

ВЛАСТИВОСТІ СПОНТАННОГО *RPSL*-МУТАНТА *STREPTOMYCES ALBUS* KO-1297А.Л. ШЕМЕДЮК¹, Б.С. ДОЛЯ¹, К. ОЧІ², В.О. ФЕДОРЕНКО¹, Б.О. ОСТАШ^{1*}¹ Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів 79005, Україна² Технологічний інститут Хірошіми, Хірошіма 731-5193, Японія

E-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua

Штам *Streptomyces albus* J1074 залишається однією із найпопулярніших платформ для відкриття нових природних сполук за рахунок експресії біосинтетичних генних кластерів (BGCs) з мікроорганізмів класу *Actinobacteria*. Наразі апробовано різноманітні способи, аби забезпечити максимальну експресію гетерологічних BGCs в цьому штамі. Однак, досі немає опису властивостей спонтанних мутантів J1074 за геном *rpsL*, що кодує рибосомний білок S12. Цікавість до таких мутацій у актинобактерій викликана тим, що вони забезпечують суттєве зростання антибіотичної активності. У цій роботі ми описуємо виділення та характеристики штаму *S. albus* KO-1297, що містить спонтанну міссенс-мутацію в гені *rpsL*, яка веде до заміщення *Lys88aGlu* у білку S12. Порівняно з вихідним штамом, цей мутант виявляє підвищену стійкість до стрептоміцину та вищу антибіотичну продуктивність. Штам KO-1297 і генно-інженерний *rpsL*^{K88E} мутант K88E не є ідентичними за здатністю продукувати антибіотики. KO-1297 також виявляє певний рівень нестабільності *rpsL* мутації. У геномах KO-1297 та його *rpsL*^{WT} ревертанта виявлено мутації, які можуть зумовлювати фенотипові відмінності між цими штамми, а також ними та штамми SAM2 й K88E.

Ключові слова: *Streptomyces albus* J1074, *rpsL* мутації, геноміка.

Вступ. Невпинне поширення бактерійних і вірусних інфекцій набуло неабиякої гостроти у сучасному світі, особливо у світлі пандемії, викликаній SARS-CoV2 (Editorial 2020), вкотре нагадуючи людству про необхідність пошуку нових дієвих протибактерійних і противірусних препаратів. Практично невичерпний потенціал Грам-позитивних бактерій класу *Actinobacteria* до продукції біоактивних речовин можна використати для відкриття нових антибіотиків. Серед актинобактерій найвивченішим і комерційно успішним є рід *Streptomyces* (Pye et al, 2017). На сьогодні методологічно найефективнішим під-

ходом до відкриття нових біоактивних речовин є експресія окремих генів й геномних бібліотек стрептоміцетів у спеціальних штаммах-платформах, серед яких найпопулярнішою є штам *Streptomyces albus* J1074. Швидкий, дисперсний ріст і простота генетичних маніпуляцій сприяли тому, що *S. albus* J1074 став штамом «першого вибору» для експресії гетерологічних кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів актинобактерій (Bilyk and Luzhetskyy, 2017).

Удосконалення біотехнологічного потенціалу *S. albus* J1074 стало важливим напрямом досліджень, у ході яких сконструйовано нові похідні цього штаму, плазмиди експресії глобальних регуляторів вторинного метаболізму та опрацьовано різноманітні прийоми культивування, що забезпечують максимальну продуктивність цієї платформи (Lopatniuk et al, 2017; Gummerlich et al, 2021; Kuhl et al, 2021). Відбір високопродуктивних варіантів серед стрептоміцин-стійких (Str^R) мутантів *Streptomyces* є одним із історично перших підходів до отримання надпродуцентів антибіотиків; найчастіше такі мутації виникають у гені *rpsL*, який кодує рибосомний білок S12 (Shima et al, 1996). Раніше нами описано геномно-інженерний підхід до конструювання точкових *rpsL*-мутацій в J1074, який дав змогу ідентифікувати кілька перспективних штамів (Lopatniuk et al, 2019). Це дало унікальну можливість вперше об'єктивно порівняти особливості та переваги двох підходів – пошуку спонтанних *rpsL*-мутантів і конструювання таких мутантів за допомогою методів геномної інженерії. Важливим є питання чи дійсно лише *rpsL*-мутація, без додаткових мутацій, зумовлює зростання антибіотичної продуктивності в спонтанних мутантів. Більше того, хоча окремі наслідки *rpsL*-мутацій відомі, як-от вищий рівень білкового синтезу в стаціонарній фазі (Okamoto-Hosoya et al, 2003), повний механізм впливу цих мутацій на вторинний метаболізм *Streptomyces* залишається

