

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет  
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Вторинні метаболіти бактерій роду *Streptomyces* та їхня роль  
у сучасній медицині**

Допущена до захисту

«\_\_»\_\_\_\_\_2024р.

Кваліфікаційна робота  
студентки кафедри  
молекулярної біології та біотехнології  
Іржавської Юлії Анатоліївни

Науковий керівник:  
Асистент Бондар Анастасія Юріївна

Науковий консультант:  
Проф. Зотчев Сергій Борисович,

Завідувач кафедри \_\_\_\_\_

Оцінка «\_\_\_\_\_»

«\_\_»\_\_\_\_\_2024 р.

Харків 2024

## АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Вторинні метаболіти бактерій роду *Streptomyces* та їхня роль у сучасній медицині»

Мета роботи: використовуючи отриману інформацією з сучасних наукових літературних джерел, дослідити морфологію, життєвий цикл і способи поділу *Streptomyces*; їх вторинні метаболіти, що використовуються в медицині.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз щодо властивостей та застосування вторинних метаболітів *Streptomyces*. Проаналізовано морфологію цих бактерій для кращого розуміння фізіології, що стоїть за виробленням вторинних метаболітів, їх прикладів (тетрациклін, ністатин, доксорубіцин, клавуланова кислота), біосинтетичних шляхів та генетичних маніпуляцій. Отримано розуміння сучасного використання вказаних прикладів та розвитку наукового розуміння біосинтетичних шляхів *Streptomyces*.

Останні дослідження в сучасних статтях надають відомості про активний інтерес науковців з усього світу до цих розповсюджених, але все одно не до кінця зрозумілих бактерій. Їх генетичний потенціал розкривається все більше з кожним новим інструментом і методом винайденим молекулярними біологами, біоінформатиками чи хіміками-органіками.

Робота включає 93 сторінки, містить 14 рисунків. Список використаної літератури містить 117 джерел, з них 117 – іноземні.

**Ключові слова:** вторинні метаболіти, *Streptomyces*, медицина, генетичні маніпуляції, *Actinobacteria*, антибіотики

## ANNOTATION

Qualification work on the topic: "Secondary metabolites of bacteria of the genus *Streptomyces* and their role in modern medicine".

The aim of the study is to investigate the morphology, life cycle and methods of division of *Streptomyces*; their secondary metabolites used in medicine using the information obtained from modern scientific literature. To achieve this goal, a literature review was conducted on the properties and uses of *Streptomyces* secondary metabolites. The morphology of these bacteria was analysed to better understand the physiology behind the production of secondary metabolites, their examples (tetracycline, nystatin, doxorubicin, clavulanic acid), biosynthetic pathways and genetic manipulation. An understanding of the current use of these examples and the development of scientific understanding of *Streptomyces* biosynthetic pathways is gained.

Recent research in contemporary articles provides information about the active interest of scientists from around the world in these widespread, but still not fully understood bacteria. Their genetic potential is being revealed more and more with every new tool and method invented by molecular biologists, bioinformaticians or organic.

The work includes 87 pages, contains 15 figures. The list of used literature contains 125 sources, of which 125 are foreign.

**Key words:** *secondary metabolites, Streptomyces, medicine, genetic manipulations, Actinobacteria, antibiotics*

## ЗМІСТ

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| АНОТАЦІЯ.....                                                                                         | 2  |
| ANNOTATION.....                                                                                       | 3  |
| ЗМІСТ .....                                                                                           | 4  |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....                                                                       | 5  |
| ВСТУП.....                                                                                            | 7  |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....                                                                      | 8  |
| 1. Бактерії роду <i>Streptomyces</i> : морфологія та життєвий цикл.....                               | 8  |
| 1.1. Введення в рід <i>Streptomyces</i> .....                                                         | 8  |
| 1.2 Морфологія виду <i>Streptomyces</i> .....                                                         | 12 |
| 2.1 Введення в вторинні метаболіти .....                                                              | 19 |
| 2.2. Застосування в медицині: антибактеріальні, протигрибкові, протиракові.....                       | 22 |
| 2.2.1. Антибактеріальні метаболіти. ....                                                              | 22 |
| 2.2.2 Протигрибкові метаболіти .....                                                                  | 26 |
| 2.2.3 Протиракові метаболіти .....                                                                    | 29 |
| 2.3 Додаткові використання вторинних метаболітів <i>Streptomyces</i> .....                            | 31 |
| 3. Біосинтез вторинних метаболітів у <i>Streptomyces</i> .....                                        | 34 |
| 3.1 Введення у біосинтез вторинних метаболітів.....                                                   | 34 |
| 3.2 Кластери генів біосинтезу.....                                                                    | 39 |
| 3.3 Приклади шляхів біосинтезу в <i>Streptomyces</i> .....                                            | 46 |
| 3.3.1 Тетрацикліни .....                                                                              | 46 |
| 3.3.2 Клавуланова кислота .....                                                                       | 49 |
| 3.3.3 Ністатин .....                                                                                  | 53 |
| 3.3.4. Доксорубіцин .....                                                                             | 57 |
| 4. Генетичні маніпуляції кластерів генів біосинтезу для отримання нових<br>вторинних метаболітів..... | 59 |
| 4.1 Геномне дослідження (Genome Mining) .....                                                         | 59 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 4.2 Інженерія генетичних маршрутів .....       | 63 |
| 4.3. Досягнення у генетичній модифікації ..... | 69 |
| ВИСНОВКИ .....                                 | 74 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....               | 76 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

GTP – гуанозин тетрафосфат

SCBs - *Streptomyces coelicolor butanolides*

PCD – програмована клітинна смерть

ПП — природні продукти

SMGCs - кластери генів для вторинних метаболітів

ГКБ — генетичні кластери біосинтезу

DBTL - проектування (design), конструювання (build), тестування (test) та навчання (learn)

NRPS — нерибосомні пептидні синтетази

PKS – полікетидсинтаза

CSR - Cluster-Situated Regulator (регулятор, розташований в кластері)

GBL - гамма-бутиролактон

TCS – системи двокомпонентного сигналу

ECF - екстрацитоплазматичні сигма-фактори

NGS – секвенування нового покоління

SGS – секвенування другого покоління

CTC – хлортетрациклін

OTC – окситетрациклін

TC – тетрацикліновий скелет

АМТ - амілотрансфераза

АТС - ангідротетрацикліну

SARP - *Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein*

СА, КК – клавуланова кислота

CEAS - N<sup>2</sup>-(2-карбоксietил)-аргінінсинтаза

STR - (Stirred Tank Reactor) біореактор з перемішуванням.

ТКДГ - тімідин дифосфат-4-кето-6-дезоксид-глюкозу

BGC - кластер біосинтетичних генів

smBGC – мовчазні біосинтетичні генетичні кластери

NHEJ - негомологічне з'єднання кінців

HDR - гомологічне відновлення

G3P - гліцеральдегід-3-фосфату

1,3-BPG — 1,3-дифосфогліцерат

MSGE - мультиплексна сайт-специфічна геномна інженерія

aMSGE - розширена мультиплексна сайт-специфічна геномна інженерія

SSR - сайт-специфічна рекомбінація

## ВСТУП

Як відомо, початковою метою біотехнології було саме винайдення біологічно чистих речовин, що будуть не менш дієвими, ніж хімічні. Тому очевидно, що й сьогодні в усіх напрямках цієї дисципліни цей пошук не припиняється.

Вторинні метаболіти мікроорганізмів — це важливе і майже невичерпне джерело рішень різноманітних проблем людства, особливо медичних. Однак вивчити властивості усіх можливих мікроорганізмів неможливо, і тому на допомогу приходять стрептоміцети. Цей рід мікроорганізмів відомий своєю географічною розповсюдженістю та різноманітністю вторинних метаболітів, які вони можуть виробляти. Стрептоміцети є найбільш поширеним у навколишньому середовищі родом бактерій, які здатні виробляти різноманітні та цінні натуральні продукти зі значною біологічною активністю в медицині, екології, харчовій промисловості та агрономії. Вони гнучкі до генетичних маніпуляцій, порівняно прості у культивуванні і в кількості вироблених ними антибіотиків майже не мають конкурентів.

Тому метою цієї роботи було, використовуючи отриману інформацію з сучасних наукових літературних джерел, дослідити морфологію, життєвий цикл і способи поділу *Streptomyces*; їх вторинні метаболіти, що використовуються в медицині.

Завдання роботи: Проаналізувати сучасну наукову літературу стосовно морфології бактерій *Streptomyces*, детально дослідити вторинні метаболіти, що для них властиві, особливості, що використовуються в медицині, біосинтетичні шляхи та генетичні маніпуляції для отримання нових метаболітів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1. Бактерії роду *Streptomyces*: морфологія та життєвий цикл

#### 1.1. Введення в рід *Streptomyces*

Актинобактерії — унікальний за своєю розповсюдженістю та різноманітністю тип бактерій, до якого й належить рід *Streptomyces*. Це грам-позитивні бактерії, особливістю яких є дуже великий вміст G+C, а також багато з яких має міцеліальний життєвий цикл та складну диференціацію. Як вже було сказано, цей тип бактерій дуже різноманітний за місцем проживання. Це і пустелі, і ґрунти (у тому числі надсолоні), і вапняки, солоні і прісні води, і навіть жерла вулканів. Вони мають ще й величезний спектр екологічних ролей. Серед них патогени, ґрунтові мешканці, рослинні коменсали, шлунково-кишкові коменсали.

Актинобактерії це ще й дуже великий тип, що представляє собою найбільшу таксономічну одиницю серед вісімнадцяти ліній, що наразі визнані належними до домену Бактерій. Він включає 5 підкласів, 6 порядків і 14 підрядів [1]. За гіпотезою вчених, відкрито тільки 10% актиноміцетів у світі [2]. У той же час, кількість резистентних до антибіотиків патогенів зростає через недбале використання людьми цих медикаментів і еволюцію бактерій, і саме це робить найбільш цікавим відкриття нових мікроорганізмів. Справа в тому, що кожна біоактивна речовина має свого «виробника» серед мікроорганізмів, і з цього виходить, що для відкриття ще невідомих біоактивних сполук потрібні нові мікроорганізми. Без сумніву, можна скористатися для надання нових властивостей генною інженерією, проте це дорожче за культивуацію мікроорганізмів, що мають вже потрібні гени.

Актинобактерії виробляють дві третини від усіх антибіотиків, що наразі використовуються в актуальній медицині. І навіть більшість антибіотиків було вперше видобуто з бактерій цього типу, особливо багато з *Streptomyces*. [3].

Після завершення золоті ери антибіотиків, мікроорганізми дали можливість відродити розвиток і вдосконалення цих медикаментів. Стало це можливим завдяки секвенуванню геному та впливаючому з нього аналізу геному. Наприклад, у 2002 році була вперше опублікована генетична послідовність *Streptomyces*, а саме модельної бактерії *Streptomyces coelicolor*. (рис. 1) Виявилось, що він має 22 кластери генів вторинних метаболітів, проте виробляє лише чотири види, якщо говорити про стандартні лабораторні умови. На момент 2019 року було доступно 625 послідовностей бактерій роду *Streptomyces*,[4]. і лише 10% їх генетичного потенціалу використовується сьогодні [5]. Якщо додати це до вже вказаного проценту невідкритих особин, можна зрозуміти наскільки великий потенціал нас чекає при подальшому дослідженні і відкритті нових методів стимуляції експресії генів.

