * * . : . : *

TraB_pSG2          SW----NIRQVMRRTPDATGADSPDKGLEKVLARTKVRDVRVPEPNRVTPVYEL----
TraB_pSVH1         DWTSDWRS LGDGRMTAPMLDAS FRAAKVIGAEETLGVVQMPMLDTRGAWTAVLDDL----
TraB_pIJ101       AD----ELSAEERRLVERLDPSYWAQHA-DEGLVGTVTTPVQVTPAGLVTTRVRLDGRW
                  :. : * . . . . . : : : . . *

TraB_pSG2          -PAGELTHDDATKAIPRIASALDVPTTAIRHQDPDPSARKGSFVIVPEDMLRTPVWPGP
TraB_pSVH1         -PPGVPAK-KAIRATDELAAAFVVEEAQVSVAKRGRAGRIELY--VARELPFTDKAAGPG
TraB_pIJ101       KPSAFKAKHEEIRALLGARTDLRME---IKAGSHGDRAVI-----TLRTRSAADGI
                  *.. :. . * : : : : . . . * .. *

TraB_pSG2          AAPGESVAVPL-RIGVYDD--GSDLELPLLDIAIHLVIMGMTSGSKTEGALDVLLELLTRR
TraB_pSVH1         LLALESAADEFWGRISIGPDVIRGIHQSI SVVER-SGLIGGEPGAGKSASGNTILLAAALDP
TraB_pIJ101       DLTGWTGPAPW---GV-DTVTGEPVQVFLGRR--MLIAGTSGSGKSWSTRALLAEGSEYA
                  . : . . : * . : : * * * . * : *

TraB_pSG2          DVVWVLSDAAKAGQDFQFLLPVVDWP----ALDMQSTGAMVAAVQAAIPARTGWLDRHS
TraB_pSVH1         RVILWLADGKGGGD---LEPFEHLCEERYEGDADPEAFNAMLDELDDVMKARYALLKKLK
TraB_pIJ101       DHRLVVVDPKR-----VEAINWQHRARATAISIEDVLDVTDDELVEEMHERLELIPR--
                  : : * : : : : : : * :

TraB_pSG2          YRAWEPAAAGRQTPAHS SCASSGACGCEGMPYLVVWMEEAAIL-----REIG
TraB_pSVH1         KRKVTEELANKYPE-----LRQLLWVDE----LMLYTT----AEEFG
TraB_pIJ101       ----GQDVIQISPE-----RPRITVFIDEGAEVIAMAKKTRAKGSKKEEPP
                  . : : : * : : : * * *

TraB_pSG2          E-----DTFTGIAQEAARSAGISLVLSMQRASGYQ---LSTDTRASLPAALCFVGRGDD
TraB_pSVH1         K---KITRKLRLNLSRGRAAGIITFCATQKPGSDV---VDTSLRDLISIRWALRCTTPE
TraB_pIJ101       DDPWSRIMENLSTLARMARAAEII LIWATQKPTMDAKGGIDPQISAQITYRAALALSTSG
                  . : . . * : * * . : *.. : . . . : . :

TraB_pSG2          AGFALPEDVLDAGADPAAWGNK----RKYVYLVLSAGVDELDLYPTPARTFWTGPGGQYE
TraB_pSVH1         A---SDTILGKGAASGYSAKTIQSEMRGAGLLWAEGTN---PTMVRADYDDQVTA
TraB_pIJ101       E---SRVVFGE DATEKGWHAHELP--MPGVAMLRSGPKVQ---PHPINTRAFSPADVIA
                  . : . . * : : : * * * : * : . :

TraB_pSG2          AMARYVVEHFAAVRADIDPVTGGAARVAGDLYTNRRGMVSSSPAEEAGEAAVEMSEQEE
TraB_pSVH1         LIERATE-----WRRKAGTLPNGVPLVDQLRARGDDDAL
TraB_pIJ101       LPDRPV-----WRRQES-----PARSAGASAPA
                  * . : . . . .

TraB_pSG2          SRRTVAALVDAEDADADVSDLPHVESVSDLPAAKPSTEEARELLAELVETLAA TGGGIV
TraB_pSVH1         LLAAVLEVFAAQATEDDPVDWLPGLLVDLKAAGHSV-----TAEKLGALVVRTDEEK
TraB_pIJ101       PLRLVKETA PAAEVPAQPTKAPTNRKVAAGI GTGATT-----VADVATVTGINKGSVS
                  * . * . : . * . : : . * : .

TraB_pSG2          GPADLSPYLEQLGRSRPWSAELKRLAEGRLAPTAEEGRYRVLVFPV-VAA
TraB_pSVH1         A-----KRPW---GEKKTRVTGYPLARVEAAAT--DRFG-LTA
TraB_pIJ101       K-----AVKQLLDAGEVLRSEDSLSLVVTVQVGEVSA
                  * . * . : . . . : : *

```

Рис. 3.2 Множинне вирівнювання білків TraB з плазмід pSG2, pSVH, pIJ101. Кольором виділені ділянки С-кінцевого домену спіраль-поворот-спіраль (wНТН). Зокрема, червоними літерами позначено спіралі $\alpha 1$ і $\alpha 2$, зеленими – спіраль $\alpha 3$. Вирівнювання показує відмінності в спіралі $\alpha 3$, яка відіграє вирішальну роль у специфічному зв'язуванні ДНК.

Загальна довжина вирівняних фрагментів становить приблизно 300 амінокислотних залишків. Послідовності демонструють помірну ідентичність, про що свідчить наявність консервативних ділянок та спільних амінокислотних залишків. N-кінцеві та C-кінцеві ділянки демонструють нижчий рівень консервативності. Найбільший відсоток подібності спостерігається в центральній частині вирівнювання і, ймовірно, саме ця частина відповідає функціонально важливим доменам білків. Послідовність TraB_pSVH має додатковий фрагмент неподалік N-кінця, відсутній в інших. Також наявні унікальні вставки та відсутні фрагменти в різних ділянках для кожної з послідовностей. Отже, ці білки TraB мають спільні консервативні ділянки, що може вказувати на подібність функцій. Проте наявність специфічних вставок та варіабельних фрагментів дозволяє припустити і наявність певних відмінностей між цими білками.

Для створення та візуалізації третинних структур білків TraB ми використовували сервіс Latch.bio (<https://latch.bio/>), що відкриває доступ до ab initio реконструкції просторових моделей білків за допомогою алгоритму AlphaFold. Це хмарний сервіс для зберігання, обміну та інтеграції біоінформатичних даних та RCSB PDB 3D Viewer - це інструмент для перегляду та аналізу тривимірних структур білків, нуклеїнових кислот та інших макромолекул, депонованих в Protein Data Bank (PDB). Передбачені третинні структури білків не накладаються одна на одну, що підтверджує значну еволюційну відстань між ними (рис. 3.3).

У третинних структурах білків ми виділяли домен спіраль-поворот-спіраль (wHTH), який бере участь у специфічному для послідовності зв'язуванні ДНК. Базуючись на множинному вирівнюванні та порівнянні структур TraB, можна стверджувати, що філогенетично відмінні TraB демонструють також відмінність просторової організації. Отже, є сенс тестувати різні TraB як інструмент перенесення хромосомних фрагментів, що дасть змогу вибрати найбільш ефективні в цьому сенсі білки чи плазміди.