незрозумілим. Геномна інженерія теоретично дає змогу отримувати певні зміни генома у «чистому» вигляді, тобто без супутніх мутацій. Порівняння ізогенних *rpsL*-мутантів різного походження є одним із способів пошуку відповідей на згадані вище питання. Відповідно, у цій роботі ми описуємо отримання і початкову характеристику спонтанного *rpsL*-мутанта *S. albus* КО-1297. Отримані результати засвідчують, що біотехнологічно цінні властивості (як-от, здатність до продукції антибіотиків) генно-інженерних та спонтанних мутантів, ізогенних лише за алелем *rpsL*, можуть відрізнитися. Імовірно, це викликано наявністю у геномах спонтанних мутантів додаткових мутацій. Ми подаємо результати аналізу генома штаму КО-1297, які слугують доказом вищезгаданого твердження.

Матеріали і методи. *Streptomyces albus* SAM2 (також відомий як Dpse) – похідний *S. albus* J1074 з делецією псевдо-*attB*^{CS1}-сайту (Bilyk and Luzhetskyy, 2014) – використовували у всіх дослідках як вихідний штам. Мутант *S. albus* K88E містить алель *rpsL*^{K88E}, отриманий методами геномної інженерії (Lopatniuk et al, 2019). Штам КО-1297 відібрали серед спонтанних Str^R-мутантів SAM2, як описано далі. Штам КО-1297L отримали як спонтанний стрептоміцин-чутливий (Str^S) похідний КО-1297 у цій роботі. Стрептоміцети культивували на середовищах TSA, GYM, SG2, TSB, SFM (Tanaka et al, 2009; Koshla et al, 2017; Koshla et al, 2019) при температурі 30 °С. Штами *Bacillus cereus* ATCC19637, *Staphylococcus aureus* 209P і *Debaryomyces hansenii* VKM9 використовували як тест-культури для визначення антибіотичної активності *rpsL*-мутантів. Косміда рOJaга з кластером генів біосинтезу аранціяміцину описана в (Koshla et al, 2017). Метод агарових блоків для визначення антибіотичної активності штамів *S. albus*, екстракція та спектрофотометрія аранціяміцинів описані в (Koshla et al, 2017). Усі компоненти живильних середовищ придбані в Conda Laboratories. Стрептоміцину сульфат придбано в Roth. Інші реактиви від компанії ХімЛаборРеактив були рівня чистоти не менше х.ч.

Стійкість клонів *S. albus* до стрептоміцину визначали методом реплік колоній на агарі-

зоване середовище SFM з антибіотиком. Для визначення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) стрептоміцину, спорові суспензії досліджуваних штамів (10⁵ к.у.о.) засівали в лунки імунологічного планшета з 120 мкл середовища TSB, що містило різні концентрації антибіотика (від 0,6 до 200 мкг/мл). Планшети інкубували на качалці, ріст визначали після 48 год вирощування.

Праймери, що використовували для скринінгу та ідентифікації мутацій в гені *rpsL*, та умови ПЛР-скринінгу таких мутацій описано в (Shima et al, 1996). Геномну ДНК штамів КО-1297, КО-1297L виділяли методом висолювання, згідно процедури №4, яку описано в (Kieser et al, 2000) з 24-годинних культур, вирощених у триптон-соєвому середовищі TSB. Концентрацію та якість виділеної ДНК визначали на мікроканальному аналізаторі Triplex Xpose (Gentbrugge, Бельгія). ДНК, що пройшла контроль якості, використали для конструювання бібліотеки для секвенування методом Illumina (набір TruSeq DNA PCR-Free Kit). Бібліотеку секвенували на приладі Illumina HiSeq.