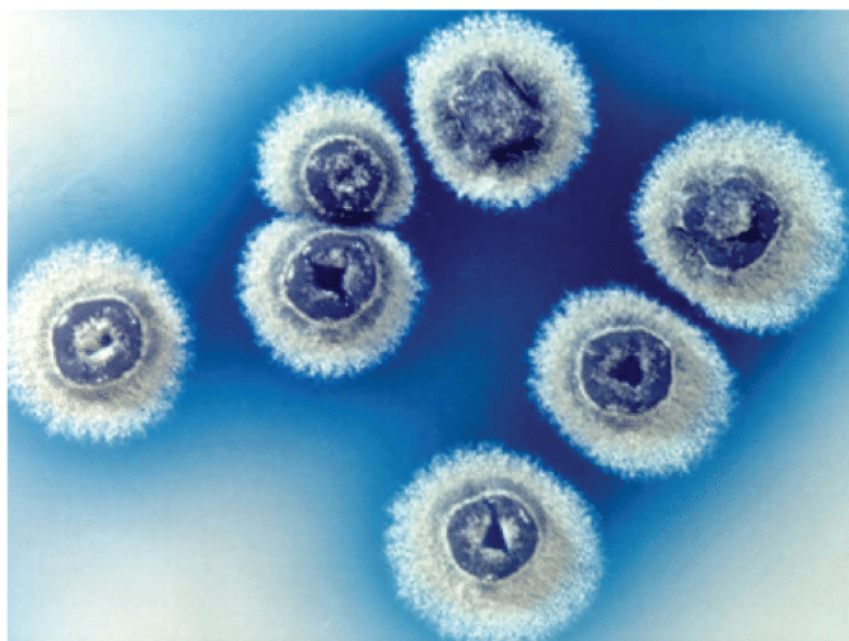


Рис. 1. Колонії *Streptomyces coelicolor* A3(2). Нечітка поверхня цих пліснявих колоній складається з надземних гіф, що несуть ланцюжки спор (фото, KF Chater).

Окрім антибіотиків, *Actinobacteria* ще можуть продукувати протипухлинні, антигельмінтні та протигрибкові засоби. Для розробки протинематодного засобу, було секвеновано послідовності двох видів *Streptomyces*, *Streptomyces spectabilis* KCTC9218 та AN091965. Їх користь полягає в тому, що вони виробляють спектинабілін, що і бореться з нематодами. До цього широко використовувався авермектин, видобутий з *Streptomyces avermitilis* у 1978 році, в Японії, і у 2020 році його ринок досяг 850 мільярдів доларів США [6]. Що стосується антигрибкових засобів, то майже 20 видів *Streptomyces* можуть виробляти високоефективні антигрибкові засоби. Що стосується протиракових засобів, то активно досліджуються екстремофільні бактерії *Streptomyces* на наявність вторинних метаболітів з такими можливостями. Успішні протипухлинні сполуки, отримані з *Actinobacteria*, включають антрацикліни, блеоміцин, мітозани та ендіїни. Інші відомі біологічно активні сполуки, виявлені в актинобактеріях, включають рапаміцин і такролімус (імуносупресори), мільбеміцини (антипаразитарні засоби).

Однак використовуються вони не тільки в класичній медицині, а й ветеринарії, в біотехнології і в екології. Активно досліджуються і використовуються не тільки вторинні метаболіти, а й геном.

Трохи дослідивши тип *Actinobacteria*, можна перейти до *Streptomyces*. Цей рід, що належить до сімейства *Streptomycetaceae*, був представлений вперше у 1943, вченими Waksman і Henrici [7]. Є припущення, що вперше цей рід з'явився 400 мільйонів років тому і навіть брав участь в утворенні первісного ґрунту. Це стало можливим завдяки тому, що вони можуть розчиняти компоненти клітинної стінки рослин, грибів і комах. Ця екологічна роль, що збереглася протягом еволюційного часу, відобразилася на рівні геному: наприклад, *Streptomyces reticuli*, який особливо активний у деградації целюлози, має приблизно 456 генів для білків, залучених до зв'язування, деградації та використання целюлози та інших складних і простих вуглеводів. [8].

Стрептоміцети, на відміну від інших бактерій, мають довгу історію еволюційного зв'язку з грибами. Для ефективного харчування клітинними грибними стінками, стрептоміцети, наприклад відомий серед дослідників і найпопулярніший *Streptomyces coelicolor*, створили і розвинули в собі різноманітні шляхи регулювання та їх споживання. Той самий *S. coelicolor* має принаймні 13 хітиназ, які контролюються важливим глобальним регулятором DasR. Цей регулятор координує багато аспектів життєдіяльності *Streptomyces* реагуючи на особливі молекули, які специфічні тільки для хітину. Додатково є активні молекули, що регулюються окремо від DasR у *S. Coelicolor* — дві хітозанази та спеціальна система для поглинання олігоглюкозаміну [8].

*Streptomyces* це єдиний рід *Streptomycetes*, але найбільший серед *Actinobacteria*. Як і у інших представників типу, у них також GC дуже великий відсоток, досягаючи більше 70%. Станом на січень 2023 було описано 699 видів, однак на сьогоднішній день їх очевидно більше, через великий інтерес до цього виду. [9]. Їх особливістю є те, що вони виробляють шар надземних гіф, що можуть диференціюватися в ланцюгові спори.

Цей рід являє собою ниткоподібні, хемоорганотрофні бактерії, і ростуть в тих самих місцях, що й гриби. Діаметр і бактерій, і спор дуже маленький — може бути меншим 1 мкм. Утворюються ті самі спори фрагментацією ниток, а виглядають як прямі, хвилясті або спіральні ланцюжки. Взагалі ці види за загальними характеристиками нерухливі, позитивні при тесті на каталазу, спроможні відновлювати нітрати до нітритів і розкладати аденін, ескулін, казеїн, желатин, гіпоксантин, крохмаль і тирозин. Стрептоміцети не містять міколевої кислоти, але багаті насиченими ізо- та антиізо-жирними кислотами. Вони також містять гекса- або октагідровані менахінони з дев'ятьма ізопреновими залишками. Ліпідні структури стрептоміцетів зазвичай складні та полярні та включають дифосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол і фосфатидилінозитол манозиди. [10; 11].

Що стосується загальних характеристик розвитку колоній цього роду, то ростуть вони зазвичай повільно, супроводжується ріст запахом ґрунту, причиною чого є леткий метаболіт геосмін. На перших етапах колонії гладенькі, але пізніше, внаслідок виходу повітряного міцелію, структура стає волокнистою, зернистою, порошкоподібною чи навіть оксамитовою. Точних характеристик за кольором у повітряного міцелію немає — це залежить від пігментів у кожного окремого виду [12, 13].

Хоча Стрептоміцети і можуть жити у диких, і навіть екстремальних умовах, у них все одно є певні межі, яких потрібно притримуватися в залежності від виду. Це і стало причиною того, що паралельно вивчаються не тільки види, а й різноманітні екологічні ніші, і, наприклад, ґрунтове середовище можна вважати чи не найкращим для стрептоміцетів — вони займають у ньому 40% серед інших мікроорганізмів. І вони не просто там живуть — ниткоподібна структура цих бактерій захищає ґрунт від висихання та видування [14].

Загальна кореляція між глибиною та кількістю цих мікроорганізмів є настільки позитивною, що їх знаходили навіть серед реголіту. Розподіл *Streptomyces* у воді та ґрунті залежить від харчових обставин температури, рН, вологості, солоності, текстури ґрунту та клімату. Хоча ґрунт і є найрозповсюдженішим середовищем для стрептоміцетів, але не єдиним і серед інших сприятливих місць існування можливі: сіно та інші органічні матеріали, прісне та солоне водне середовище, рослини і, нарешті, тварини і люди. З розуміння місць існування виходить і розуміння деяких можливостей цих мікроорганізмів — наприклад, розкладання багатьох матеріалів, в тому числі пластику, патогенність для рослин, слабка патогенність для людей і тварин і біологічний контроль. Ендоефіти *Streptomyces* виробляють різні антагоністи збудників хвороб рослин і шкідників, таких як бактерії, гриби та комахи, що стало одною з давніх адаптивних переваг, які можна використовувати для

сільськогосподарського та медичного використання в сучасному світі. Окрім того, внаслідок спостереження було виявлено, що при вирощуванні на агарі гіфи спричиняють лізис інших бактерій, а значить вони можуть бути ще й хижаками, що додає їм екологічних ролей та можливостей в якості ендосита [1; 10].

## 1.2 Морфологія виду *Streptomyces*

Якщо повертатись в історію, то можна згадати, що перші бактерії *Actinobacteria*, а вони були саме роду *Streptomyces*, були визначені за допомогою морфологічних ознак, які тут будуть розглянені. На рисунку 2 ми можемо побачити типи спороносної структури у стрептоміцетів, що різняться в залежності від виду стрептоміцета. Загальною характеристикою міцелію *Streptomyces* є високий рівень диференціації та розгалуження.(рис. 2). Спори у стрептоміцетів виростають з повітряного міцелію, який вони можуть утворювати, на відміну від мікобактерій та родококів, що відносяться до того ж типу [15; 16].

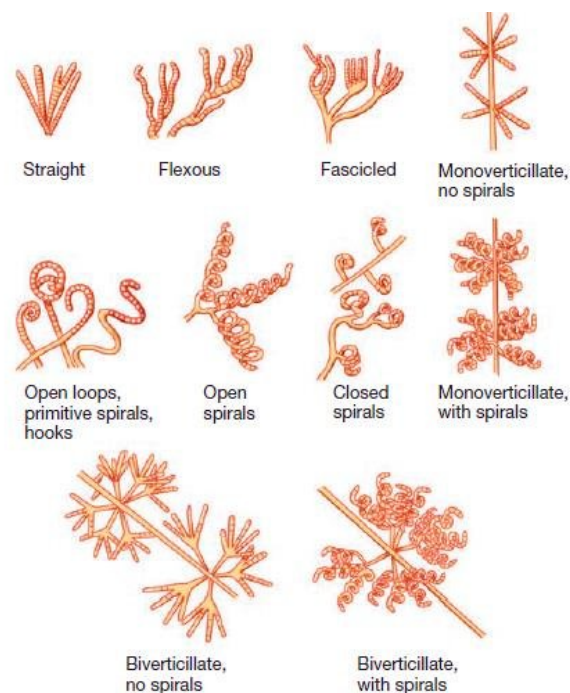


Рис. 2. Тип спороносної будови стрептоміцетів

Спорові ланцюжки *Streptomyces*, як і деяких інших родів (*Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* та деяких *Nocardia*) доволі довгі, досягаючи ста спор у ланцюгу. Взагалі ниткоподібні бактерії типу *Actinobacteria* мають два види поділу — поділ зростаючих гіф на багатоклітинні компартменти через поперечні стінки та септація і вивільнення одноклітинних спор. У формуванні поперечної стінки та компартменталізації гіф у бактерій *Streptomyces* беруть участь специфічні фактори, деталі і механізми яких в значній мірі залишаються невідомими. Процеси, пов'язані з розвитком *Streptomyces*, є складними та унікальними, і дослідження їх молекулярної основи представляє навіть сьогодні значущий виклик та інтерес для науковців [16, 9].

Основу обох процесів поділу клітин у бактерій, включаючи *Streptomyces*, закладає консервативний білок клітинного поділу FtsZ. Він грає ключову роль у формуванні структурного елемента, відомого як Z-кільце, що має у процесі поділу каркасну функцію для організації і збору компонентів дівізоми, в яку включаються різноманітні ензими та білки, відповідальні за поділ клітини. Z-кільце утворюється завдяки збиранню молекул FtsZ в кільцеподібну структуру в районі майбутнього регіону поділу клітини. Один із основних процесів, контрольованих Z-кільцем, - це синтез септального пептидоглікану. Саме він і є структурним елементом, що утворює клітинну стінку і допомагає визначити місце та спосіб поділу клітин. Варто також зазначити, що проведені дослідження довели — жоден з білків, необхідних для клітинного поділу, не необхідний для загального розвитку та життєвого циклу *Streptomyces*. Проте, виявлено, що видалення генів, пов'язаних із поділом ядра клітини, таких як *ftsQ*, *ftsL*, *divIC*, *ftsW* або *ftsI*, має експресійний вплив на процес розділення та споруляції [9].