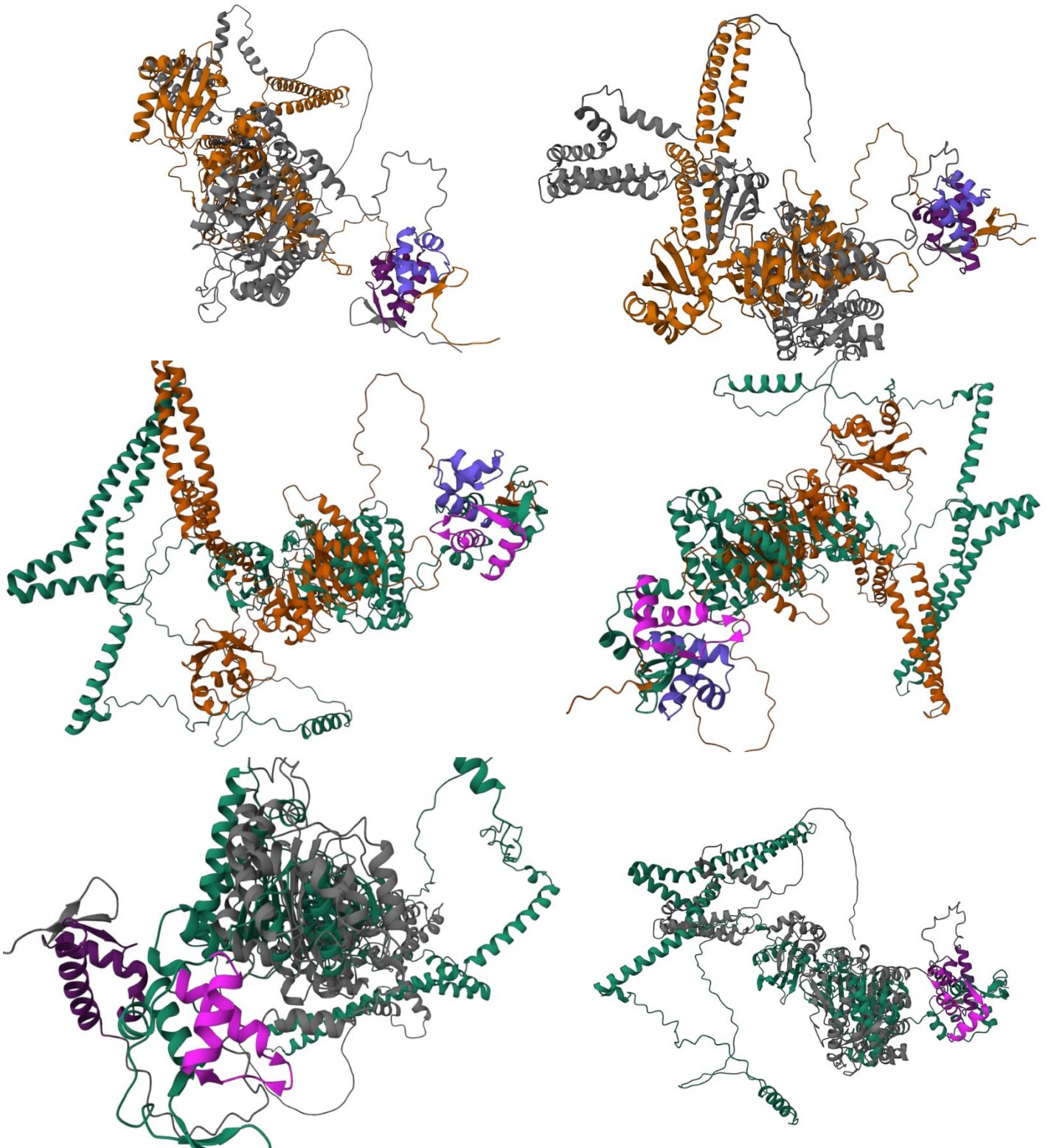


Рис. 3.3 Моделі третинних структур білків TraV та їхні попарні суперпозиції. Сірим кольором виділено – TraV_pSG2 (wHTH – темно фіолетовим), зеленим – pIJ101 pSG2 (wHTH – рожевим), помаранчевим – pSVH pSG2 (wHTH – синім).

3.2. Конструювання та картування плазмід

Для того щоб порівняти ефективність кон'югативного перенесення за відсутності цис-локусу *clt*, нами сконструйовано плазмиду рТКА, яка містить ділянку *tra-korA*. Плазміда була побудована на основі вектора рSET152. Ділянка *trakorA*, містить гени *traB*, який відіграє ключову роль в кон'югативному перенесенні генів в бактерій роду *Streptomyces* та *korA*, який кодує однойменний білок та виконує регуляторну функцію в кон'югативному перенесенні. Ділянку *trakorA* ми ампліфікували з плазмиди рСМА. Для ампліфікації ми, використовуючи праймери: *korA101* (AAAGGATCCAATGGCGAGTGATCAGTC) та *tra101* (AAAGGATCCGTATGTTGTGTGGAA TTGTG) ампліфікували ділянку *trakorA* розміром близько 2,9 т. п.н. Спочатку клонували у вектор рJET (рис. 3.4).

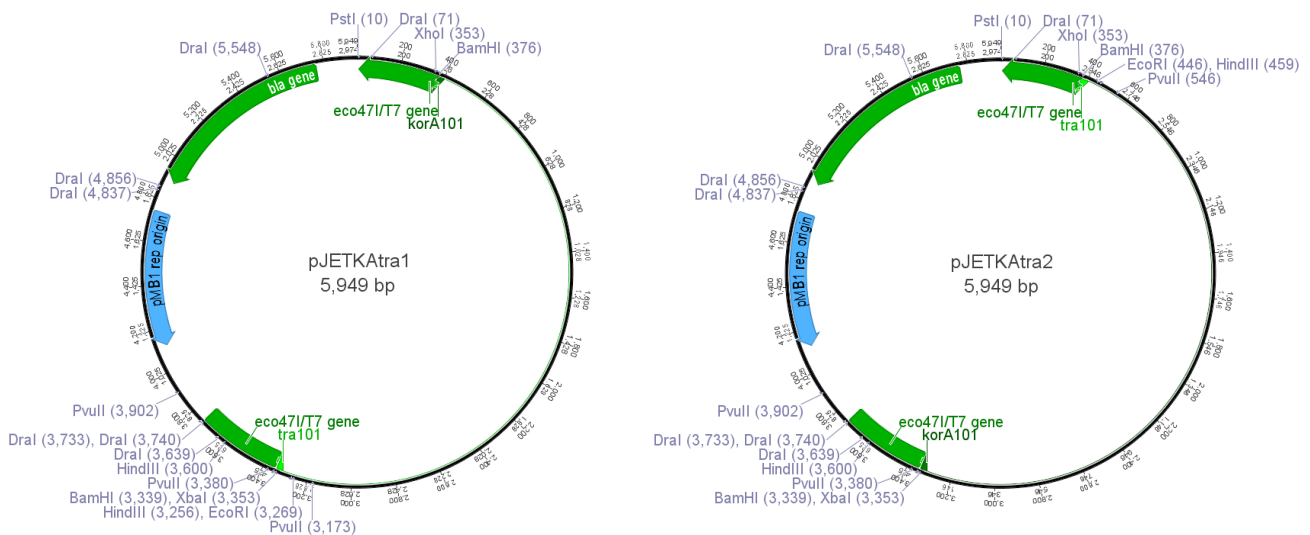


Рис. 3.4 Карти плазмід рJETKAtra1/ рJETKAtra2. Ген бета-лактамази (*bla*) - забезпечує стійкість клітин до ампіциліну.

Виділяли плазмідну ДНК та обробили ендонуклеазою рестрикції BamHI, отримали два фрагменти розміром близько 2900 п.н. та 3050 п.н, що відповідає очікуваним результатам (рис. 3.5).

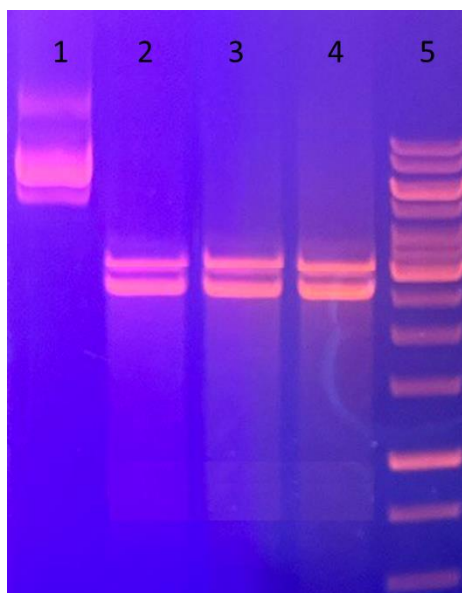


Рис 3.5 Электрофореграма плазмідної ДНК після обробкою рестриктазою. 1- виділена плазмідна ДНК; 2-4- оброблена ендонуклеазою рестрикції BamHI; 5- молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™).