Вихідні дані секвенування геномів *S. albus*, референтна послідовність генома J1074 є у базі даних, що підтримується групою Львівського університету: <https://biotools.online/media/>. На етапі контролю якості даних усі вихідні зчитування генома перевіряли на рівень якості та присутність адапторів секвенування за допомогою програми FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Неякісні послідовності вилучали за допомогою програми Trimmomatic v. 0.36. Зчитування генома вирівнювали проти референтної послідовності генома J1074 (номер доступу CP004370) за допомогою програми Bowtie2 v. 2.2.5. Поліморфізми (SNP) та індели (DIP) виявляли за допомогою ReadXplorer (Hilker et al, 2014). Рівень покриття секвенування геномів становив 55÷165-кратного рівня (див. список на згаданій вище веб-сторінці бази даних: [Supplementary_data_\(avg_coverage\).xlsx?](#), рівень покриття і якість даних – див. також [xlsx](#)-файли у папці SNP згаданого вище онлайн-фолдера).

Результати. Отримання штамів КО-1297, КО-1297L. У цьому дослідженні ми зосередились

на отриманні спонтанного мутанта *S. albus*, що містить точкове заміщення у гені *rpsL* (*xnr_3720*), яке на рівні амінокислотної послідовності білка S12 призводить до заміщення залишку лізину у 88-му положенні на залишок глутамату (алель *rpsL*^{K88E}). Це один із найкраще вивчених мутантних алелів гена *rpsL*, який у стрептоміцетів викликає значне зростання продукції антибіотиків (Shima et al, 1996; Okamoto-Nosoya et al, 2003; Ochi, 2017). Пошук такого мутанта виконали за допомогою посіву спорових суспензій (близько 10⁸ колонієутворювальних одиниць, к.у.о.) вихідного штаму SAM2 на агаризоване середовище GYM, що містило 100 мкг/мл стрептоміцину, та ПЛР-скринінгу колоній, які виростили на цих чашках за 7 діб. Загалом нами виявлено сім Str^R-клонів, які не втратили стійкості до 100 мкг/мл стрептоміцину після трьох пересівів за неселективних умов. Частота їх появи – 1,4 × 10⁻⁸. Один із клонів, позначений як KO-1297, містив заміщення залишку аденіну на гуанін у позиції 262 гена *rpsL* (*xnr_3720*), що на рівні амінокислотної послідовності веде до шуканого заміщення K88aE.

Ми вирішили докладніше дослідити стабільність фенотипу стрептоміцин-стійкості KO-1297. Для цього здійснили 13 пасажів культури цього мутанта у рідкому середовищі TSB за відсутності селективного тиску і суспензію міцеліальних клітин з останнього пасажу висіяли у розведеннях на соєво-манітоловий агар SFM. Серед близько 10 тис колоній, що виростили на SFM, методом реплік виявили одну, що не росла на SFM з 100 мкг/мл стрептоміцину. Отриманий клон позначили як KO-1297L. Ми визначили мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) стрептоміцину для штамів SAM2, K88E, KO-1297 та KO-1297L. Встановлено такі МІК: для SAM2 – 1,6 мкг/мл, для KO-1297L – 6,25 мкг/мл. Ріст K88E і KO-1297 спостерігали за найвищою дослідженою концентрацією стрептоміцину – 200 мкг/мл. Отже, хоча KO-1297L втратив здатність рости за високих концентрацій стрептоміцину, за фенотипом стрептоміцин-стійкості він відрізняється від SAM2 і, очевидно, не є ревертантом до дикого типу за цією ознакою.