Деякі бактеріальні угруповання, які знаходяться в ґрунті, такі як *Actinomyces*, *Streptomyces* і *Micromonospora*, проходять диференціацію, утворюючи сплячі грибоподібні унінуклеоїдні спори, відомі як артроспори або

екзоспори. Важливо відзначити, що артроспори мають значні відмінності в порівнянні з ендоспорами бацил та клостридій за їхньою морфологією та функціями. На відміну від ендоспор, які відзначаються вражаючою стійкістю до різноманітних впливів навколишнього середовища, таких як тепло, висихання та ультрафіолетове випромінювання, артроспори виявляють свою здатність до виживання в суворих умовах через наявність багат шарових поверхневих структур і надзвичайно низького вмісту води. Саме тому артроспори у стрептоміцетів порівнюють скоріше зі спорами грибів, ніж бактерій, що може бути результатом конвергентної еволюції в ґрунтовому середовищі. Наприклад, види *Penicillium* утворюють конідієносці, аналогічні надземним гіфам стрептоміцетів, які несуть окремо звужені конідіоспори. Як стрептоміцети, так і цвілеві гриби виробляють велику кількість дрібних гідрофобних спор з подібними характеристиками. Її ті, й ті мають, наприклад, відносно товстий захисний шар, що включає різні захисні молекули, такі як цукри (наприклад, трегалозуфф), і білки теплового шоку. Спори цих організмів не лише захищають генетичну інформацію під час несприятливих умов, але також адаптовані для розповсюдження вітром і можуть залишатися в повітрі тривалий час [16, 9, 17].

Комплексна структура колонії *Streptomyces* характеризується багатоядерними розгалуженими міцеліями, а також диференціацією колонії на вегетативні та репродуктивні структури. Ця складна багатоклітинна морфологія колись вводила мікробіологів в оману, і вони вважали, що актиноміцети, до яких належить *Streptomyces*, можуть бути грибами або посередніми ланками між грибами та бактеріями. Проте сучасні наукові дослідження однозначно підтверджують, що стрептоміцети є прокаріотами. Яскрава особливість вегетативних гіф стрептоміцетів полягає в тому, що вони ростуть за рахунок подовження вершини, що дуже відрізняє їх від звичайних одноклітинних бактерій, таких як *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*, де подовження клітин

відбувається за рахунок введення нового матеріалу в бічну стінку. Експоненційний ріст вегетативних гіф досягається завдяки комбінації подовження вершини та розгалуження. Ця унікальна особливість робить стрептоміцети рідкісним прикладом багатоклітинних бактерій, кожен відділ яких містить кілька копій хромосоми. Розташування вегетативних перегородок значно варіюється між різними видами стрептоміцетів і в межах окремих видів за різних умов росту та вікових стадіях міцелію [18].

### 1.3. Життєвий цикл

Серед живучих в ґрунті бактерій поширені різні стратегії розвитку, і *Streptomyces* мають теж свій унікальний шлях.

Варто зазначити, що морфологічний розвиток *Streptomyces* є результатом несприятливих умов. По перше, це брак поживних речовин і, насамперед, азоту, вуглецю та гуанозин тетрафосфату (GTP) — це найчастіший привід для споруляції цих бактерій. Більш детальний аналіз транскриптому повного геному групи сигнальних молекул, відомих як SCBs або бутаноліди *S. coelicolor*, дав змогу виявити, що система  $\gamma$ -бутиролактону має значущий регуляторний вплив на морфологічну диференціацію бактерій. Це свідчить про те, що певні сигнальні молекули грають ключову роль у визначенні форми та структури клітин *Streptomyces* під впливом зовнішніх чинників. Крім того, мікробні взаємодії, такі як хижацтво (живлення іншими мікроорганізмами) та конкуренція за ресурси в природному середовищі, можуть впливати на диференціацію *Streptomyces*, що підкреслює складність факторів, що визначають його розвиток, як і будь-якого іншого організму. Ці взаємодії та регуляційні механізми важливі для розуміння та керування процесами морфологічної диференціації у *Streptomyces*, що може мати практичне значення в контексті виробництва біологічно активних речовин, таких як антибіотики. [1,9].

Класичний шлях розвитку *Streptomyces* поділяється на три етапи(рис. 3).

Він розпочинається з проростання спор, які виходять із сплячого стану. Ці трубчасті структури, відомі як проростки, зростають у напрямку полюсів на гіфних кінчиках, при цьому додаткові гілки виходять з боків на випадкових інтервалах. Постійні цикли полюсного росту та гілкування призводять до формування густої мережі ниток, що отримала назву вегетативного міцелію. Цей міцелій, подібно до кореневої системи рослин (але сам міцелій не аналогічний корінню!), відповідає за закріплення колонії стрептоміцетів на підстраті. Ріст у напрямку полюсів контролюється білковим комплексом "поляріз", який важливий для притягнення необхідних компонентів для синтезу пептидоглікану в кінці міцелію. Під час вегетативного росту хромосоми стрептоміцетів реплікуються, і утворюються багатоядерні гіфи, обмежені випадковими перегородками. Однак цей етап розвитку досліджений найменше порівняно з іншими [19, 22].

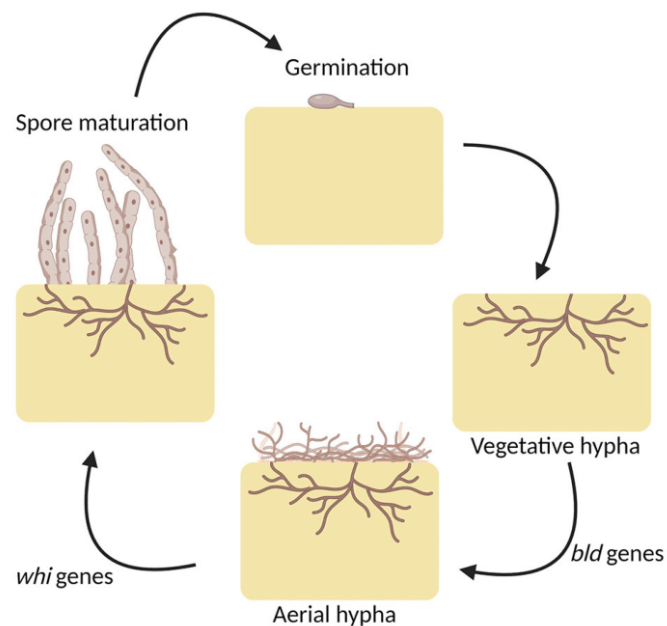


Рис. 3. Життєвий цикл стрептоміцетів.

Класичний шлях розвитку *Streptomyces* поділяється на три етапи. Він розпочинається з проростання спор, які виходять із сплячого стану. Ці трубчасті

структури, відомі як проростки, зростають у напрямку полюсів на гіфних кінчиках, при цьому додаткові гілки виходять з боків на випадкових інтервалах. Постійні цикли полюсного росту та гілкування призводять до формування густої мережі ниток, що отримала назву вегетативного міцелію.

Коли стрептоміцети зазнають дефіциту поживних речовин, вони входять у другий етап свого життєвого циклу. У стрептоміцетах, як і у багатьох актинобактеріях, після формування міцелію спостерігається вертикальний розвиток ниток, відомих як повітряна гіфа. Повітряна гіфа утворює мережу на поверхні колонії бактерій, ламаючи поверхневий шар і виходячи у повітря, де росте. Під час контрольованого клітинного поділу повітряна гіфа поділяється на ланцюги незрілих спор, які пізніше розповсюджуються та формують міцелій. Міцелій, що виростає в повітряні гіфи, є значним джерелом поживних речовин, які активуються за допомогою екстрацелюлярних протеаз. Це дозволяє конвертувати міцелій у мільйони спор для оптимального виживання. Фізична підтримка гіфи забезпечується амфipатичними білками і пептидами, такими як чапліни та родліни, а також пептиди SapB та SapT, що допомагають правильному повітряному росту. Гідрофобна оболонка, відома як шар родлет, є ключовим елементом орієнтації повітряного росту. Такий шар, який утворюється за рахунок самоорганізації білків, наприклад гідрофобінів, сприяє розвитку гіф у повітрі. Цей перехід від гілкування до гідрофобного повітряного росту вимагає дії специфічних регуляторів, відомих як гени *bld*, що отримали свою назву через те, що мутанти цих генів мають "голий" фенотип, тобто вони не розвивають характерних повітряних гіф. Після завершення повітряного росту, довгі багатоядерні філати диференціюються у ланцюги одноядерних компартментів передспорового стану, які подальше дозрівають, утворюючи сплячі зерна. Перехід від повітряного гіфного росту до споруляції вимагає регуляції генів *whi*, які отримали свою назву через те, що їхні мутанти не утворюють пігменту, характерного для зерен дикого типу [20, 21, 22, 23].

У життєвому циклі стрептоміцетів відбувається два етапи програмованої клітинної смерті (PCD), які вирішально впливають на розвиток цих мікроорганізмів. Перший етап настає після проростання спори, коли вегетативний міцелій росте та потім починається PCD, впливаючи на матеріал, що утворився в процесі раннього вегетативного росту. Другий етап PCD розпочинається під час розвитку, коли вегетативні гіфи розпадаються, надаючи поживні речовини для наступного етапу - росту повітряного міцелію. Повітряні гіфи надають колоніям характерний пухнастий вигляд і, в кінцевому підсумку, диференціюються для утворення ланцюгів унігеномних спор. Регулятор DasR відіграє ключову роль у цьому процесі, реагуючи на сигнали клітинної смерті та контролюючи ранні етапи розвитку та виробництво вторинних метаболітів. Крім того, важливу роль в PCD та розвитку грають екстрацелюлярні протеази та їх інгібітори, що визначається великим кількістю факторів, включаючи індукцію різних генів залежно від умов оточення. [24].

Останніми часами вчені виявили, що *Streptomyces* може мати варіанти етапів життєвого циклу, що виходять поза межі класичного циклу життя завдяки новому типу росту, який називають "дослідження" (за їхню здатність приймати нерозгалужену вегетативну конформацію гіф). Цей процес виявлено під час спільного культивування *Streptomyces venezuelae* з дріжджами, що імітує полімікробні спільноти в ґрунті. «Дослідницький» ріст відбувається у відповідь на гриби та метаболічні сигнали інших мікроорганізмів, і включає швидке поширення колоній *Streptomyces* по твердих поверхнях, таких як агар, пластик і камінь. Під час «дослідницького» росту клітини розвиваються як негілкові вегетативні гіфи, і завдяки цьому розвиток протікає швидше, більш ніж в 10 разів перевищуючи швидкість вегетативного росту.

У нас вже є значні досягнення в розумінні ролі генів *bld* та *whi*, які вже згадувались у цій роботі, в регулюванні переходів між різними канонічними етапами життєвого циклу. Проте «дослідження» не потребує прямого впливу

цих регуляторів, і науковці лише на початкових етапах розуміння, які сигнали та гени взаємодіють у контролі за цим незвичайним явищем [22].

Таким чином, у цьому розділі були досліджені будова, життєвий цикл та морфологія. Ці знання потрібні, щоб розуміти чого очікувати від цих бактерій, в яких умовах вирощувати і які ще відкриття можуть на нас очікувати. Стрептоміцети, завдяки своїй різноманітності, дуже багатообіцяючий об'єкт, що й доведуть наступні розділи.

## **2. Вторинні метаболіти від *Streptomyces* та їх застосування в медицині**

### **2.1 Введення в вторинні метаболіти**

Передусім варто отримати розуміння що таке вторинні метаболіти і яку роль вони відіграють у життєдіяльності. Вторинні метаболіти — це натуральні продукти життєдіяльності, що виробляються різними біоб'єктами, серед яких найрозповсюдженішими є мікроорганізми [25]. З хімічної точки зору, це молекули низької молекулярної маси, що різняться між собою за хімічною структурою та біологічною активністю. Причиною того, що вони були названі «вторинні» стало те, що їх виробництво не є необхідним для основних життєвих процесів організмів, на відміну від первинних метаболітів [26]. Однак зараз ці метаболіти більш правильно називати у науковому середовищі "спеціалізованими метаболітами", оскільки вони відіграють ключову роль у виживанні і взаємодії з навколишнім середовищем для організмів, які їх виробляють. Саме спеціалізовані метаболіти роблять мікроорганізм конкурентоспроможним і більш стійким до несприятливих умов. В біотехнології ж виробництво спеціалізованих метаболітів є активним напрямком досліджень. Окрім біотехнологів, цей напрямок цікавий і для хіміків-органіків, молекулярних біологів і біоінформатиків [27].