Елюйований фрагмент лігували у попередньо оброблений тими ж ендонуклеазами рестрикції вектор pSET152. Отриману лігазну суміш трансформували в клітини *E.coli* GB2005, висівали на чашки з агаризованим середовищем LA з додаванням ампраміцину. Виділену плазмідну ДНК обробили ендонуклеазою рестрикції для підтвердження наявності відповідної плазмідної ДНК у клонів.

Після підтвердження наявності вставки, виділений вектор використали для трансформації в клітини *E. coli* ET12567. З трансформантів виділили плазмідну ДНК, яку обробили ферментом BamHI для підтвердження наявності вставки.

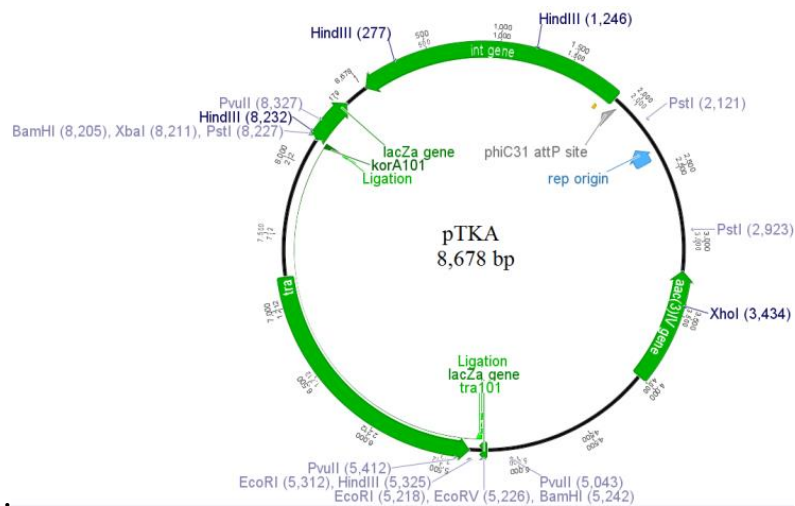


Рис. 3.6 Карта плазмиди рТКА. Умовні позначення: *aac(3)IV* – ген стійкості до апраміцину; *attP* - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; *int* (φC31) – інтеграза фага φC31; *lacZα* – α фрагмент гена β-галактозидази; *tra* – ділянка, яка містить фрагмент *tra-korA* (див текст вище).

Отриману плазмиду на основі вектора pSET152 зі вставкою *tra-korA* назвали рТКА (рис. 3.7). Отриманий штам заархівували та використовували в наступних дослідженнях.

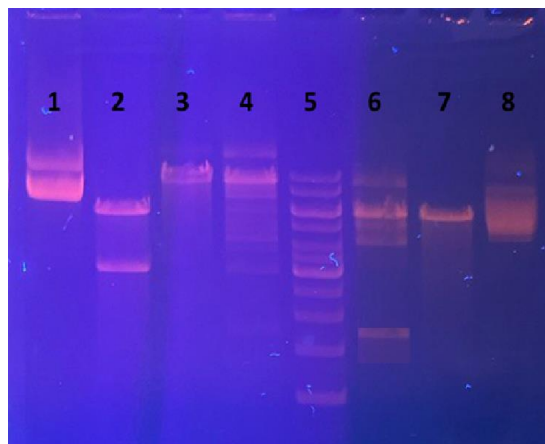


Рис 3.7. Електрофореграма плазмідної ДНК після обробки рестриктазами. 1- виділена плазмідна ДНК рТКА; 2 – рТКА оброблена BamHI; 3 – рТКА оброблена EcoRI; 4 – рТКА оброблена HindIII; 5-молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™); 6 – pSET152/HindIII; 7- pSET/BamHI; 8 – pSET152 нативна

Іншим завданням було сконструювати плазмиду, яка буде містити лише ген *traB* без регуляторних ділянок. Для того, щоб ампліфікувати ген *traB* з *S.viridosporus* dO5 ми виділили сумарну ДНК штаму. Сумарну ДНК виділяли за методом описаним в розділі 2.2.13. Для ампліфікації ми використовували праймери: sv00012_XbaI_up1 (*traB*_up): AAATCTAGAGCACCCCTTCCGGTACTGAC та sv00012_EcoRIrp (*traB*_rp): AAAGAATTCGTCTGACGTGTCAGGGGGTG. Отриманий ПЛР-продукт мав довжину близько 2,2 т.п.н.

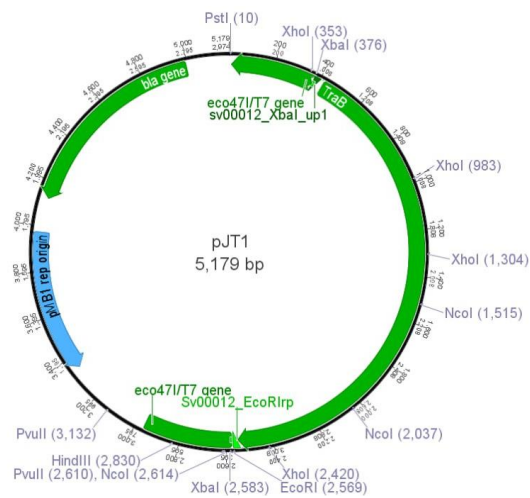


Рис. 3.8. Карта плазмиди рJT1.

Оскільки для ампліфікації цільової ділянки ДНК було використано ДНК-полімеразу *Phusion*, отримані ПЛР-продукти мали «тупі» кінці. ПЛР-продукт лігували з лінійною векторною плазмідною рJET blunt за наступним протоколом: 5 мкл 2X реакційного буферу, 3.5 мкл вставки, 0.5 мкл DNA blunting enzyme, 0.5 мкл лінійного вектора рJET та 0.5 мкл ДНК-лігази T4. Після перемішування та інкубації протягом 15 хв лігазну суміш трансформували в клітини *E.coli* GB2005 та висіяли на чашки з агаризованим середовищем LA з додаванням ампіциліну для селекції клонів. Плазмиди з потенційною вставкою виділяли та обробляли рестриктазами EcoRI і XbaI для аналізу.

Очікуванні фрагменти при обробці рестриктазами: EcoRI – 5179 п.н. , XbaI та при EcoRI/XbaI - близько 2200 п.н. та 3000 п.н (рис. 3.9).

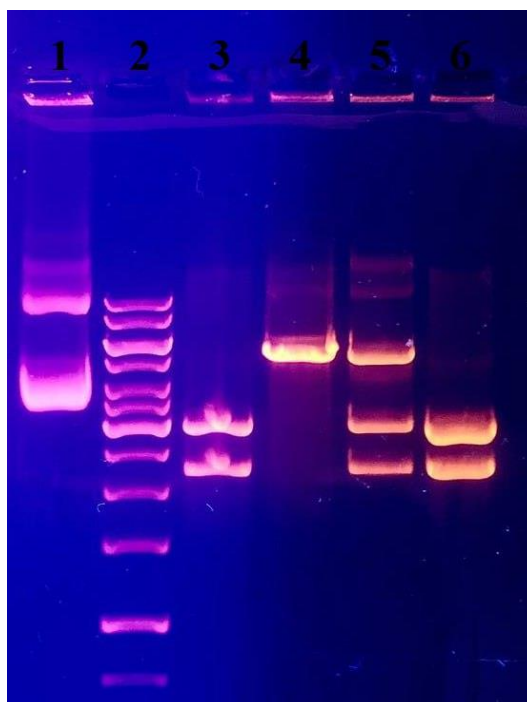


Рис. 3.9 Електрофореграма плазмідної ДНК після обробки рестриктазами 1- нативна ДНК (виділена ДНК з трансформантів рJET-TraB); 2- молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™); 3, 6 - плазмідна ДНК оброблена рестриктазами EcoRI та XbaI; 4 - плазмідна ДНК оброблена рестриктазою EcoRI; 5 - плазмідна ДНК оброблена рестриктазою по XbaI.

Після того, як підтвердили наявність вставки, її елюювали та клонували у вектор рTES оброблений тими ж рестриктазами та трансформували лігазною суміш клітини *E. coli* DH5 α . Селекцію проводили на LA з апраміцином. З отриманих трансформантів виділили плазмідну ДНК, підтвердили наявність вставки обробивши ендонуклеазами рестрикції EcoRI/XbaI. Отримали фрагменти розміром близько 2200 та 6000 п.н, що відповідає очікуваним фрагментам (рис. 3.10, 3.11).