Антибіотична активність *rpsL* мутантів. Ми виростили досліджувані мутанти на середови-

щах GYM, SG2 і використали 5-добові агарові блоки цих культур для оцінки антибіотичної активності цих штамів проти низки тест-культур. Результати цих експериментів узагальнено в табл. 1 та на рисунку, а. Помітно, що мутанти, як спонтанний, так і генно-інженерний K88E, виявляють здебільшого вищу антибіотичну активність проти використаних бактерійних культур та дріжджів *D. hansenii*, а ревертант радше нагадує вихідний штам SAM2. Однак, є і відмінності між спонтанним й генно-інженерним мутантами, які несуть алель *rpsL*^{K88E}. Так, перший менш активний проти *B. cereus*, але активніший щодо дріжджів *D. hansenii*. Відмінності між дослідженими *rpsL*^{K88E}-мутантами також прослідковуються й за умов гетерологічної експресії в цих штамів кластера генів біосинтезу аранціяміцину. Так, спонтанний *rpsL*^{K88E}-мутант KO-1297 виявляв набагато вищу здатність продукувати вищезгаданий антибіотик порівняно з генно-інженерним штамом K88E на агаризованому середовищі SFM (рисунок, б) і в рідкому середовищі SG2. Щодо останнього випадку, то KO-1297 продукував майже у півтора і три рази більше аранціяміцину (0,485 у.о., дані спектрофотометрії екстрактів) порівняно з штамом K88E (0,339 у.о.) і SAM2 (0,159 у.о.), відповідно.

Аналіз геномів KO-1297, KO-1297L. Вищеописані результати спонукали нас просеквенувати геноми батьківського штаму SAM2, мутантів KO-1297 й KO-1297L з тим, щоб зрозуміти генетичну основу виявлених у них відмінностей в стійкості до антибіотиків та антибіотичній активності. У результаті картування даних секвенування відносно референтного генома J1074 виявлено мутації, що містять KO-1297 та KO-1297L порівняно з SAM2. Перелік відмінностей наведено у табл. 2. Вихідні дані доступні у базі даних за лінком,

Таблиця 1. Антибіотична активність¹ штамів *S. albus*

Штами <i>S. albus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>D. hansenii</i>
SAM2	+2	+	+
K88E	++	++	+
KO-1297	+	++	++
KO-1297L	+	+	+