Ці молекули синтезуються наприкінці стаціонарної фази росту мікроорганізму, перед фазою старіння і смерті, коли умови стають максимально несприятливими для подальшого розвитку. З цього можна зробити висновок, що для штучної активації виробництва вторинного метаболіту необхідно знизити кількість однієї чи кількох поживних речовин. Це свідчить про те, що вторинні метаболіти за своєю природою є реакцією на стресові умови та виснаження ресурсів. [28].

У спеціалізованих метаболітах також нерідко можуть міститися різні хімічні елементи, що відповідають за біоактивність, що також називається «біоактивна особливість». Ця особливість може бути реактивною і структурною. Реактивні особливості — це функціональні групи з реактивністю, що може призводити до зв'язування з білком. Структурні ж особливості важливі для зв'язування з мішенню [29].

Багато з ідентифікованих вторинних метаболітів мають антибіотичну активність, що робить їх хазяїв ефективними у конкуренції за ресурси в природному оточенні. Ці молекули відіграють важливу роль в екології, здатності адаптації мікроорганізмів до змін у навколишньому середовищі, а також мають значення у сфері медицини, харчової промисловості та інших галузях [29].

Початковою метою дослідження вторинних метаболітів було саме віднайдення нових, більш інвайроментально нешкідливих гербіцидів, ліків, інсектицидів і такого іншого. Першим кроком став всесвітньо відомий пеніцилін, і з тих пір було відкрито більше ніж 23 тисячі вторинних метаболіти. [31]. З цих досліджень зазвичай виділяють три періоди досліджень [32].

**1940-1970 рр:** Під час Другої світової війни пеніцилін став важливим проривом в медицині, врятувавши тисячі поранених. Дослідження проведені після цього важливого кроку, у тому числі пошук актинобактерій, призвели до ще багатьох відкриттів вторинних метаболітів, в тому числі стрептоміцину. Це

спонукало фармацевтичні компанії проводити подальший скринінг метаболітів, в пошуках антибактеріальної активності. [31]. Їх дії включали такі етапи, як отримання мікроорганізмів, ферментацію, ізоляцію продуктів та тестування їх на активність. Цей підхід призвів до виявлення понад 1000 природних продуктів з антимікробною дією, що отримали місце в медичному використанні.

**1970-2000 рр.:** Протягом наступних 30 років від початку відкриття природних продуктів (ПП), процеси їхнього виробництва залишалися майже незмінними, лише з деякою мініатюризацією та поліпшенням в проведенні аналізів. Однак відзначається значне розширення методів скринінгу в цей період. Розвиток методів рекомбінантної ДНК та інших технологій дозволив швидко вивчати механізми дії ПП, що призвело до виникнення цільових досліджень та фенотипічних методів скринінгу. Розуміння регуляції клітинного циклу та інших біологічних аспектів сприяло розвитку селективних скринінгів [32, 33].

**2000 — сьогодні:** У ранні 2000 роки виявлено, що геноми стрептоміцетів містять значно більше кластерів генів для вторинних метаболітів (SMGCs), ніж можна було передбачити раніше, особливо це стосується інших стрептоміцетів із великими геномами. Близько 10% SMGCs виявляються під час звичайних аналізів ферментації, інші вимагають спеціальних умов. З використанням доступних геномних послідовностей та передових методів аналітики та біоінформатики тепер можна передбачати нові вторинні метаболіти. Удосконалені технології синтезу ДНК і клонування дозволяють швидко вносити нові гени SMGC у бактерій-господарів для високоврожайної продукції нових сполук [32].

## 2.2. Застосування в медицині: антибактеріальні, протигрибкові, протиракові

### 2.2.1. Антибактеріальні метаболіти.

### 2.2.1.1. Тетрациклін

Тетрацикліни — це один з класів антибіотиків, чий механізм дії — це пригнічення біосинтезу білку. Вони мають дуже широкий спектр бактерій-продуцентів — грампозитивні та грамнегативні бактерії, паразити і навіть внутрішньоклітинні організми. Тетрацикліни мають дуже різноманітний спектр антибактеріальної дії, проте навіть серед них виділяється антибіотик — сарециклин, що має дуже вузьку спеціалізацію [34].

Загальна структура тетрациклінів включає у себе чотири бензольні кільця, які лінійно конденсовані у гідронафтаценове ядро (рис. 4). Важливі відмінності між різними представниками цього класу обумовлені наявністю замісників у позиціях C5, C6, C7 і C9. Ці замісники впливають на характеристики та властивості кожного окремого тетрацикліну, надаючи їм унікальні хімічні властивості та біологічну активність [35].

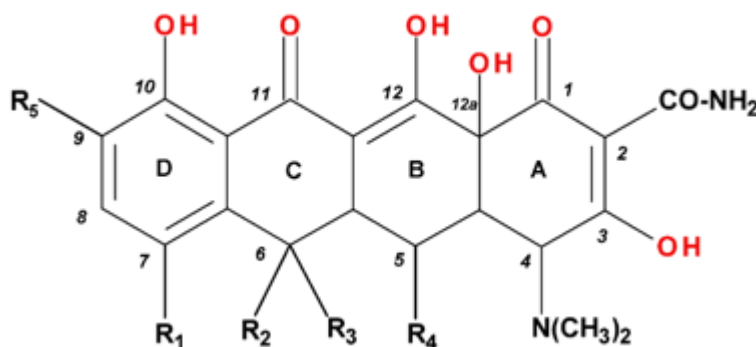


Рис. 4. Хімічна структура тетрацикліну

Антрополог Джордж Армелагос виявив тетрацикліни у 1600-річній нубійській мумії, офіційне ж відкриття цих антибіотиків відбулось у 1948. У 1980 році студентка Дебра Мартін виявила тетрацикліни у мумії, використовуючи флуоресцентний мікроскоп. Це свідчить про знання давніми африканськими культурами про антибіотики чи, принаймні, у тому що вони помітили ці властивості або вживали не усвідомлюючи. В будь-якому разі, у подальших дослідженнях тетрацикліни виявлені в інших муміях з Єгипту, Судану та Йорданії. У 2010 році мас-спектрометрія підтвердила наявність

тетрацикліну в кістках дитини з нубійського кладовища. Є ймовірність, що нубійці вирощували своє зерно в умовах, сприятливих для продукції тетрациклінів і розмноження *Streptomyces*, що їх виробляють. [36].

Під час Другої світової війни антибіотики були рідкісним ресурсом. Александр Флемінг відкрив пеніцилін у 1928 році, але його виробництво залишалося обмеженим. Тому виникла потреба у нових вторинних метаболітах з такими ж властивостями, і у 1943 році Бенджамін Даггар відкрив новий антибіотик — ауреоміцин — у *Streptomyces aureofaciens* (запатентований у 1948). До речі, для пошуку нових сполук він використовував незаймані ґрунти, що є гарною ілюстрацією того, що на нас може чекати при подальшому дослідженні екології та відкритті нових місць на Землі [37].

В той же час Александр Фінлей у Pfizer знайшов інший вид бактерії, *Streptomyces rimosus*, який виробляв активну сполуку, відому як терраміцин. Pfizer і Lederle Laboratories (в якій працював професор Даггар) змагалися за розробку тетрациклінів, що призвело до тривалої конкуренції, включаючої судові тяжби та шпигунство. Великі втрати, зокрема для American Cyanamid, виникли через крадіжку секретних документів та бактеріальних культур [38].

Проте, повертаючись до самого антибіотику, варто сказати, що його механізм дії призводить до знищення бактерій, і, таким чином, вони відносяться до бактеріостатичних. Це відбувається наступним чином. Процес синтезу білку, необхідний для клітин, включає використання рибосом, які перетворюють інформацію з мРНК на білок. У бактерій цей процес відбувається на рибосомах 30S і 50S. Тетрацикліни специфічно впливають на субодиницю рибосоми 30S у бактеріях, заважаючи формуванню комплексу мРНК-рибосома та зв'язуванню аміноацил-тРНК [39].

Зростає занепокоєння стосовно поширення резистентності бактерій до тетрациклінів завдяки наявності генів резистентності у плазмідах чи транспозонах. Механізми резистентності включають зміни в рибосомальних

білках, тим самим знижуючи розпізнавання антибіотиком, що дозволяє бактеріям синтезувати білки незважаючи на наявність тетрацикліну, або також варіантом адаптації є ефлюксійні насоси, які виводять антибіотик з клітини. Інші механізми, такі як модифікація тетрацикліну, також можуть сприяти резистентності. Це робить тетрацикліни менш ефективними, і лікарям слід бути обережними при їх використанні, враховуючи можливість розвитку резистентності у бактерій [40].

Варто сказати, що ефлюксійні насоси більш розповсюджені, як захист, і їх активність збільшується. Експресія генів, що кодують ці насоси, може бути регульована різними механізмами, включаючи позитивні та негативні регулятори. Зміни в експресії цих генів можуть впливати на чутливість бактерій до антибіотиків, зокрема до тетрациклінів. Значення цих насосів було доведено експериментально і у грамнегативних бактерій, таких як *E. coli* і *Klebsiella pneumoniae*, перевищена експресія AcrAB, основного ефлюксного насоса, пов'язана із зменшенням чутливості до тетрациклінів. Також вказано на роль інших насосів, таких як OqxAB і KpgABC у *K. pneumoniae*, у резистентності до тайгецикліну. У грампозитивних бактерій, таких як *Staphylococcus aureus*, насос МерА з родини MATE є ключовим для регуляції внутрішньої стійкості до тетрациклінів [44].

#### 2.2.1.2. Еритроміцин

Еритроміцин є макролідним антибіотиком, вперше відкритим у 1952 році. Він є ефективним у лікуванні різноманітних інфекцій і застосовується як для бактеріальних, так і для деяких неінфекційних станів. Традиційно використовується для лікування респіраторних інфекцій, таких як позалікарняна пневмонія та хвороба легіонерів, а також для профілактики неонатального кон'юнктивіту та хламідіозу [38]. FDA схвалило його використання для лікування шкірних інфекцій, кишкового амебіазу, ревматичної лихоманки, профілактики сифілісу та запальних захворювань органів малого

тазу. Додатково, еритроміцин може бути ефективним у лікуванні акне, особливо у комбінації з третиноїновим кремом або пероксидом бензоїлу. У вагітних жінок він також може використовуватися для профілактики стрептококової інфекції групи В у новонароджених [45].

Еритроміцин є першим 14-членним макролідом, виділеним з актиноміцету *Streptomyces erythreus*. (рис 5) Використовується з 1952 року і широко і має широку популярність для лікування інфекцій, особливо у людей, які мають алергічні реакції до пеніциліну. Проте він має антимікробний спектр, подібний до пеніциліну, і діє як бактеріостатичний або бактерицидний агент залежно від концентрації та типу мікроорганізму. Ефективний проти ряду бактерій, включаючи *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* групи А, *Enterococcus* та *Pneumococcus* [44].

Еритроміцин метаболізується в організмі, і його біодоступність становить 30-65%. Взаємодіє з білками плазми в діапазоні 70-90%. Для поліпшення його властивостей були розроблені напівсинтетичні похідні, такі як рокситроміцин, диритроміцин і кларитроміцин. Ці похідні виявилися більш активними і стійкими в кислому середовищі, що покращило їх кислотостійкість та біодоступність [45].

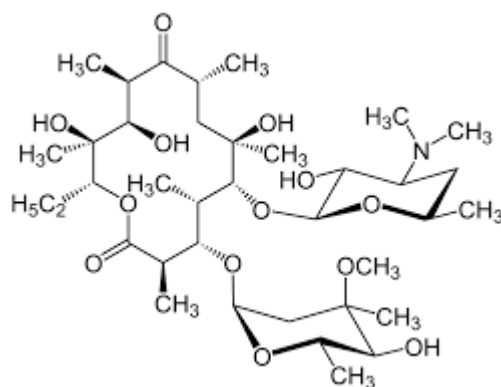


Рис 5. Хімічна структура еритроміцину

Бактеріостатична дія цього антибіотику пригнічує ріст бактерій, блокуючи синтез їх білків через зв'язування з рибосомами, а конкретно — з 50S

субодиницею бактеріальної рибосоми. Через відсутність субодиниці 50S у людини, еритроміцин не впливає на синтез білків в її тканинах, тому для людей небезпеки не становить.