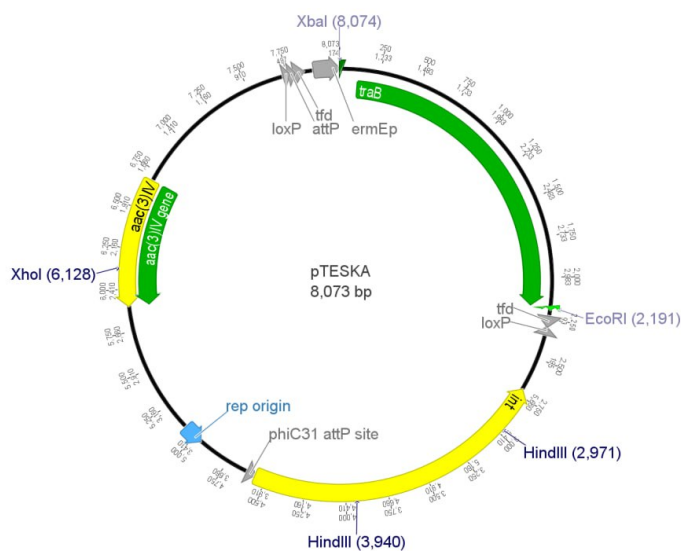


Рис. 3.10. Карта плазмиди pTESKA. Позначення: ori – ділянка ініціації кон'югативного перенесення; *aac(3)IV* - ген стійкості до апраміцину; *attP* - сайт інтеграції плазмиди у хромосому бактерії; *int(φC31)* - інтеграза фага φC31; *ermEp* - промотор; *ColE1ori* - ділянка ініціації реплікації в *E.coli*; *loxP* – сайт-розпізнавання рекомбінази Cre; XbaI та EcoRI– сайти вставки гена *traB*.

Сконструйовану плазмиду будемо трансформувати в клітини *E.coli* ET12567, яка містить кон'югативну плазмиду, клонувати плазмиду в штами стрептоміцетів для подальшого аналізу частоти кон'югативного перенесення між актиноміцетами, що дозволить визначити оптимальні умови для здійснення горизонтального переносу великих фрагментів ДНК між представниками досліджуваних штамів бактерій.

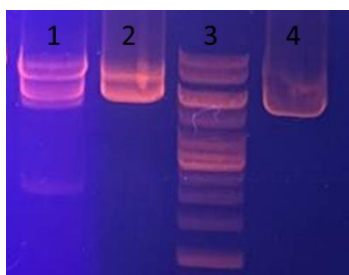


Рис. 3.11 Електрофореграма плазмідної ДНК після обробки рестриктазами/ 1, 2- плазмідна ДНК оброблена рестриктазами EcoRI та XbaI; 3- молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™); 4 - нативна ДНК (pJET-TraB). Реккомбінантним виявився клон на доріжці 1.

Для ампліфікації гена *traB* з рСМА (pIJ101) ми користували праймери: *tra101start* (AAATCTAGAGTCTCTACGAAGATCGCAAC) та *tra101* (AAAGGATCCGTATGTTGTGTGGAATTGTG). Отримали продукт довжиною близько 2,2 т.п.н. Елюювали та обробили ендонуклеазами рестрикції *EcoRI* та *XbaI*, вектор рGСумRP21 обробили тими ж рестриктазами. Загальна схема експерименту – на рис. 3.12. Робота наразі на етапі відбору рекомбінантних клонів, який триває незвично довго, імовірно через токсичність білка $\text{TraB}^{\text{pIJ101}}$.

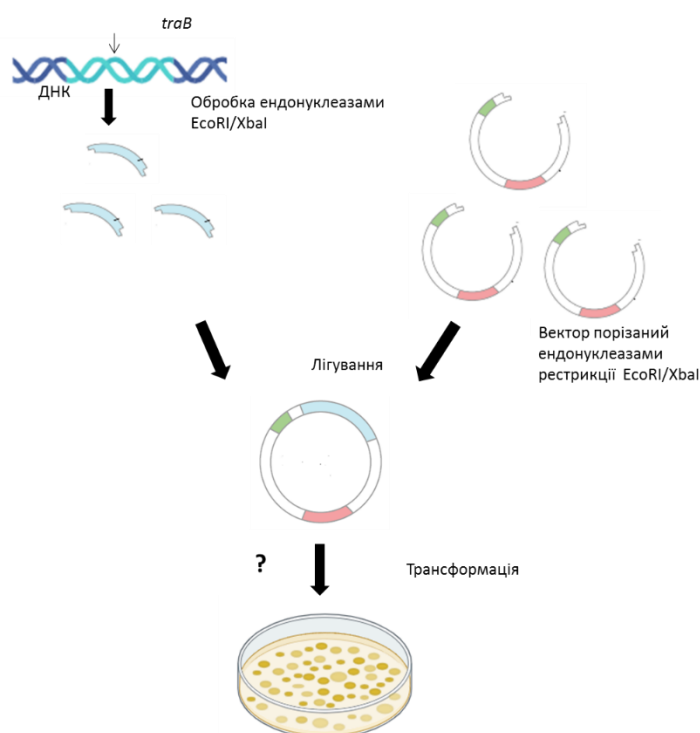


Рис. 3.12 Схема конструювання плазміди, що містить ділянку $\text{traB}^{\text{pIJ101}}$

3.3. Конструювання колекції донорних штамів актиноміцетів

Конструювання штамів ми виконували згідно методики міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces*, описаної в розділі 2.2.1. Зокрема, в мікропробірки додавали 400 μl рідкого середовища TSB, вносили спори з $\frac{1}{2}$ чашки нічної культури штама-донора - *E.coli* ET12567 рСМА, який слугував донором плазміди, та збирали спори реципієнтного штаму

Streptomyces/Actinoplanes культивованого протягом 5-7 діб на агаризованих середовищах. Суміш вортексували та висівали на чашки з агаром хованим середовищем OM + MgCl₂ чи SFM + MgCl₂. Інкубували протягом 5-8 годин для ініціації кон'югативного переносу плазмід. Заливали розчином фосфоміцину та апраміцину для контрелекції штаму-донора *E.coli* та селекції транскон'югантів *Streptomyces/Actinoplanes* відповідно. Вирощували 5-7 діб та аналізували транскон'югантів за ознаками антибіотикорезистентності чи за допомогою ПЛР для підтвердження отримання очікуваних штамів.

Конструювання штаму *S.albidoflavus* APEX1 pCMA⁺. Штам-реципієнт є ауксотрофом за триптофаном та гістидином, містить ген *lacZ*, що робить його зручним для контрелекції на мінімальному середовищі та фенотипового відбору транскон'югантів на середовищі з X-Gal. Сайт інтеграції pCMA у геном штаму APEX1 не відомий, оскільки канонічний сайт актинофага φC31 в цьому штамі окупований геном *lacZ*. Для селекції можемо використовувати мінімальне середовище + будь-який маркер стійкості, крім *aac(3)IV* (Am^R), або X-Gal⁺ + Am^R.

Конструювання штаму *S.albidoflavus* KO1404 pCMA⁺. Плазміда pCMA інтегрована в локус *attB^{φC31}*. Для селекції можемо використовувати Rif^R або Am^R + будь-який маркер стійкості збудованого в геном штаму-донора, крім Am^R.

Конструювання штаму *S.venezuelae* pCMA⁺. В цьому штамі міститься ген *cat*, що визначає стійкість до хлорамфеніколу. Цей ген кодує хлорамфенікол ацетилтрансферазу, що інактивує цю сполуку шляхом ацетилювання. Тому донорний штам можна використовувати для перенесення хромосомного маркера *cat*; для селекції позитивних транскон'югантів слід використовувати середовища з інгібувальними концентраціями хлорамфеніколу.