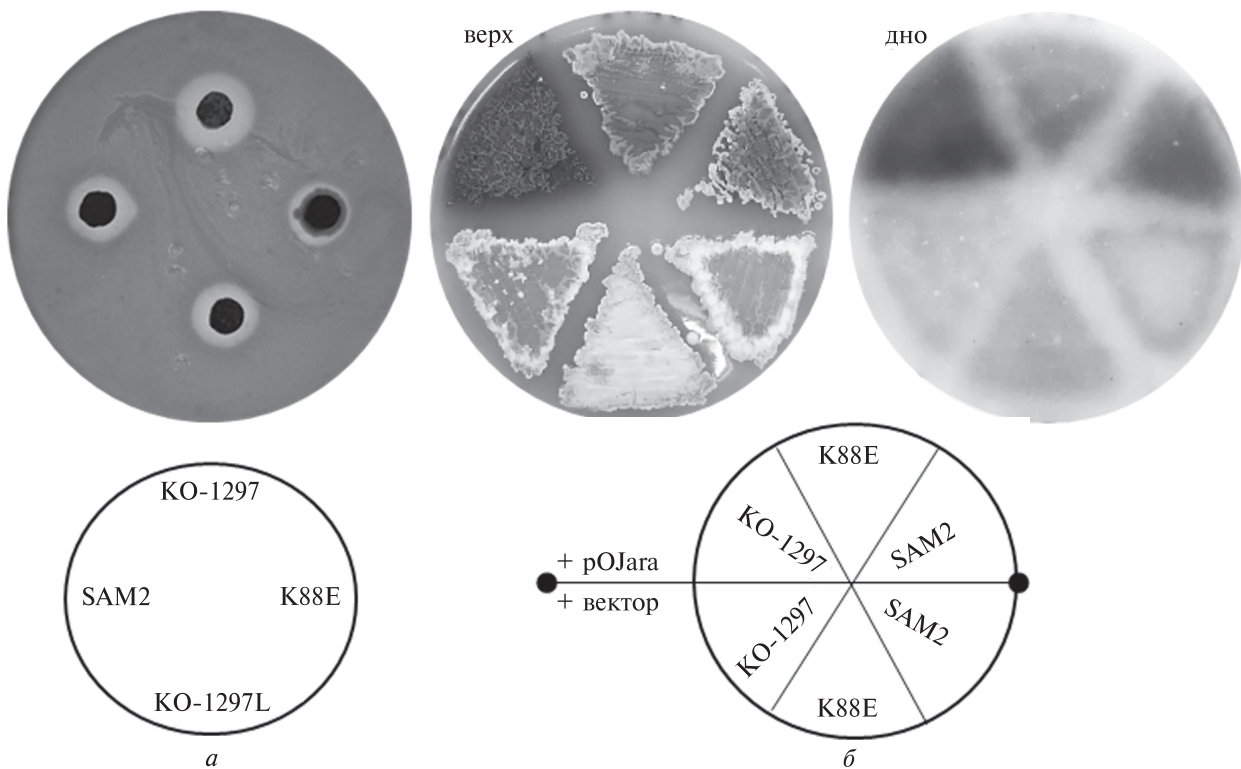


Рис. 1. Антибіотична активність *rpsL* мутантів *S. albus*. *a* – пригнічення росту *D. hansenii* агаровими блоками штамів *S. albus*; *б* – гетерологічна продукція аранціяміцину (червоний колір) штамми *S. albus*. Розташування штамів, див. графічні легенди під фотографіями. Фотографії відображають типовий результат щонайменше п’яти повторів

що подано у розділі «Матеріали і методи». Цікавою знахідкою в геномі КО-1297 стала делеція в гені фосфодіестерази *xnr_1338*, що може бути задіяна у метаболізмі вторинного месенджера с-di-GMP, який контролює вто-

ринний метаболізм і морфогенез стрептоміцетів. Підтверджено втрату *rpsL*^{K88E} мутації в геномі КО-1297L. Натомість в КО-1297L виявлені чотири нові мутації, з яких найбільшу цікавість, на нашу думку, становить мутація

Таблиця 2. Перелік нових мутацій у геномах КО-1297, КО-1297L порівняно з батьківським геномом SAM2

Мутація	Локус ¹	Функція	Присутність мутації в:	
			КО-1297	КО-1297L
Δ1595677	<i>xnr_1338</i>	Фосфодіестераза	+	–
Trp→Cys	<i>xnr_2696</i>	Фагова інтеграза	–	+
Ala→Ser	<i>xnr_2758</i>	Асп-дегідрогеназа	+	–
Gln→Arg	<i>xnr_3600</i>	Гіпотетичний білок	–	+
Lys→Glu	<i>xnr_3720</i>	Рибосомний білок S12	+	–
Lys→Glu	<i>xnr_4071</i>	Транскрипційний фактор IclR-родини	–	+

Примітка. ¹ Тип і локалізація в гені міссенс- мутації наведено у додаткових матеріалах, див. гіперпосилання у Матеріалах і методах.

в гені транскрипційного фактора *xnr_4701*, з причин, які описано нижче, в обговоренні результатів. Білок Xnr_4701 з родини IclR, складається з 262 амінокислотних залишків. З допомогою сервісу <https://smart.embl.de/> виявлено, що заміна Lys136aGlu, викликана мутацією в *xnr_4701*, знаходиться поза межами ДНК-зв'язувальної домену, який охоплює сегмент білка від 2 до 89 амінокислотного залишку, і, отже, не мала б порушувати його здатність взаємодіяти з ДНК.