Макролідні антибіотики, такі як еритроміцин, мають протизапальні та імуномодуючі властивості. Еритроміцин може пригнічувати запальні процеси в легенях та пародонті, захищаючи від легеневого запалення та втрати кісткової тканини. Також виявлено, що еритроміцин здатний підсилювати регуляцію DEL-1, що може бути новим молекулярним механізмом протизапальної та імуномодуючої дії [46].

Еритроміцин активний проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, а також деяких інших мікроорганізмів, таких як *Chlamydia trachomatis*, *Entamoeba histolytica*, *Mycoplasma pneumoniae* та інші. Проти нього може розвиватися стійкість через модифікацію 23S рРНК [47].

Крім антибіотичних властивостей, еритроміцин є агоністом мотиліну, що сприяє моториці кишечника.

## 2.2.2 Протигрибкові метаболіти

### 2.2.2.1 Ністатин

Полієни - це антимікотичні препарати, такі як амфотерицин В, ністатин і пімарицин. Вони руйнують клітинну мембрану грибів, взаємодіючи зі стеринами мембрани, і варто розуміти, що молекулярний розмір та кількість зв'язків впливають на зв'язок конкретного полієнового макроліда з ергостеролом у клітинній мембрані грибів [48].

Ністатин (рис. 6) один з полієнів, що використовується для боротьби з грибковими інфекціями. Цей засіб активно використовується для лікування кандидозу та інших грибкових захворювань шкіри, слизових оболонок та внутрішніх органів.

Як вже говорилося, полієни, такі як ністатин, викликають фізичні зміни в клітинній мембрані гриба. Вони створюють пори або канали, які порушують структуру мембрани та призводять до губчастого ефекту. Це стає причиною виходу важливих клітинних компонентів, в результаті чого гриб втрачає можливість зберігати свою структуру та функціональність, що в кінцевому підсумку призводить до його загибелі.

Історія цього засобу почалась у двадцятому столітті. У 1950 році хімік Рейчел Фуллер Браун і бактеріолог Елізабет Лі Хазен виявили, характеризували і очистили ністатин - перший успішно застосований протигрибковий засіб. Це стало ключовим проривом у медичній мікології, де до того часу не було ефективних засобів лікування грибкових інфекцій, що часто призводили до смерті [48].

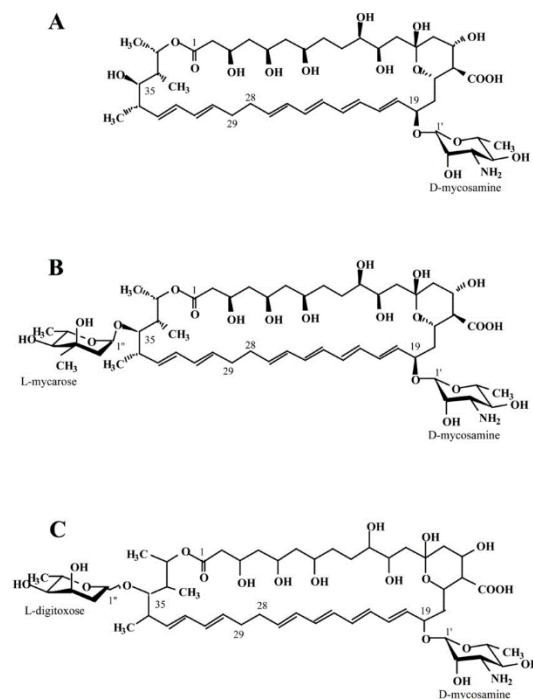


Рис. 6. Структура різних форм ністатину A та його аналогів. (A) Ністатин A1; (B) NYST1070; (C) ністатин A3

Ністатин виробляється з культур *Streptomyces noursei*, що знайдені у ґрунті, в спільноті актинобактерій [49]. Він, як і інші макроліди, має плоске макролактонове кільце. Структура ністатину включає гідрофобний поліольний

ланцюг, гідрофільний хвіст з гідроксильними групами, ланцюг з 7 гідроксильними групами для гідрофільності і полярну головку з карбоксильною групою та аміногрупою. Молекула ністатину має макроцикл з 38 атомами, 6 подвійних зв'язків С-С, 10 гідроксильних груп, 4 ефірних зв'язки, карбоксильну групу та первинну аміногрупу. Розробка ністатину відзначилася фінансовою підтримкою від наукових організацій, що сприяло підвищенню обізнаності та визнання мікології як окремої галузі медицини [48].

Не можна забувати про таку важливу властивість полієнів, як специфічність взаємодії, спричиненої тим, що ергостерол, на який вони й діють, більше розповсюджений у грибкових мембранах, ніж у мембранах ссавців. Хоча є різні теорії і моделі для пояснення точного механізму їхнього впливу на мембрани грибків, зокрема через пороутворення, саме зв'язка з ергостеролом залишається ключовою в антимікотичній дії полієнів. Історично шість полієнів були використані в протигрибковій терапії, але на сучасний момент залишаються активними і широко використовуваними тільки амфотерицин В, ністатин і натаміцин у лікуванні різних грибкових інфекцій [50].

Ністатин виявляє фунгістатичну або фунгіцидну активність залежно від концентрації, рН середовища та типу грибового патогена. Він ефективний як *in vivo*, так і *in vitro* проти різних грибків, таких як *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Candida* та інші, і взагалі ністатин має ширший спектр дії порівняно з амфотерицином В. Механізм резистентності до ністатину виникає шляхом зниження вмісту ергостеролу в грибовій мембрані та заміну його стеролами, на які ністатин не може реагувати. Однак, варто зауважити, що деякі грибки як і раніше можуть бути стійкими до амфотерицину В, але чутливими до ністатину. Також ністатин може бути корисним у випадку з ВІЛ-позитивними пацієнтами — у них спостерігається перехресна резистентність до інших полієнів. [48].

Деякі штами грибка *C. albicans* виявляють більшу чутливість до ністатину, порівняно з іншими антимікотиками. Однак цей препарат також виявляє потенціал для використання в інших сферах медицини. Наприклад, його вивчення для лікування мігрені та інших вірусних інфекцій, таких як COVID-19, свідчить про його розширені терапевтичні можливості. При використанні ністатину важливо враховувати його постпротигрибковий ефект (PAFE) та залежність від концентрації. Ці аспекти можуть впливати на оптимальне дозування та тривалість лікування [48]. Загалом, ністатин виступає як перспективний засіб з широким спектром застосування в медичній сфері [51].

### 2.2.3 Протиракові метаболіти

#### 2.2.3.1 Доксорубіцин

Доксорубіцин є ефективним хіміотерапевтичним засобом для лікування раку, що використовує кілька механізмів дії на рівні клітин. Він не лише діє проти пухлин самостійно, а й активує імунну відповідь. Проте його застосування дуже обмежене, оскільки резистентність до нього росте, і, окрім того, його проблемою залишається велика кардіотоксичність. Проте застосування різних формулювань та комбінації з іншими засобами допомагає зменшити ці обмеження [52].

У 1950-х роках італійська компанія Farmitalia Research Laboratories взялася за пошук протиракових речовин серед мікроорганізмів, які містяться в ґрунті. Під час цього пошуку був ізольований новий штам бактерій *Streptomyces peucetius* з червоною пігментацією, який виявився особливо перспективний. Зразок ґрунту взяли в районі Кастель-дель-Монте. Під час дослідження цього нового штаму вчені виявили, що він виробляє червоний пігмент та антибіотик, який проявляє ефективність проти пухлин у мишей. Відкриття цієї речовини відбулося приблизно в той же час, коли і вчені з Франції виявили подібний

компонент. Щоб відзначити це важливе відкриття, його назвали даунорубіцином. Назва поєднує "Dauni" - ім'я давньоримського племені, яке населяло ту область Італії, де був знайдений антибіотик, і французьке слово "rubis", що означає рубін, через червоний колір речовини. Клінічні випробування даунорубіцину розпочалися у 1960-х роках і продемонстрували його ефективність у лікуванні гострого лейкозу та лімфоми. Але до 1967 року виявилось, що цей препарат може викликати смертельні ураження серця. Згодом вчені провели мутації в штамі *Streptomyces*, отримавши інший червоно-фарбований антибіотик, який отримав назву Адріаміцин. Згідно з установленою практикою, пізніше його перейменували на доксорубіцин. Доксорубіцин виявив більшу ефективність порівняно з даунорубіцином щодо лікування пухлин, особливо твердих, і мав вищий терапевтичний індекс. Проте проблема кардіотоксичності залишилася, що обмежило його застосування [53].

Доксорубіцин (рис 7) є антибіотиком, який бореться з раковими клітинами шляхом взаємодії з їхньою ДНК, зупиняючи їхню реплікацію та транскрипцію. Цей препарат також заважає роботі ферменту топоізомерази II, який відповідає за з'єднання фрагментів ДНК. Приєднання цукрового залишку до молекули допомагає поліпшити взаємодію з ДНК. Окрім того, наявність кінонового залишку дозволяє доксорубіцину викликати цитоліз, що може призводити до утворення радикалів і пошкодження клітинних мембран, зокрема серцевих. Саме це і викликає кардіоміопатію, особливо при великих дозах. Застосовується доксорубіцин при лікуванні різних видів раку, таких як груди, яєчники, легені, сечовий міхур, лейкемія, а також в комбінації з іншими препаратами для лікування різних форм раку, таких як саркоми, рак матки, мезотеліома та інші. Важливо враховувати ризик кардіоміопатії та ретельно контролювати дозу при застосуванні цього препарату [54].

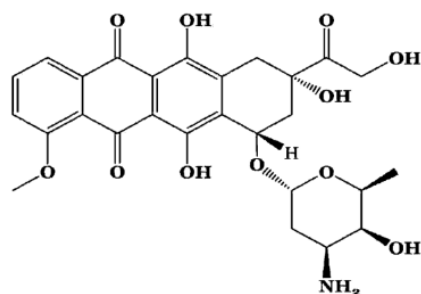


Рис 7. Хімічна структура доксорубіцину

Доксорубіцин проникає в клітину та взаємодіє з її різними складовими. В клітинному середовищі він стає особливо чутливим до клітин у фазах М та S клітинного циклу, впливаючи на їхній ріст та поділ. Після введення доксорубіцин має кілька цілей всередині клітини. У ядрі він взаємодіє з ДНК, викликаючи процес апоптозу, тоді як в інших частинах клітини він взаємодіє з мітохондріальною мембраною та іншими компонентами, стимулюючи утворення реактивних форм кисню. Доксорубіцин також впливає на гомеостаз кальцію та спричиняє аутофагічну смерть клітин. Крім того, він взаємодіє з залізом, викликаючи утворення гідроксильних радикалів та спричиняючи пошкодження різних клітинних компонентів. Таким чином, його антитуморальний ефект включає в себе кілька механізмів, що взаємодіють всередині та поза клітинами [55].

### 2.3 Додаткові використання вторинних метаболітів *Streptomyces*

Як ми вже могли побачити, вторинні метаболіти мікроорганізмів можуть мати найрізноманітніші властивості, багато з яких використовуються дуже активно. Однак варто пам'ятати, що все ж таки використання саме мікроорганізмів для отримання вищевказаних і не тільки речовин може бути трохи сумнівним, бо фіксація інтелектуальної власності, знаходження необхідних біооб'єктів, нижча ефективність ускладнюють цей процес. Проте

саме в природних метаболітів є переваги, що недоступні синтетичним, і саме з цієї причини далі буде розібрано ще трохи інформації про вторинні метаболітів *Streptomyces*.

Останніми роками велику увагу дослідників привертають актиноміцети, які виявлені в морському середовищі, зокрема в осадах, губках, тунікатах, неустонах і інших об'єктах. Морські актиноміцети, (рис. 8) в порівнянні з їхніми територіальними родичами, виявляються складнішими для культивування, ймовірно, через особливості умов зростання. Розвиток методів збору та культивування дозволив вченим виявити представників різних родів справжніх морських актиноміцетів. Ці організми виробляють нові сполуки з цікавими біологічними властивостями, наприклад, деякі з них можуть бути потенційними джерелами біологічно активних молекул для майбутнього використання в медицині чи інших сферах. Зусилля для дослідження морських актиноміцетів скеровані переважно на глибоководні відклади та різноманітні морські біотопи, що дозволяє отримати доступ до унікального біорізноманіття. [56].