Конструювання штамів *S. cyanogenus* pCMA⁺, *S. roseochromogenes* pCMA⁺, *S. tsukubaensis* pCMA⁺, *A.teichomyceticus* pCMA⁺. Трансформантів

відбирали за селекцією до ампраміцину. Для перевірки перенесення плазмід ми виділили сумарну ДНК зі штамів *S.tsukubaensis* і *A.teichomyceticus* та ампліфікували ділянку *traB* (рис.3.13). В обидвох випадках нам вдалося отримати амплікон очікуваного розміру, приблизно 2,1 т.п.н. Це підтверджує отримання необхідних донорних штамів. При проведені кон'югативного перенесення селекцію можна проводити за стійкістю до апраміцину. Або гігроміцин стійких транскон'югантів у схрещуваннях, де донором виступає *S. cyanogenus* рСМА⁺ чи ристоміцин стійких при схрещуваннях з *A.teichomyceticus* рСМА⁺.

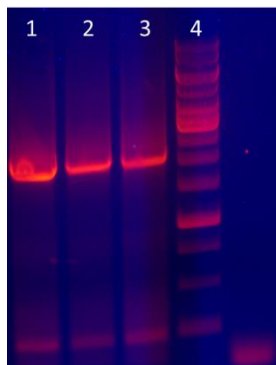


Рис. 3.13 Електрофореграма ампліфікованої ділянки *traB*. 1 – *traB* ампліфікований з рСМА (використовували як позитивний контроль), 2 – *traB* з *S.tsukubaensis* рСМА⁺; 3 – *traB* з *A.teichomyceticus* рСМА⁺; молекулярний маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™); 5 – як негативний контроль використали геномну ДНК *S. albidoflavus* КО-1403

Конструювання штаму *S. albidoflavus* АРЕХ11. Попередньо передано донорний штам на основі *S. albidoflavus*, АРЕХ1 рJR301⁺. Остання плазміда містить ген *traB*^{рSVH1} у складі реплікативної плазмід рGM190 (Th^rKm^r) під тіострептон-індуцибельним промотором *tipAp*. Штам АРЕХ1 – LacZ⁺ Trp⁻His⁻. У АРЕХ1 рJR301⁺ ми увели маркерний ген стійкості до апраміцину в складі плазмід рS12_L90Kс (система інтеграції VWB). Можливими варіантами відбору рекомбінантів при перенесенні в

S.albidoflavus є: мінімальне середовище + маркер стійкості, крім *aac(3)IV* (Am^R) та Km^R; X-Gal⁺+Am чи X-Gal⁺+Km.

Конструювання донорів на основі рТКА. Штамом-реципієнтом виступав *S.albidoflavus* КО-1404, похідний КО1307, стійкий до стрептоміцину, лінкоміцину, еритроміцину, рифампіцину. Рекомбінантів можна відбирати за стійкістю до ампраміцину або рифампіцину + маркерний ген стійкості примутній в штамі-реципієнті.

Отже, нами сконструйовано 9 донорних штамів, які містять рСМА. Для зручності розуміння усі використані у роботі донори підсумовано у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Донорні штами актиноміцетів

№	Штам	Селективні маркери
1	<i>S. albidoflavus</i> АРЕХ1 рСМА ⁺	<u>Контрселекція:</u> мінімальне середовище, будь-який маркер стійкості, що функціонує в <i>Streptomyces</i> , крім <i>aac(3)IV</i> (AmR). Те саме в інших штамів. <u>Селекція:</u> X-Gal ⁺ , (при перенесенні в <i>S. albidoflavus</i> J1074 і його похідні); AmR
2	<i>S.albidoflavus</i> КО1404 рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> RifR або AmR
3	<i>S.venezuelae</i> рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> CmR чи AmR
4	<i>S. cyanogenus</i> рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> рекомбінантів можемо відбирати на середовищі з додаванням Нуг або Am
5	<i>S. roseochromogenes</i> рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> рекомбінантів можемо відбирати за стійкістю до апраміцину та новобіоцину.
6	<i>S. tsukubaensis</i> рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> рекомбінантів можемо відбирати за стійкістю до апраміцину
7	<i>A.teichomyceticus</i> рСМА ⁺	<u>Селекція:</u> рекомбінантів можемо відбирати за стійкістю до апраміцину та /або ристоміцину
8	<i>S. albidoflavus</i> АРЕХ11	<u>Контрселекція:</u> мінімальне середовище, будь-який маркер стійкості, що функціонує в <i>Streptomyces</i> , крім <i>aac(3)IV</i> (AmR) та KmR

		<i>Селекція: X-Gal⁺, AmR чи KmR</i>
9	<i>S.albidoflavus</i> KO-1404 pTKA ⁺	<i>Селекція: середовище з додаванням Rif або Am та будь-якого маркеру стійкості, що присутній в штамі-реципієнті</i>

3.4. Тестування умов і плазмід для кон'югативного перенесення маркерів у межах виду *S.albidoflavus*

3.4.1. Внутрішньовидова кон'югація *S.albidoflavus* KO-1404 pCMA⁺ – Del14H.

Як штам-донор ми використовували штам *S.albidoflavus* KO-1404 pCMA⁺, похідним штаму KO-1305 та крім маркеру стійкості до апраміцину, що перенесений з плазмідую, виявляє стійкість до рифампіцину (як мінімум 50 мкг/мл) за рахунок точкової мутації в гені бета-субодиниці РНК-полімерази *rpoB*. (рис. 3.14). Штам Del14H, стійкий до гігроміцину. Це дозволяє нам відбирати трансконюгантні клони на середовищах з апраміцином і гігроміцином, або рифампіцином і гігроміцином.

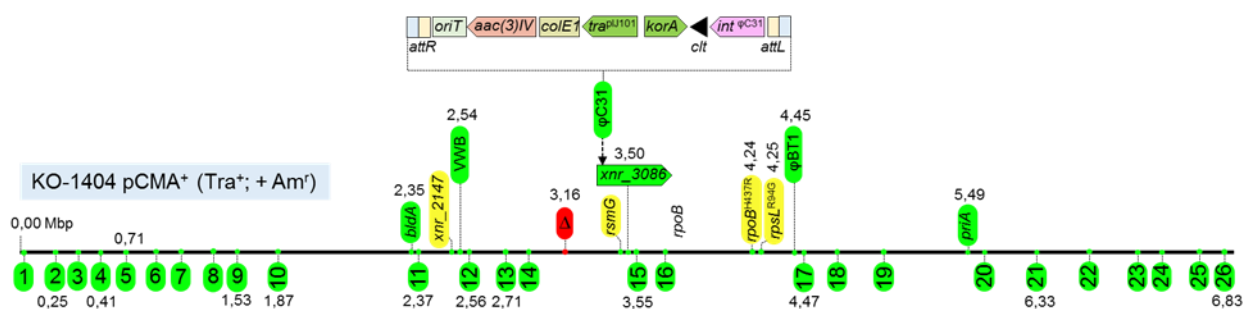


Рис . 3.14. Геном KO-1404 pCMA⁺. Зелені овали – генні кластери, для яких закодовані спеціалізовані метаболіти були або виявлені, або точно передбачені на основі ідентичності послідовностей. Над чорною лінією позначені популярні маркерні гени та сайти інтеграції актинофагів. Номери над і під овалами позначають розташування даного кластера в Mbp від лівого краю. Плазмиду pCMA було інтегровано в локус *attB^{φC31}*.

Штам-реципієнт Del14H – похідний *S.albidoflavus* J1074 у якому делетовано 14 спеціалізованих кластерів генів, що відповідають за біосинтез різних антибіотиків, містять ген стійкості до гігromіцину в складі плазмиди pS12_L90KH, що інтегрована в сайт актинофага фВТ1 (рис. 3.15).

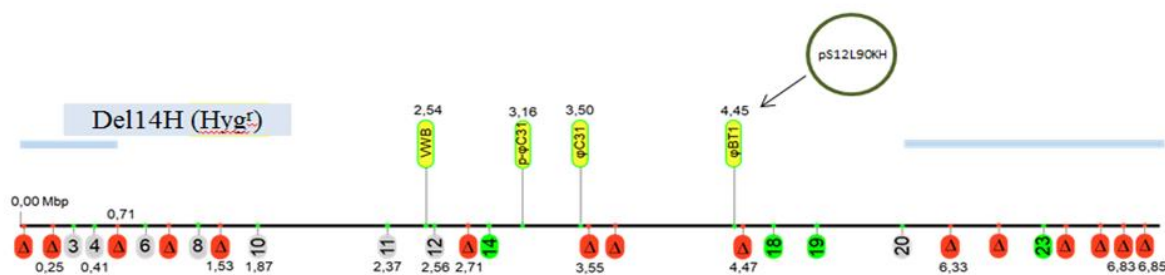


Рис. 3.15. Геном Del14H. Зелені овали – генні кластери, для яких закодовані спеціалізовані метаболіти були або виявлені, або точно передбачені на основі ідентичності послідовностей. Червоні овали – видалені генні кластери. Числа на овалах відповідають нумерації кластерів. Номери над і під овалами позначають розташування даного кластера в Mbp від лівого краю. Див. також попередній рисунок.