Обговорення. Штам *S. albus* J1074 стає дедалі важливішою платформою для відкриття біологічно активних речовин (Olano et al, 2014; Kallifidas et al, 2018), що зумовлює значний інтерес до вивчення усіх аспектів його біології (Ahmed et al, 2017; Myronovskyi et al, 2018; Koshla et al, 2019a). Спонтанні, чи індуковані мутагенами, стрептоміцинстійкі мутанти, які виникають унаслідок точкових заміщень у гені *rpsL* рибосомного білка S12, часто виявляють підвищену здатність до продукції антибіотиків. Точний механізм впливу *rpsL* на продукцію вторинних метаболітів залишається невідомим (див. Вступ). На сьогодні немає робіт, в яких намагалися б дослідити весь геном спонтанного *rpsL*-мутанта і виявити інші мутації, які може нести такий мутант. На причетність саме *rpsL*-мутацій до надпродукції антибіотиків вказує і вивчення *rpsL*-мутантів *S. albus*, які отримали методами геномної інженерії (Lopatniuk et al, 2019), де імовірність побічних мутаційних подій менша. Втім, перевага отримання і використання саме генно-інженерних мутантів у біотехнології залишається незрозумілою. Теоретично, позитивний вплив *rpsL*-мутацій на вторинний метаболізм стрептоміцетів може максимально проявитися за умови виникнення й інших мутацій, які скоріше можна відібрати під час скринінгу спонтанних мутантів. Результати дослідження спонтанного *rpsL*^{K88E}-мутанта KO-1297 у цій роботі дають перший доказ на користь такого сценарію. Порівняно із генно-інженерним *rpsL*^{K88E}-штамом K88E, KO-1297 продукує більше ендогенних протигрибкових сполук і здатний накопичувати більше аранціяміцину за умови гетерологічної експресії генів його біосинтезу. Цікаво, що KO-1297 містить додаткову мутацію порівняно з SAM2 – у гені фосфодіестерази

xnr_1338. Причетність гомологів цього гена до вторинного метаболізму стрептоміцетів добре відома (Makitrynskyu et al, 2020). Імовірна участь цього гена у вторинному метаболізмі *S. albus* і секвенування генома генно-інженерного мутанта K88E є предметом наших поточних досліджень. Можливо, цей мутант також містить додаткові мутації, а не лише ті, які уведено методами геномної інженерії, що може впливати на його фенотип.

Доволі просте (у сенсі частоти появи) виявлення ревертанта KO-1297L стало ще одним цікавим результатом нашого дослідження. У науковій літературі немає даних про частоту реверсії *rpsL*-мутантів стрептоміцетів. У нашому випадку ця частота доволі висока, що, очевидно, свідчить про високий біологічний кошт *rpsL*-мутації. Відомо, що мутація *rpsL*^{K88E} підвищує точність білкового синтезу і у такий спосіб сповільнює ріст культур стрептоміцетів (Shima et al, 1996; Okamoto-Hosoya et al, 2003; Tanaka et al, 2009). Це може зумовлювати селективну перевагу реверсії. Втім, швидка поява штаму KO-1297L може бути обумовлена саме генотипом KO-1297 і не відображати загальної тенденції для усіх *rpsL*-мутантів. Наприклад, присутність мутації в гені фагової інтегрази у KO-1297 може викликати геномні перебудови, які сприяють реверсіям. Величина метаболічного тягара, який мутація *rpsL*^{K88E} накладає на штам, визначається комплексом усіх мутацій в штамі (*rpsL*^{K88E} і супутніх мутацій), сумарний вплив яких неможливо передбачити лише на основі біоінформатичного аналізу (Westhoff et al, 2017).

Попри втрату мутації *rpsL*^{K88E}, KO-1297L стійкіший до стрептоміцину ніж батьківський штам SAM2. Ми припускаємо, що це викликано міссенс-мутацією в гені транскрипційного фактора родини IclR, *xnr_4701*. Описано IclR -подібні білки, зокрема регулятор NdgR (регулятор росту, залежного від нітрогену і продукції антибіотиків), який має глобальний вплив на синтез амінокислот, морфогенез і продукцію антибіотиків у *Streptomyces coelicolor* (Yung-Hun et al, 2009). Гомологи NdgR виявлено в інших видів *Streptomyces*, а також в мікобактерій та коринебактерій, що вказує на його роль як глобального регулятора. Імовірно, мутація в *xnr_4701* веде до утворення білка,

який функціонує конститутивно, чи розпізнає нові промотори генів, які певним чином забезпечують стійкість до стрептоміцину. Перевірка цього припущення є предметом наших поточних експериментів, які можуть привести до виявлення нових механізмів стрептоміцинстійкості.