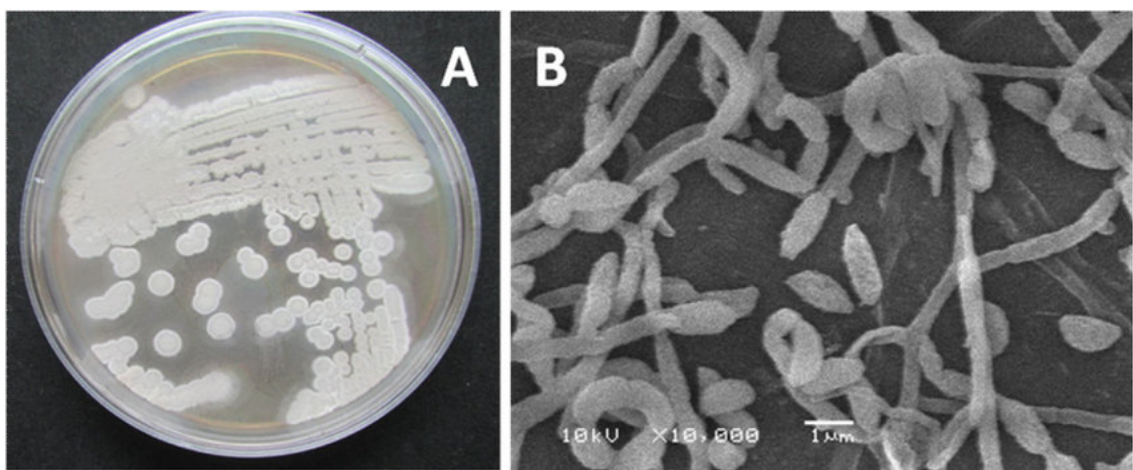


Рис 8. Мікроморфологія морських *Streptomyces* sp. Аль-Дабі-90. (А) зростання морських *Streptomyces* sp. Аль-Дабі-90 на носії MNGA. (В) скануюче електронно-мікроскопічне зображення морських *Streptomyces* sp. Аль-Дабі-90.

Глобальне виробництво аквакультури продовжує швидко зростати, відзначаючи нові рекорди, і вже сягнуло 90,4 мільйонів тонн у 2012 році. Такий позитивний тренд свідчить про високий попит на морську їстівну рибу та водорості. Це важливий елемент харчування для світового населення, забезпечуючи близько п'ятої частини загального споживання тваринного білку. Проте аквакультурні підприємства стикаються з серйозними проблемами, такими як захворювання риб, які спричинені перенаселеністю, високою щільністю заселення та неефективним санітарним управлінням. Це веде до значних економічних втрат від захворювань, оцінених у мільярдах доларів щорічно. Антибіотики традиційно використовуються для профілактики та лікування хвороб у аквакультурі, але це призводить до проблеми виникнення антибіотикостійких штамів бактерій та вірусів. Однією з перспективних альтернатив антибіотикам в аквакультурі є використання бактерій *Streptomyces* як пробіотиків. Ці бактерії можуть бути корисними для риб, борючись з захворюваннями, поліпшуючи зріст і підвищуючи імунітет. Такий підхід може сприяти покращенню якості та стійкості аквакультурної продукції. Однак слід ретельно розглядати переваги та обмеження використання бактерій *Streptomyces* як пробіотиків в цьому контексті [33,56].

Стрептоміцети є перспективними в аквакультурі через їхню здатність контролювати шкідливі мікроорганізми та поліпшувати якість води. Вони проявили антагоністичну активність проти бактерій та вірусів, викликаючи синдром білої плями у креветок. Стрептоміцети також виробляють ензими, що полегшують травлення та засвоювання кормів, сприяючи ефективнішому використанню ресурсів. Здатність стрептоміцетів утворювати стійкі спори робить їх майже незамінними для використання в аквакультурних системах, де можуть виникати екстремальні умови. Використання стрептоміцетів як пробіотиків показало захисні ефекти для креветок та інших аквакультурних організмів, знижуючи смертність та покращуючи здоров'я. Це відкриває

можливості для підвищення виробництва та стабілізації умов у галузі аквакультури [56, 57].

Геозмін і МІБ - це дві сполуки, які утворюються мікроорганізмами, зокрема, бактеріями роду *Streptomyces*. Ці сполуки мають неприємний землистий або муслинний смак і запах, і вони можуть накопичуватися в тканинах риби, негативно впливаючи на її смак і комерційну цінність.

Для очищення води від цих сполук застосовуються різні технології. Наприклад, активоване вугілля використовується для поглинання різних забруднень, включаючи геозмін і МІБ. Озонування - це процес використання озону для знешкодження органічних інгредієнтів у воді, включаючи терпеноїдні сполуки. Біофільтрація використовується для очищення води за допомогою живих організмів, таких як бактерії чи рослини, які видаляють забруднювачі з води [56, 58].

Озонування, особливо у поєднанні зі стрептоміцетами як пробіотиками в аквакультурі, виявилось ефективним у видаленні цих сполук. Проте важливо враховувати обмеження на використання стрептоміцетів через ризик передачі генів, що кодують резистентність до антибіотиків. Також, хоча актиноміцети, включаючи стрептоміцети, можуть бути джерелом корисних біологічних речовин, їх використання пов'язане з екологічними та медичними обмеженнями, які потребують уважного вивчення [59].

### **3. Біосинтез вторинних метаболітів у *Streptomyces***

#### **3.1 Введення у біосинтез вторинних метаболітів**

Сучасні вдосконалені технології секвенування та біоінформатики дозволили створити великі публічні бази даних з незліченною кількістю різних геномних послідовностей та генетичних кластерів біосинтезу (ГКБ). Наприклад, у геномах грибів є 50–90 ГКБ, але, як вже було вказано вище, у звичайних

умовах мікроорганізми продукують набагато менше видів вторинних метаболітів. [63].

Для розвитку синтетичної біології і, власне, нових способів біосинтезу існує цикл DBTL — проектування (design), конструювання (build), тестування (test) та навчання (learn), що і стає основою для нових біофабрик і відкриття нових натуральних сполук [61].

На етапі проектування для виявлення генів, які відповідають за синтез природних продуктів, використовують різні бази даних та обчислювальні методи. Зокрема, важливо визначити гени, що контролюють ключові етапи біосинтезу натуральних сполук. Біоінформатичні інструменти, такі як BLAST, FASTA, Hidden Markov Model (HMM) та antiSMASH, допомагають в ідентифікації цих генів і аналізі генетичних кластерів і їх винайдення допомогло зекономити безліч часу та зусиль для вчених [61, 63].

Варто сказати, що навіть добре вивчені штами мікроорганізмів можуть дивувати різноманітністю вторинних метаболітів, про наявність яких до більш детального вивчення навіть не підозрювали, проте навіть зараз зрозуміло, що далеко не всі можливості відкриті. І саме це призвело до зміни напрямку вивчення — якщо раніше активно досліджувався екологічний скринінг, то зараз набагато цікавіші техніки активації «мовчазних» генів.

Дослідження генетики актиноміцетів забезпечило генетичні інструменти для маніпуляцій з ДНК та ідентифікації елементів, які контролюють експресію генів, і використання синтетичної біології у генетиці актиноміцетів розширило цей інструментарій. Нові підходи поєднують генетичні методи та регуляторні елементи для ефективного виявлення нових природних продуктів, вироблених із загадкових генних кластерів. Вибір правильних стратегій та інструментів для активації "криптичного" метаболічного шляху може покращити ефективність виявлення хімічних структур, які до цих пір все ще здаються неможливими для геномів актиноміцетів [64, 65].

У промисловому виробництві натуральних продуктів з використанням *Actinobacteria* застосовуються різні підходи для підвищення виробництва. Традиційний випадковий мутагенез і скринінг дозволяють збільшити виробництво, але це може бути трудомістким та неефективним. Проте за останнє десятиліття збільшилася популярність використання метаболічної інженерії для отримання вищих виходів вторинних метаболітів. Однак нестача розуміння складних метаболічних профілів та регуляторних механізмів ускладнює раціональну інженерію синтетичних шляхів. Гетерологічна експресія генів у *Streptomyces* широко використовується, але іноді має обмежену ефективність. З'явилися нові методи метаболічної інженерії, такі як рефакторинг синтетичних шляхів, які можуть вдосконалити контроль та виробництво НП [65].

*E. coli* і *Sa. Cerevisiae* (рис. 9) - широко використовувані мікробні «біофабрики» в метаболічній інженерії, завдяки їх добре вивченим метаболічним фондам, гнучкості до генетичних маніпуляцій та швидкому росту. Однак для біосинтезу більшості антибіотиків, що зараз використовуються клінічно, *Actinobacteria*, зокрема *Streptomyces*, є більш практичними, оскільки вони мають унікальні переваги. Переваги *Actinobacteria* включають кращу сумісність з гетерологічними біосинтетичними генами, високий вміст G+C для ефективної експресії генів, велику кількість внутрішньоклітинних метаболітів для біосинтезу та потенціал для делікатної постмодифікації хімічних структур. *Actinobacteria*, зокрема *Streptomyces*, можуть гетерологічно експресувати гени PKS і NRPS зі складними структурами. У біосинтезі *Actinobacteria* використовується широкий спектр попередників для формування різних типів натуральних продуктів, а також наявні складні механізми постмодифікації. У зв'язку з цим, *Actinobacteria* є потужною платформою для біосинтезу природних продуктів, зокрема антибіотиків, у промислових умовах [31,65].

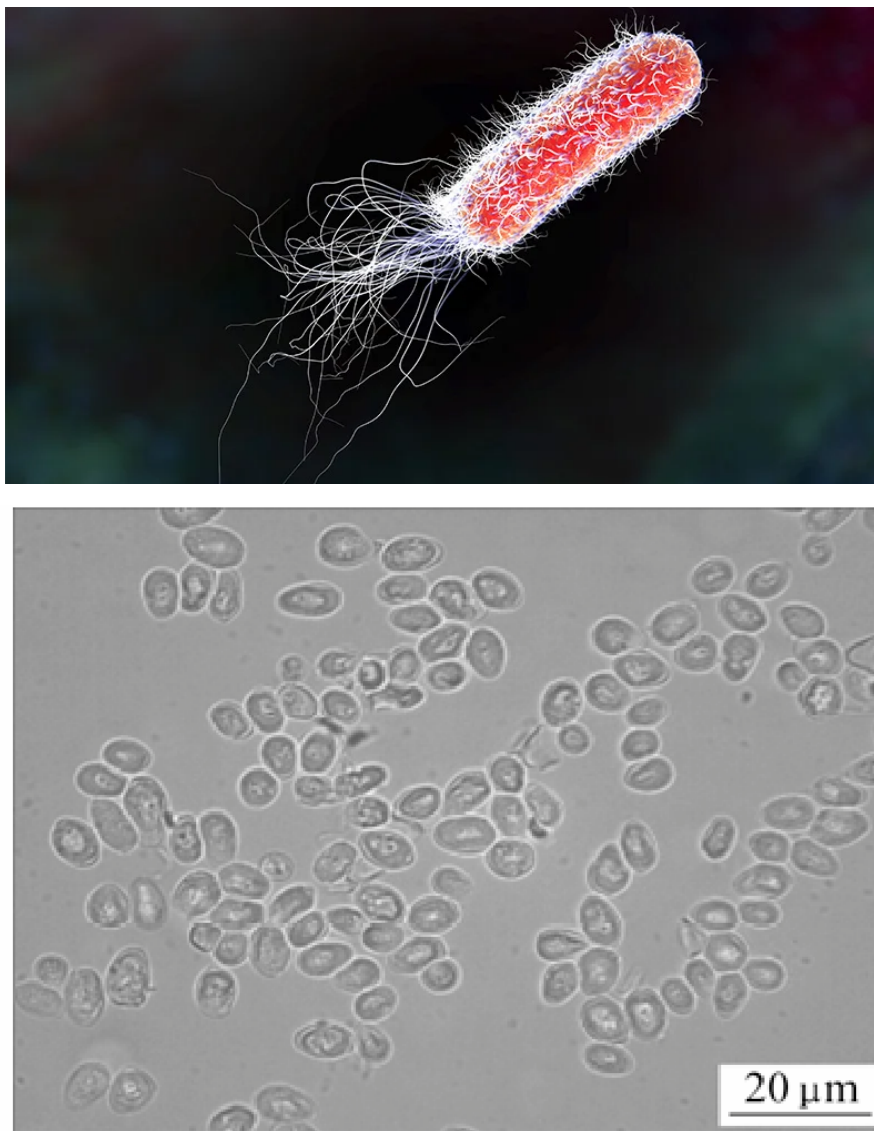


Рис 9. Верхня — *E. coli*, нижня — колонія *Sa. Cerevisiae*

*Actinobacteria*, зокрема *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, і *S. albus J1074*, виявилися ефективними універсальними шасі для виробництва. Промислові штами, такі як *S. hygrosopicus TL01*, *S. albus BK3-25*, *S. cinnamonensis C730* і *Sa. erythraea*, також можуть бути оптимізовані для виробництва гетерологічних вторинних метаболітів.