Кон'югативне перенесення виконували за стандартним протоколом описаним в розділі 2.2.13. Одну частину штамів ми вирощували протягом 5 днів та реплікували на чашки з SFM + селективні антибіотики (апраміцин + гігromіцин або рифампіцин + гігromіцин).

Іншу частину заливали м'яким агаром з тими ж антибіотиками, зокрема, у 50-мл пробірку наливали 8 мл дистильованої води, додавали антибіотики (Am+Hyg, Rif+Hyg) та вносили 2 мл 1% агаризованого середовища TSA.

3.4.2. Порівняння кон'югативного перенесення з *S.albidoflavus* pCMA+ та *S. albidoflavus* pTKA+ в Del14H

У таблиці 3.2 наведено дані трьох різних експериментів з використанням двох різних штамів-донорів (за типом плазміди): pCMA+ та pTKA+. Частоту появи транскон'югантів розраховували як відношення кількості колоній певного типу транскон'югантів до титру спор донора.

Таблиця 3.2

Частоти появи транскон'югантів

		Титр спор, 1 мл	К-ть Am ^R Hy ^R колоній	Частота кон'югантів (Am ^R Hy ^R)	К-ть Rif ^R Hy ^R колоній	Частота кон'югантів (Rif ^R Hy ^R)
Відбір методом реплік на селективні середовища						
♂	КО-1404 pCMA	3,5×10 ⁸	1,1×10 ⁸	31%	2,1×10 ⁴	0,006%
♀	Del14H	2,9×10 ⁸				
♂	КО-1404 pTKA	3,2×10 ⁸	7,2×10 ⁷	23%	1,2×10 ⁴	0,004%
♀	Del14H	2,86×10 ⁸				
Відбір методом заливання м'яким агаром						
♂	КО-1404 pCMA	3,5×10 ⁸	1.5×10 ⁸	43%	2,7×10 ⁴	0,008%
♀	Del14H	2,9×10 ⁸				

При відбиранні транскон'югантів на середовищах з апраміцином+гігromіцином та рифампіцином+гігromіцином кон'югація, де штам-донор містить плазмиду pCMA продемонстровано дещо вищі частоти передачі порівняно з плазмідом pTKA. Частота передавання плазмиди є значно вищою (23-43%) порівняно з передачею хромосомних ділянок groV (0,004-0,008%), що розташована дистально відносно плазмиди (див.

рис..3.14). Заливання м'яким агаром дещо збільшує частоту кон'югації рСМА: 43% проти 31%.

3.4.3. Кон'югативне перенесення зі штаму АРЕХ11 в штам-реципієнт *S.albidoflavus* Del14Н

Іншим завданням було провести кон'югативне перенесення, коли в штам-донор буде містити плазмиду з геном *tra*, без регуляторних ділянок, зокрема *clt*-сайту та регулятора *korA*. Для цього ми використали штам АРЕХ11 рJR301 (див. табл. 3.1).

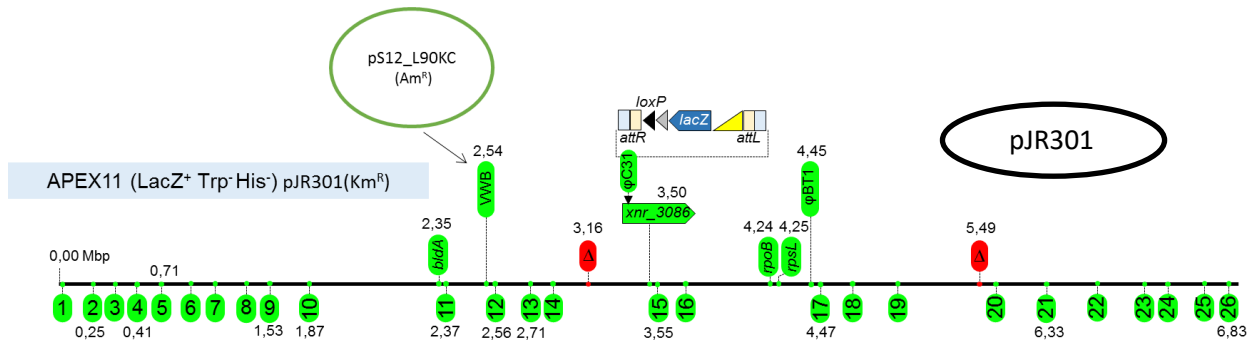


Рис. 3.16 Генотип донорного штаму АРЕХ-11. Зелені овали – генні кластери, які кодують біосинтез певних спеціалізованих метаболітів – відомих або передбачених. Числа на овалах відповідають нумерації кластерів. Над чорною лінією позначені популярні маркерні гени та сайти інтеграції актинофагів. Ген *lacZ* інтегровано в сайт *attB^{φC31}*. Номери над і під овалами позначають розташування даного кластера в Мбр від лівого краю. В штамі делетовано (червоні овали) псевдосайт *attB^{φC31}* та ген *priA*, що задіяний у синтезі триптофану та гістидину.

Як штам-реципієнт використовували Del14Н. Транскон'югантів відбирали на селективних середовищах з додаванням антибіотиків (гігроміцин, апраміцин) та хромогенного субстрату X-Gal. Ми виявили прототрофів, які мали здатність гідролізувати хромогенний аналог лактози X-Gal та виявляли стійкість до апраміцину та гігроміцину (рис. 3.17). Отримані транскон'юганти X-Gal+Ну^r або Am^rНу^r – очевидно є наслідком перенесення

зі штаму APEX11 гена *lacZ* або плазмиди pS12_L90Kc, що містить маркерний ген стійкості до апраміцину. Частота апраміцин стійких клонів була досить низька, тому для індукції промоторів ми спробували використати тіострептон, що збільшило частоту отриманих рекомбінантних колоній. На середовищі з канаміцином транскон'югантів відібрати не вдалося, що вказує на відсутність перенесення самої плазмиди pJR301.

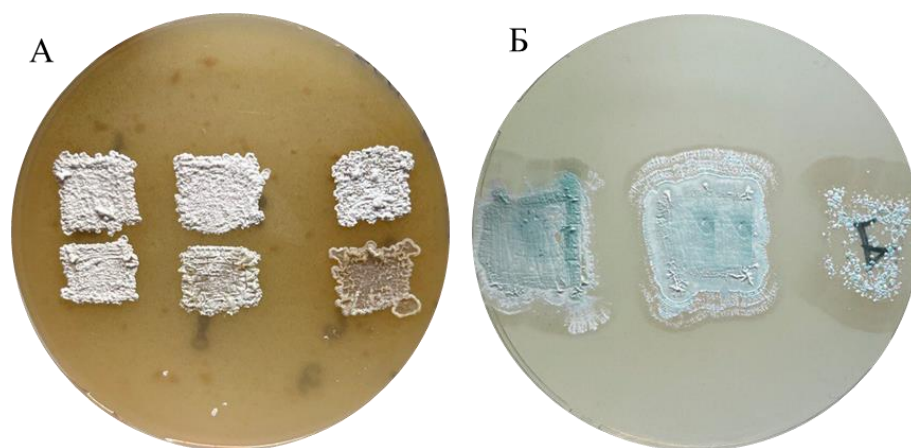


Рис. 3.17 Відібрані транскон'югани на середовищі: А - SFM з додаванням Am,Нуг; Б-мінімальному середовищі з додаванням Нуг,Х-Gal.

3.5. Перенесення маркерів за рахунок плазмиди pCMA з інших актиноміцетів в геном *S. albidoflavus*

3.5.1. Кон'югативне перенесення *S.venezuelae* pCMA – Del14H.