Фінансування. Цю роботу підтримано грантами Бг-09Ф, Бг-80Ф, БФ-2021, надані Міністерством освіти і науки України. Автори висловлюють подяку Й. Каліновскі (ун-т Білефельда, ФРН), Т. Грень, Т. Веберу (Технічний ун-т Данії) за надану можливість секвенування штамів *S. albus*.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Дотримання етичних норм. В роботі немає експериментів із залученням тварин, людей, ліній клітин тварин чи людей.

PROPERTIES OF SPONTANEOUS *rpsL* MUTANT *STREPTOMYCES ALBUS* KO-1297

A.L. Shemediuk, B.S. Dolia,
K. Ochi, V.O. Fedorenko, B.O. Ostash

Ivan Franko National University of Lviv,
Lviv 79005, Ukraine
Hiroshima Institute of Technology,
Hiroshima 731-5193, Japan
E-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua

Strain *Streptomyces albus* J1074 remains one of the most important platforms for natural product discovery via the expression of biosynthetic gene clusters (BGCs) from the microorganisms of *Actinobacteria* class. Numerous approaches of maximizing the expression of heterologous BGCs in this strain have been described, yet there are no reports on the properties of spontaneous J1074 mutants in gene *rpsL* for ribosomal protein S12. The interest in such mutations in actinobacteria is caused by the fact that they induce a considerable increase in the antibiotic activity. In this work we describe the isolation and characterization of strain *S. albus* KO-1297 carrying missense mutation within *rpsL* gene, which leads to substitution Lys88aGlu in protein S12. As compared to the parental strain, this mutant exhibits increased resistance to streptomycin and enhanced antibiotic productivity. KO-1297 and engineered *rpsL*^{K88E} strain K88E are not identical in their ability to produce antibiotics. KO-1297 also exhibits a certain level of instability of *rpsL* mutation. Genomes of KO-1297 and its *rpsL*^{WT} revertant harbor the mutations that could be responsible for phenotypic differences between these strains, parental strain and K88E.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ahmed Y, Rebets Y, Tokovenko B, Brötz E, Luzhetskyy A. (2017) Identification of butenolide regulatory system controlling secondary metabolism in *Streptomyces albus* J1074. *Sci Rep* 7:9784. doi: 10.1038/s41598-017-10316-y
- Bilyk B, Luzhetskyy A. (2014) Unusual site-specific DNA integration into the highly active pseudo-*attB* of the *Streptomyces albus* J1074 genome. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5095–5104. doi: 10.1007/s00253-014-5605-y
- Bilyk O, Luzhetskyy A. Host organism: *Streptomyces*. In: *Industrial Biotechnology*, Wittmann, Ch., Liao, J.C., Eds, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2017, chapter 13, pp. 487–506. doi: 10.1002/9783527807796.ch13
- Editorial (2020) Antimicrobial resistance in the age of COVID-19. *Nat Microbiol* 5:779. doi: 10.1038/s41564-020-0739-4
- Gummerlich N, Manderscheid N, Rebets Y, Myronovskiy M, Gläser L, Kuhl M, Wittmann C, Luzhetskyy A. (2021) Engineering the precursor pool to modulate the production of pamamycins in the heterologous host *S. albus* J1074. *Metab Eng* 67:11–18. doi: 10.1016/j.ymben.2021.05.004
- Hilker R, Stadermann K, Doppmeier D, Kalinowski J, Stoye J, Straube J. (2014) ReadXplorer-visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinform* 30: 2247–2254. doi: 10.1093/bioinformatics/btu205
- Kallifidas D, Jiang G, Ding Y, Luesch H. (2018) Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Cell Fact* 17:25–37. doi: 10.1021/acschembio.7b00359
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces genetics*, 2000, John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. ISBN 0-7084-0623-8
- Koshla O, Lopatniuk M, Rokytskyy I, Yushchuk O, Dacyuk Y, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Ostash B. (2017) Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA^{Leu}_{UAA} gene *bldA*. *Arch Microbiol* 199:1175–1183. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7
- Koshla O, Rokytskyy I, Ostash I, Busche T, Kalinowski J, Mosker E, Sußmuth R, Fedorenko V, Ostash B. (2019) Secondary metabolome and transcriptome of *Streptomyces albus* J1074 in liquid medium SG2. *Cyt Genet* 53:1–7. doi: 10.3103/S0095452719010080
- Koshla O, Yushchuk O, Ostash I, Dacyuk Y, Myronovskiy M, Jäger G, Süßmuth RD, Luzhetskyy A, Byström A, Kirsebom LA, Ostash B. (2019a) Gene *miaA* for post-transcriptional modification of tRNA_{xxA} is important for morphological and met-