Однак існують серйозні проблеми, які варто врахувати. Складний транскрипційний і метаболічний контроль, а також обмежене розуміння механізму біосинтезу, можуть ускладнювати метаболічну інженерію для

досягнення високої ефективності біосинтезу наночастинок в *Actinobacteria*. Поганий ріст клітин і відсутність раціонального керівництва перепроєктування шляхів біосинтезу можуть також обмежувати ефективність та диверсифікацію біосинтезу натуральних продуктів в *Actinobacteria*. Вирішення цих проблем вимагає подальших досліджень та розвитку стратегій для раціональної інженерії *Actinobacteria* для покращення виробництва природних продуктів [66].

Додаткові метаболічні шляхи в *Actinobacteria* використовуються для створення наночастинок. Основний метаболізм забезпечує компоненти для їх біосинтезу та зростання. Регулювання транскрипції вторинного метаболізму залежить від зовнішніх та внутрішніх факторів [65].

Метаболічна інженерія для підвищення виробництва наночастинок включає збільшення експресії позитивних регуляторів генів, підвищення постачання попередників шляхом експресії відповідних біосинтетичних генів та блокування конкуруючих шляхів, а також маніпулювання генетичним кластером через дублювання чи гетерологічну експресію [65].

Коли мова йде про біосинтез вторинних метаболітів у стрептоміцетів для повної картини варто згадати і нерибосомні пептиди. Нерибосомні пептиди синтезуються за допомогою нерибосомних пептидних синтетаз (NRPS). Яскравим прикладом представника цього класу сполук є гризеліміцин, продукт *Streptomyces* з протитуберкульозною дією, що використовує (2S, 4R)-метилпролін як будівельний блок. Геном гризеліміцину містить кластер генів, який включає NRPS та ферменти для біосинтезу метилпроліну. Вивчаючи цей шлях, виявлено, що GriE гідроксилує лейцин до (2S, 4R)-5-гідроксилейцину, а GriF та GriH виконують послідовні дегідратацію та відновлення, утворюючи (2S, 4R)-метилпролін. GriE визначає стереохімію метильної групи [66].

Що стосується іншого виду сполук, полікетидів, то вони представляють собою природні продукти, що синтезуються полікетидсинтазою за участю актинобактерій. Вони включають важливі антибіотики, такі як еритроміцин і

доксорубіцин. Структурна різноманітність полікетидів зумовлюється різноманіттям субстратів, реакцій елонгації та етапів модифікації. Прикладом полікетиду є стрептазон Е, ізольований із *Streptomyces*. Біосинтетичний генний кластер містить три гени ПКС, один із яких має домен відновлення. Це вказує на вивільнення полікетиду у вигляді альдегіду, який потім амінується. Біосинтетичний шлях стрептазону Е включає утворення п'ятичленного кільця та розкриття епоксидного кільця, каталізоване циклазами StzE та StzF. Механізм цієї реакції циклізації ще не повністю з'ясований, оскільки дослідження *in vitro* не були проведені [67].

Також актинобактерії виробляють природні продукти з діазогрупою, що проявляють цікаву активність. Біосинтез діазогрупи був знайдений і досліджений у шляху біосинтезу кремоміцину, де CreE (флавінзалежна монооксигеназа) та CreD (ліаза) каталізують утворення діазогрупи з азотистої кислоти. CreE окислює аспартат до нітросукцинату, а CreD каталізує утворення азотистої кислоти та фумарату. Діазогрупа використовується для синтезу різних вторинних метаболітів. Оперон, що містить гени creE та creD, є загальним у багатьох актинобактеріях, вказуючи на участь цього шляху у біосинтезі інших вторинних метаболітів. Шлях ANS (спартат - нітросукцинат) також виявлено у генних кластерах інших сполук, таких як фосфазиноміцин, кінаміцин, кальциміцин і триаксин. Він вважається вторинним метаболізмом, специфічним для азотистої кислоти, та бере участь у біосинтезі різноманітних вторинних метаболітів [68].

Таким чином, у проміжному висновку можна сказати, що шляхи біосинтезу у стрептоміцетах, і взагалі у актинобактеріях, найрізноманітніші. Багато з них недосліджені і малозрозумілі, проте від цього не менш корисні і ефективні.

### 3.2 Кластери генів біосинтезу

У ранні дні ери антибіотиків стрептоміцети визнавалися як важливі джерела антибіотиків та інших вторинних метаболітів. Вони продукують різні вторинні метаболіти, які не безпосередньо впливають на нормальний ріст і розвиток, але часто виявляють високу специфічність для організму, що їх виробляє. Кожен ізолят *Streptomyces* може виробляти декілька вторинних метаболітів, а геноми *Streptomyces* містять значну кількість біосинтетичних генів для вторинних метаболітів. Щоб використати цей потенціал, розроблено різні методи та стратегії для ідентифікації біосинтетичних генів, їх експресії та зв'язку з хімічними об'єктами. Стрептоміцети демонструють здатність виробляти та відчувати хімічні сигнали для спілкування з іншими бактеріями, грибами, рослинами та тваринами [69]. Контроль за виробництвом антибіотиків у стрептоміцетах складний і включає регуляторні білки на різних рівнях. Регулятори, розташовані в кластерах біосинтетичних генів (CSR), контролюють безпосередньо транскрипцію генів у межах антибіотичного кластера. Глобальні та плейотропні регулятори впливають на виробництво кількох антибіотиків та морфологічний розвиток. Стрептоміцети використовують різні молекули для спілкування, такі як N-ацилгомосеринові лактони та пептиди. Вони також виявляють унікальні сигнальні молекули, наприклад,  $\gamma$ -бутиролактон (GBL) А-фактор, який грає важливу роль у координації виробництва антибіотиків та морфологічному розвитку. Загалом, стрептоміцети представляють складну систему виробництва вторинних метаболітів та спілкування, що може бути використане для отримання нових антибіотиків та розуміння їхнього екологічного впливу [70, 71].

Гормоноподібні сигнальні молекули, також відомі як дифузійні сигнальні молекули або ауторегулятори, викликають виробництво антибіотиків та індують морфологічну диференціацію в наномолярних концентраціях. Ці

молекули активують виробництво антибіотиків у популяції через пасивну дифузію в клітини позаклітинного ауторегулятора, що накопичився понад критичну концентрацію [72]. Піонерами у дослідженні цих молекул були Хохлов та інші (1967), які ідентифікували ауторегуляторний фактор (А-фактор), необхідний для продукції стрептоміцину в *S. griseus*. З того часу було ідентифіковано 24 ауторегулятори з 12 видів *Streptomyces*, розділені на п'ять груп. Найбільша група - гамма-бутиролактони (GBL), включає 14 різних молекул, таких як класичний А-фактор та бутаноліди. Інші групи включають ароматичні фуранові сполуки та гамма-бутеноліди. Деякі експериментальні методи виявлення гормоноподібних сигнальних молекул використовують широкомасштабний метод ферментації та швидкі методи екстракції. Підхід, який включає скринінг малих молекул для збільшення виробництва вторинних метаболітів, був успішно використаний для ідентифікації сполук, таких як ARC2, які модулюють виробництво антибіотиків у *S. coelicolor*. ARC2, зокрема, підвищує вироблення актинородину та герміцидину, і його механізм дії пов'язаний з інгібуванням активності еноілредуктази FabI. Цей підхід дозволяє виявити нові сполуки, які впливають на виробництво антибіотиків [73, 74].

Незважаючи на те, що актинобактерії можуть виробляти найрізноманітніші хімічні структури, геном часто використовує кілька механізмів для однієї й тієї самої сполуки, що й допомагає вченим з меншими зусиллями знаходити нові вторинні метаболіти. Після виявлення генетичної основи виробництва молекули відкриваються можливості для подальших відкриттів. Дослідники вміло аналізують генетичну послідовність, передбачають наявність або відсутність генетичних кластерів, і використовують їх для виявлення продуктів. [30].

Однак такий метод, на відміну від класичного виявлення на основі біоактивності, не дає зрозуміти чи біоактивний новий продукт — активність

нерідко можна побачити лише після ізоляції та характеристики вторинного метаболіту.

Виявлення нового генетичного кластера від *Streptomyces sp.*, який містить новий енедієн, тіанциміцин А, відкриває можливості для подальших досліджень. Цей енедієн виявився дуже цитотоксичним для різних типів ракових клітин і може стати основою для розробки нового лікування, такого як антитіло-лікарський кон'югат. Його потужна активність та наявність нехарактеризованих генетичних кластерів роблять енедієни перспективним об'єктом для майбутніх досліджень.

Висновок вчених полягає в тому, що білки, пов'язані з існуючими метаболічними та генетичними шляхами, дуже функціонально консервативні. Однак спостерігається різноманітність у метаболічних шляхах, особливо тих, що пов'язані із ксенобіотиками, гліканами та ліпідами, що вказує на потенційні відмінності у способах обробки органічних сполук та виробництва різноманітних пептидогліканів та ліпідів серед різних штамів.

Детальний розгляд пангеному *Streptomyces* дозволяє визначити їхню ключову роль у розкладанні рослинної біомаси, зокрема лігноцелюлози та ароматичних сполук. Велика кількість CAZymes, які кодуються цими бактеріями, вказує на їхню здатність ефективно розщеплювати полісахариди.

У використанні стрептоміцетів одним з найважливіших аспектів є синтез антибіотиків, і саме дослідження його регуляції є ключовими. Регуляція біосинтезу дуже складна тим, що може включати глобальні регулятори, що активують чи інгібують гени, або роблять це опосередковано, через активатори чи інгібітори в генах кластерів. Якими б різними не були за своєю природою регуляторні білки, їх кінцева мета одна — забезпечити правильне тлумачення сигналів і максимально безпомилкове вироблення продукту. [8, 75].

Кластер-ситуатовані регулятори, такі як ActII-ORF4, CdaR, RedD, і StrR, визначають рівень транскрипції генетичних кластерів, корелюючи з

виробництвом продуктів. Хоча ActII-ORF4 і StrR діють як одиночні CSR, більшість CSR контролюються й іншими кластерами, утворюючи ієрархічні каскади. Питання про ліганди/сигнали, які сприймають CSR, залишається важливим, а відповідь на нього може значно розширити хімічні інструменти для стимуляції біосинтезу природних продуктів [76].

Вивчення регуляційних механізмів генетичних кластерів в *Streptomyces* розкриває важливі деталі, особливо на прикладах стрептоміцину та актинородину. Транскрипція гена CSR StrR, відповідного стрептоміцину, активується через регулятор AdpA та A-фактор. A-фактор, зазвичай, взаємодіє з ArgA, що виступає як репресор AdpA, а сам AdpA впливає на морфологічну диференціацію. У випадку актинородину в *S. coelicolor*, транскрипція гена CSR actII-ORF4 контролюється AtrA, DasR, AbsA2, AbrC3, Crp, relA та іншими факторами. DasR, наприклад, взаємодіє з глюкозамін-6-фосфатом та relA регулює строгу відповідь. Ці фактори взаємодіють на різних рівнях, утворюючи складну мережу контролю над експресією генів [76].