Штамом–донором був *S. venezuelae* pCMA, який можна відібрати за такими селективним маркерами як стійкість до хлорамфеніколу та апраміцину. Штам-реципієнт стійкий до гігроміцину. В цьому схрещуванні ми спробували переносити плазмиду pCMA (Am^R) або ж маркер стійкості до хлорамфеніколу (Cm^R). Селекцію проводили методом реплік на вівсяне середовище Am+Нуг або Cm+Нуг. Очікуваний транскон'югантів не отримали.

3.5.2. Кон'югативне перенесення з рСМА⁺ штамів *S. cyanogenus* J39, *S. roseochromogenes*, *A. teichomyceticus* у штами *S. albidoflavus*.

Штам-донор J39, крім стійкості до апраміцину, на плазміді, має стійкість до гігроміцину, що робить його зручним об'єктом для кон'югативного перенесення. Штамом-реципієнтом виступав КО-1404(Rif^r). Транскон'югантів відбирали двома варіантами умов: ОМ +Am+Rif або ОМ+Нуг+Rif. 0.010

Штами донори NRRL 3504 є Am^r за рахунок клонованої в них плазмиди. Штам-реципієнт Del14H містить ген стійкості до гігроміцину. В обидвох варіантах схрещувань, ми відбирали транскон'югантів на середовищі з Am та Нуг.

Кон'югацію з актинопланетами виконували за стандартною методикою. Селекцію проводили методом реплікацій. Зокрема, пересівали транскон'югантів (якщо реципієнт – Del14H) на чашки з ОМ +Am+Нуг ОМ+Ris+Нуг. В іншому варіанті використали КО-1404. Штам-донор *A. teichomyceticus* рСМА також стійкий до глікопептидного антибіотика ристоміцину (Ris), реципієнт *S. albidoflavus* КО-1404 – до рифампіцину. Тому ми очікували побачити Ris+Rif^R або Am+Rif^R транскон'югантів.

В усіх схрещуваннях, де донором виступали *S. cyanogenus* J39 рСМА, *S. roseochromogenes* рСМА, *S. tsukubaensis* рСМА, *A. teichomyceticus* нам не вдалося відібрати відповідних транскон'югантів.

3.6. Міжвидова кон'югація *S. venezuelae*/*S. albidoflavus* КО1404 рСМА;

Для того, щоб відтворити перенесення плазмиди рСМА з *S. albidoflavus* в інші види стрептоміцетів, ми використали штам – реципієнт *S. venezuelae*, що є стійкий до хлорамфеніколу. Штам-донор КО-1404 рСМА⁺ похідний

штаму КО-1305, виявляє стійкість до рифампіцину (як мінімум 50 мкг/мл). Це дозволяє нам відбирати клонів на середовищах з апраміцином і хлорамфеніколом, або рифампіцином і хлорамфеніколом. Попередньо вирощені культури штамів ресуспендували в 300 мкл рідкого середовища TSB. Вирощували на середовищі ОМ протягом 5-7 діб. Чашки з газом реплікували на чашки з середовищем ОМ з додаванням хлорамфеніколу і рифампіцину чи апраміцину. На чашках з Rif100+Cm100 вирости транскон'юганти з низькою частотою. Кілька транскон'югантів ми пересіяли на середовище ОМ (рис.3.18).

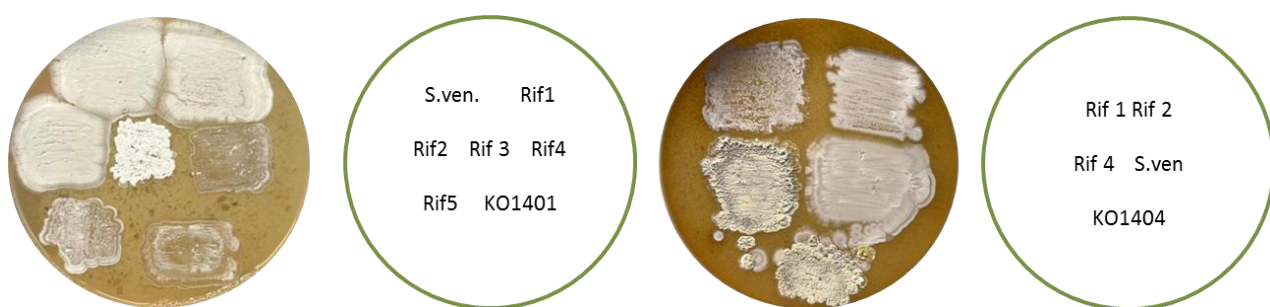


Рис. 3.18 Пересіяні транскон'юганти з реплік *S.venezuelae/ S.albidoflavus* KO1404 рСМА відібраних на чашках з агаризованим середовищем ОМ з додаванням Cm100 та Rif100.

Отримані колонії пересіяли на чашки з хлорамфеніколом або рифампіцином. Як контролі використовували штам-донор та штам-реципієнт (рис.3.19).

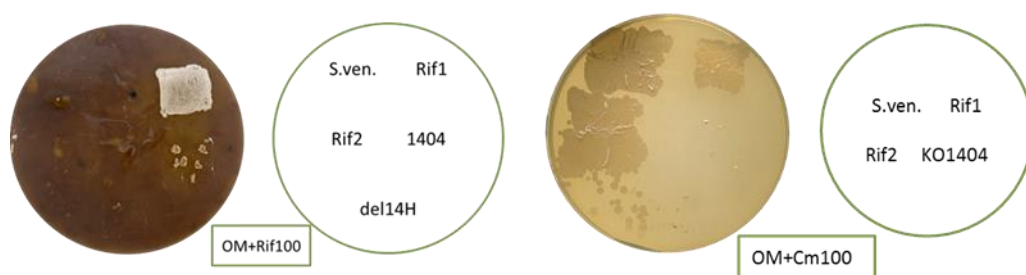


Рис. 3.19 Пересіяні транскон'юганти з реплік *S.venezuelae/ S.albidoflavus* KO1404 рСМА відібраних на чашках з агаризованим середовищем ОМ з додаванням Cm100 та Rif100. Негативний контроль – *S.venezuele*, позитивний контроль – *S.albidoflavus* KO1404.

Для підтвердження перенесення ділянки ми ампліфікували ген *rpsL*, який забезпечує стійкість штамів до рифампіцину (рис.3.20). Ми використовували праймери: *rpsL*_XbaIup (AAATCTAGAGTGGTTCCCGT TCCCGTC) та *rpsL*_KpnIrp (AAAGGTACCTTACTTCTCCTTCTTGGCGC)

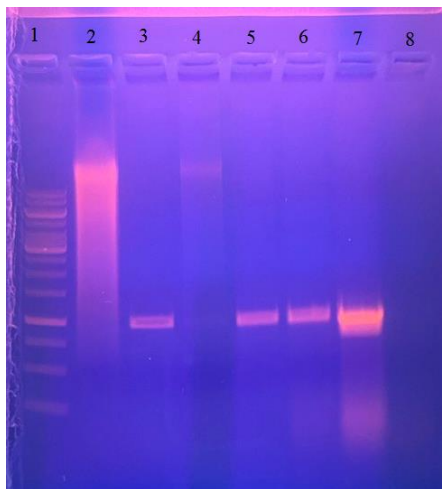


Рис. 3.20 ПЛР гена *rpsL* з транскон'югантів отриманих в результаті міжвидової кон'югації *S. venezuelae* та *S. albidoflavus* KO1404 pCMA. 1 – маркер; 2 – Rif1; 3 – Rif1 1:10; 4 – Rif2; 5 – Rif2 1:10; 6 – 1403; 7 – pS12L90KC; 8 – без додавання ДНК, як матриці.

Отже, при такій варіації кон'югативного перенесення ми спостерігали передачу висококонсервативної ділянки хромосоми, але вони не були стійкими до Am, тому плазміда не передавалася.

Крім того, ми виконували кон'югативні перенесення між штамми *S.albidoflavus* 1404 pCMA - *S.viridosporus* dO5 та *S.albidoflavus* 1404 pCMA – *A.teichomyceticus*. У першому варіанті відбирали транскон'югантів та середовищах з Am+Нуг, у другому Rif+ристоміцин/Am+ристоміцин. У жодному зі схрещувань не відібрали очікуваних колоній.