- bolic differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 112:249–265. doi: 10.1111/mmi.14266
- Kuhl M, Rückert C, Gläser L, Beganovic S, Luzhetskyy A, Kalinowski J, Wittmann C. (2021) Microparticles enhance the formation of seven major classes of natural products in native and metabolically engineered actinobacteria through accelerated morphological development. *Biotechnol Bioeng* doi: 10.1002/bit.27818
- Lopatniuk M, Myronovskyi M, Luzhetskyy A. (2017) *Streptomyces albus*: a new cell factory for non-canonical amino acids incorporation into ribosomally synthesized natural products. *ACS Chem Biol* 12:2362–2370
- Lopatniuk M, Myronovskyi M, Nottebrock A, Busche T, Kalinowski J, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A. (2019) Effect of «ribosome engineering» on the transcription level and production of *S. albus* indigenous secondary metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7097–7110. doi: 10.1007/s00253-019-10005-y
- Makitrynskyi R, Tsypik O, Nuzzo D, Paululat T, Zechel DL, Bechthold A. (2020) Secondary nucleotide messenger c-di-GMP exerts a global control on natural product biosynthesis in streptomycetes. *Nucleic Acids Res* 48:158–1598. doi: 10.1093/nar/gkz1220
- Myronovskyi M, Rosenkränzer B, Nadmid S, Pujic P, Normand P, Luzhetskyy A. (2018) Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metab Eng* 49:316–324. doi: 10.1016/j.ymben.2018.09.004
- Ochi K. (2017) Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *J Antibiot* 70:25–40. doi: 10.1038/ja.2016.82
- Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braca AF, Méndez C, Slas JA. (2014) Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol* 7:242–256. doi: 10.1111/1751-7915.12116
- Okamoto-Hosoya Y, Hosaka T, Ochi K. (2003) An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 149:3299–3309. doi: 10.1099/mic.0.26490-0
- Pye C, Bertin M, Lokey R, Gerwick W, Linington R. (2017) Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:5601–5606. doi: 10.1073/pnas.1614680114
- Shima J, Hesketh A, Okamoto S, Kawamoto S, Ochi K. (1996) Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178:7276–7284. doi: 10.1128/jb.178.24.7276-7284.1996
- Tanaka Y, Komatsu M, Okamoto S, Tokuyama S, Kaji A, Ikeda H, Ochi K. (2009) Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* 75:4919–4922. doi: 10.1128/AEM.00681-09
- Westhoff S, van Leeuwe TM, Qachach O, Zhang Z, van Wezel GP, Rozen DE. (2017) The evolution of no-cost resistance at sub-MIC concentrations of streptomycin in *Streptomyces coelicolor*. *ISME J* 11:1168–1178. doi: 10.1038/ismej.2016.194
- Yung-Hun Y, Eunjung S, Eun-Jung K, Kwangwon L, Woo-Seong K, Sung-Soo P, Ji-Sook H, Byung-Gee K. (2009) NdgR, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 9:501–511. doi: 10.1007/s00253-008-1802-x

Надійшла в редакцію 29.04.21
Після доопрацювання 28.05.21
Прийнята до друку 18.01.22