Висновки

1. Філогенетичний аналіз низки добре вивчених стрептоміцетних білків-транслоказ TraV засвідчив їхню суттєву відмінність, зокрема у будові ДНК-зв'язувального домену, що також підтверджує моделювання третинної структури кількох білків. Отже, слід досліджувати різні білки TraV як знаряддя маніпуляцій геномами стрептоміцетів, оскільки вони можуть мати відмінні властивості.

2. Сконструйовано низку плазмід, що містять ділянку *traB*^{pIJ101}-*korA* за відсутності *цис*-діючої ділянки *clt* (pТКА), а також лише ген *traB*^{pSG2} (pTESKA).

3. Сконструйовано колекцію донорних штамів актиноміцетів, які будуть використовуватися для пошуку умов кон'югативного перенесення їхніх хромосом у інші штами, зокрема *S. albidoflavus*.

4. Опрацьовані оптимальні підходи до кон'югативного перенесення ДНК між штамми *S. albidoflavus*, з частотою, що сягає 43% відносно титру спор донорного штаму $((2,8 \pm 0,4) \times 10^8)$. Відсутність природної *clt* ділянки незначно зменшує частоти появи транскон'югантів.

5. Продемонстроване кон'югативне перенесення маркерних мутацій антибіотикорезистентності *rpoB rpsL* зі штаму *S. albidoflavus* KO1404 pCMA⁺ у *S. venezuelae*.

4. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Остап Б.О., Остап І.С., Федоренко В.О. Рибосома як регуляторний елемент метаболізму: нове розуміння на основі підходів геномної інженерії // Л.: Звіт про НДР. – 2016. – 55 с.
2. Antimicrobial resistance in the age of COVID-19. (2020). *Nature Microbiology*. doi:10.1038/s41564-020-0739-4
3. Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2013). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 223–235. doi:10.1111/jam.12369
4. Bordeleau, E., Ghinet, M. G., & Burrus, V. (2012). Diversity of integrating conjugative elements in *Actinobacteria*. *Mobile Genetic Elements*, 2(2), 119–124. doi:10.4161/mge.20498
5. Ducote, M. J., & Pettis, G. S. (2003). Common and Distinguishing Regulatory and Expression Characteristics of the Highly Related KorB Proteins of *Streptomyces* Plasmids pIJ101 and pSB24.2. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3780–3787. doi:10.1128/jb.185.13.3780-3787.2003
6. Elisabeth Grohmann, Manuel Espinosa, Günther Muth. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. (2003). doi:10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003
7. Franco B. Gonzalez-Ceron G. Servin-Gonzalez L. (2003) Direct repeat sequences are essential for function of the cis-acting locus of transfer (clt) of *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1. *Plasmid*50: 242–247.
8. Fuchino, K., Bagchi, S., Cantlay, S., et al., 2013. Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1889–E1897.
9. Hempel, A.M., Wang, S.B., Letek, M., Gil, J.A., Flardh, K., 2008. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 190, 7579–7583.

10. Hsu, C.-C., & Chen, C. W. (2009). Linear Plasmid SLP2 Is Maintained by Partitioning, Intrahyphal Spread, and Conjugal Transfer in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 307–315. doi:10.1128/jb.01192-09
11. Hu, Z., Hopwood, D. A., & Khosla, C. (2000). Directed Transfer of Large DNA Fragments between *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2274–2277. doi:10.1128/aem.66.5.2274-2277.2000
12. Kataoka M, Kosono S, Seki T, Yoshida T. 1994. Regulation of the transfer genes of *Streptomyces* plasmid pSN22: in vivo and in vitro study of the interaction of TraR with promoter regions. *J Bacteriol* 176:7291–7298.
13. Kataoka, M., Kosono, S., Seki, T., Yoshida, T., 1994. Regulation of the transfer genes of *Streptomyces* plasmid pSN22: in vivo and in vitro study of the interaction of TraR with promoter regions. *J. Bacteriol.* 176, 7291–7298
14. Kieser T. Hopwood D.A. Wright H.M. Thompson C.J. (1982) pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol Gen Genet*185: 223–228.
15. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
16. Pettis, G. S. (2018). Spreading the news about the novel conjugation mechanism in *Streptomyces* bacteria. *Environmental Microbiology Reports*. doi:10.1111/1758-2229.12659
17. Pettis, G. S. (2018). Spreading the news about the novel conjugation mechanism in *Streptomyces* bacteria. *Environmental Microbiology Reports*. doi:10.1111/1758-2229.12659
18. Pettis, G. S., & Cohen, S. N. (1994). Transfer of the pIJ101 plasmid in *Streptomyces lividans* requires a cis-acting function dispensable for chromosomal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 13(6), 955–964. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00487.x
19. Pettis, G. S., Shubha Prakash. (1999). Complementation of Conjugation Functions of *Streptomyces lividans* Plasmid pIJ101 by the Related *Streptomyces* Plasmid pSB24.2. doi: 10.1128/jb.181.15.4680-4685.1999

20. Possoz C. Ribard C. Gagnat J. Pernodet J.L. Guerineau M. (2001) The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol Microbiol*42: 159–166.
21. Reuther J. Gekeler C. Tiffert Y. Wohlleben W. Muth G. (2006b) Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol Microbiol*61: 436–446.
22. Sepulveda, E., Vogelmann, J., & Muth, G. (2011). A septal chromosome segregator protein evolved into a conjugative DNA translocator protein. *Mobile Genetic Elements*, 1(3), 225–229. doi:10.4161/mge.1.3.18066
23. Servín-González, L., Sampieri, A., Cabello, J., Galván, L., Juárez, V., Castro, C., 1995. Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology* 141, 2499–2510.
24. Thoma, L., & Muth, G. (2015). The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 224–229. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.020
25. Thoma, L., & Muth, G. (2015). The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 224–229. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.020
26. Thoma, L., Dobrowinski, H., Finger, C., Guezzuez, J., Linke, D., Sepulveda, E., & Muth, G. (2015). A Multiprotein DNA Translocation Complex Directs Intramyceial Plasmid Spreading during *Streptomyces* Conjugation. *mBio*, 6(3). doi:10.1128/mbio.02559-14
27. Thoma, L., Muth, G., 2012. Conjugative DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough? *FEMS Microbiol. Lett.* 337, 81–88.
28. Thoma, L., Sepulveda, E., Latus, A., Muth, G., 2014. The stability region of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 encodes a DNA-binding protein recognizing a highly conserved short palindromic sequence motif. *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2014.00499

29. Thoma, L., Vollmer, B., Oesterhelt, F., & Muth, G. (2019). Live-cell imaging of *Streptomyces* conjugation. *International Journal of Medical Microbiology*. doi:10.1016/j.ijmm.2019.05.006
30. Thomas C.M. Nielsen K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*3: 711–721.
31. Tiffert, Y., Gotz, B., Reuther, J., Wohlleben, W., & Muth, G. (2007). Conjugative DNA transfer in *Streptomyces*: SpdB2 involved in the intramycelial spreading of plasmid pSVH1 is an oligomeric integral membrane protein that binds to dsDNA. *Microbiology*, 153(9), 2976–2983. doi:10.1099/mic.0.2006/005413-0
32. Vogelmann, J., Ammelburg, M., Finger, C., Guezguez, J., Linke, D., Flötenmeyer, M., Muth, G. (2011). Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *The EMBO Journal*, 30(11), 2246–2254. doi:10.1038/emboj.2011.121
33. Wang, J., & Pettis, G. S. (2010). The *tra* locus of Streptomycete plasmid pIJ101 mediates efficient transfer of a circular but not a linear version of the same replicon. *Microbiology*, 156(9), 2723–2733. doi:10.1099/mic.0.036467-0
34. Wolanski, M., Wali, R., Tilley, E., Jakimowicz, D., Zakrzewska-Czerwinska, J., Herron, P., 2011. Replisome trafficking in growing vegetative hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 193, 1273–127
35. Wright G. Q&A: antibiotic resistance: what more do we know and what more can we do? / G. D. Wright // *BMC Biol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 51–59.
36. Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., & Loria, R. (2018). Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces* . *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1733–1741. doi:10.1111/mpp.12656