Зокрема, фактори вторинного обміну контролюються не тільки регуляторами CSR, але й системами двокомпонентного сигналу (TCS), такими як PhoRP, AfsQ1/2, DraRK, OsdRK. Ці самі системи складаються з гістидинкінази, що пов'язана з зовнішньою мембраною, що й, як відомо, перша й відчуває найменші зовнішні подразники. Другою частиною є регулятор відповіді, що й викликає транскрипцію цільових генів. Ці TCS реагують на зовнішні сигнали, такі як фосфат (PhoRP), азот (AfsQ1/2), або відсутність кисню (OsdRK), і впливають на виробництво антибіотиків. Дослідження взаємодії цих регуляторів надає глибше розуміння механізмів біосинтезу природних продуктів у *Streptomyces*. Це може мати велике значення для розробки нових стратегій в області виробництва ліків [76].

Регулятори, що розташовані в генетичних кластерах, зазвичай взаємодіють лише з генами у своєму власному кластері. Але деякі, зокрема з

родини PAS-LuxR, можуть активувати гени не тільки в своєму кластері, але й впливати на інші кластери. Наприклад, FscRI в *S. albus* контролює біосинтез кандицидину і антиміцину. Це може служити для координації виробництва різних сполук з антимікробною дією для підвищення синергії та уникнення резистентності [72].

Рівень доступності фосфату в середовищі має великий вплив на генетичні процеси у бактерій, зокрема в *Streptomyces*. Система двокомпонентного сигналу PhoRP регулює експресію генів у *pho* регулоні в залежності від концентрації фосфату. Фермент PhoR фосфорилює білок PhoP, який, в свою чергу, активує або репресує різні гени. Якщо в середовищі достатня кількість фосфату, взаємодія PhoR з системою транспорту фосфату перешкоджає фосфориляції PhoP. Однак при дефіциті фосфату PhoP фосфорилюється, що призводить до активації генів, зокрема тих, які кодують антибіотики [77].

Таким чином, видалення гена *phoP* може збільшити виробництво антибіотиків через взаємодію з системою AfsKRS. Недавні дослідження також показали, що PhoP активує транскрипцію гена *afsS*, але непрямо репресує транскрипцію гена *afsK* (виробництво споринофору). Це дозволяє PhoP координувати виробництво антибіотиків під час дефіциту фосфату, впливаючи на різні регулятори і гени, такі як *bldA*, *scbAR*, *Act* та *Red* [76].

*Streptomyces*, виробники антибіотиків, регулюють виробництво своїх біологічно активних сполук, таких як актинородин і стрептоміцин, відповідно до зовнішніх умов. Фосфатний регулятор PhoRP та азотний регулятор GlnR безпосередньо впливають на гени виробництва антибіотиків під час стресу фосфором чи азотом. Крім того, глюкоза пригнічує виробництво антибіотиків через механізм вуглеводної репресії, де ген *glkA* відіграє ключову роль. Всі ці регулятори взаємодіють, визначаючи фенотип виробництва антибіотиків в *Streptomyces* в залежності від зовнішніх факторів і стратегій вживання ресурсів [78, 79].

Білок BldD, спочатку відомий як ключовий для утворення повітряного міцелію та синтезу антибіотиків у *S. coelicolor*, грає важливу роль у регуляції споруляції та продукції спеціалізованих метаболітів у бактерій *Streptomyces*. BldD взаємодіє з іншою сигнальною молекулою c-di-GMP, що активує його функцію. Він прямо пригнічує гени, що відповідають за споруляцію, що в свою чергу впливає на продукцію спеціалізованих метаболітів [78].

Двокомпонентні регуляторні системи, такі як MtrAB, мають значний вплив на транскрипційні відповіді у стрептоміцетах. MtrAB безпосередньо контролює гени, які відповідають за біосинтез антибіотика хлорамфеніколу та гени, що регулюють поділ клітин. Видалення MtrB спричиняє постійне виробництво хлорамфеніколу та глобальні зміни в метаболомі. Зміни у цій системі можуть активувати криптичні біосинтетичні шляхи та розкрити потенціал для виробництва нових сполук. Інші двокомпонентні системи, такі як AfsQ1/Q2 і AbsA1/A2, взаємодіють з метаболічними регуляторами, створюючи спеціалізовані шляхи передачі сигналів в залежності від наявних поживних речовин [79].

Регулювання на рівні генетичних кластерів включає у себе екстрацитоплазматичні сигма-фактори (ECF), які функціонують як кластерно-специфічні регулятори всередині цих кластерів. ECF сигма-фактори вивільняються від антисигма-факторів у відповідь на конкретні сигнали. Наприклад, у біосинтезі антиміцину сигма-фактор AntA регулює відповідні оперони. Кластерно-специфічні ECF сигма-фактори також контролюють виробництво RiPPs, таких як MibX у біосинтезі мікробіспорицину та PspX у біосинтезі планоспорицину. Ці механізми забезпечують взаємодію та регулювання виробництва спеціалізованих метаболітів у стрептоміцетах.

Взагалі, високий вміст G+C в геномах актиноміцетів ускладнює технологію секвенування та обчислювальні алгоритми. Довжина лінійних хромосом і плазмід, особливо у стрептоміцетів, що мають довгі інвертовані

повтори, ускладнює вирішення їх секвенування сучасними технологіями. Також виділення високомолекулярної ДНК високої якості для побудови бібліотек NGS, зокрема TGS, є необхідним, але часто важкодоступним завданням.

Багато природних продуктів відносяться до полікетидів типу I та нерибосомних пептидів. Синтез цих сполук базується на ферментах, таких як полікетидсинтази (PKS) і нерибосомні пептидсинтетази, які мають високу консервативність у своїй структурі. Повторення подібних та довгих нуклеотидних послідовностей між різними генами ускладнюють процес складання кластерів генів через обмежену довжину читань послідовностей у технологіях SGS [80].

Підводячи проміжний підсумок, можна сказати, що біосинтетичні кластери привертають до себе достатньо багато уваги, і це стало однією з причин, чому вони розглянуті в стількох експериментах і статтях. Проте залишаються невирішені проблеми. Ці труднощі виникають при роботі з актиноміцетами, особливо стрептоміцетами, і створюють перешкоди для розкриття повного біосинтетичного потенціалу цих мікроорганізмів. Окрім того, багато вторинних метаболітів можна відкрити за допомогою деактивації регуляторів, що й вказано вище.

### 3.3 Приклади шляхів біосинтезу в *Streptomyces*

#### 3.3.1 Тетрацикліни

Для вироблення тетрацикліну, як і інших ароматичних полікетидів, використовуються полікетидсинтази типу II. Варто додати, що окрім тетрациклінів, з цими самими ферментами синтезуються ще 6 типів вторинних метаболітів — антрацикліни, ангуцикліни, ауреолові кислоти, тетраценоміцини, поліфеноли прадіміцинового типу та бензоізохроманехінони. Серед вторинних метаболітів стрептоміцетів прикладом ароматичних полікетидів є актинородин,

доксорубіцин, ядоміцин В, окситетрациклін, мітраміцин, тетраценоміцин С і бенастатин А. Кожна група має свою унікальну структуру, таку як тетрациклічна система у антрациклінах чи хромофор у ауреолових кислотах. [81].

У 1960-х роках дослідження біосинтезу хлортетрацикліну (СТС), що продукується *Streptomyces aureofaciens*, включало експерименти з мутантами та клонуванням генів, що призвело до виробництва різних продуктів. Генетичний кластер для біосинтезу СТС та окситетрацикліну (ОТС) був клонований у 1989 і 1996 роках відповідно. Повна послідовність генного кластера, що кодує біосинтез ОТС, була опублікована у 2006 році. Дослідження також включало ідентифікацію генів, які регулюють генні кластери ОТС і СТС. Інформація про біосинтез СТС, зокрема етап хлорування, була надана деякими дослідниками. Однак основна увага у дослідженні біосинтезу зосереджена на шляху ОТС, продукції *Streptomyces rimosus*.(рис 10)[82].

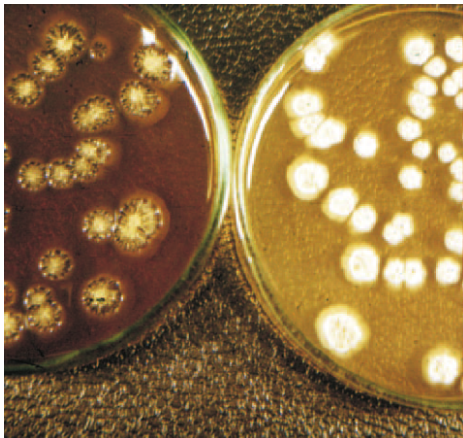


Рис 10. Морфологія колоній двох штамів *Streptomyces rimosus*. (Справа) *S. rimosus* ATCC 10970 (NRRL 2234), скорочений як штам R7. (Зліва) *S. rimosus* штам R6, також відомий як Загребський штам, ізольований з ґрунту Факультетом харчових наук і біотехнологій Університету Загреба.

Тетрацикліновий скелет (ТС) синтезується за допомогою мінімальної полікетидсинтази II типу, яка включає кетосинтази  $\alpha$ ,  $\beta$  та ацильний білок-

переносник (ACP). Механізм ініціації біосинтезу ТС не повністю зрозумілий, але мінімальна PKS включає кетосинтази, амідотрансферазу (АМТ), трансаміназу OхyD та гомолог ацилтрансферази OхyP [82].

Роль гену OхyP в біосинтезі тетрациклінових сполук ще не повністю з'ясована, але його функція, ймовірно, полягає в коректурі стартових одиниць малонамату, видаляючи невідповідні. Процес утворення тетрациклінового остова включає послідовні ітеративні реакції конденсації малонатних одиниць, які керуються мінімальною полікетидно-синтазою. Етапи редукції кетонкової групи, циклізації та ароматизації регулюються ферментами, такими як OхyJ, OхyK та OхyN. Ген OхyN та його вплив на активацію стартової одиниці також є предметом обговорення, особливо у контексті утворення четвертого кільця тетрациклінових сполук. Дослідження з використанням блокованих мутантів підтверджують, що проміжний продукт, відомий як прететрамід, є першим стабільним безрецептурним продуктом, який далі піддається обробці для утворення остову тетрациклінових сполук [83].

Великий ферментний комплекс, відомий як полікетидсинтаза типу II, грає ключову роль у синтезі ортотетрациклінового скелета. Оскільки декілька незалежних ферментів можуть співпрацювати одночасно, біосинтетичний шлях не можна чітко визначити як послідовність упорядкованих реакцій. Проте, аналізуючи проміжні та шунтові продукти заблокованих мутантів *Streptomyces rimosus* і *Streptomyces aureofaciens*, можна припустити порядок ферментативних реакцій, задіяних у модифікації раннього проміжного прететраміду. Ймовірно, одним із перших кроків у реакціях адаптації магістралі тетрациклінів є метилювання метилтрансферазою OхyF в позиції С6. Проте, заблокований мутант *Streptomyces aureofaciens*, який продукує 6-деметил-С7, свідчить про те, що метилювання в С6 не є обов'язковим на ранніх етапах. Подальше гідроксилування регіональних позицій С4 та С6 відбувається за участі оксигеназ OхyL та OхyE. Гідроксилування в С4 необхідне для включення

аміногрупи в цю позицію за участю аміотрансфери OxyQ, що далі приводить до утворення ангідротетрацикліну (АТС) після диметилування аміногрупи. Гідроксилування АТС в С6, каталізоване монооксигеназою OxyS, є важливим етапом у формуванні тетрациклінового остову. Останній крок у біосинтезі ОТС включає відновлення подвійного зв'язку С5а-С11а за участю ферменту OxyR. Варто відзначити, що галогенування в положенні С7 у біосинтезі СТС не кодується в кластері генів ОТС, але відбувається за участю галогенази CtcP [82].

Окситетрациклін є антибіотиком, і його виробництво залежить від різних факторів навколишнього середовища та регуляторів. Фактори, такі як вміст вуглецю, азоту, фосфату, іонів металів та інших поживних речовин у середовищі культивування, а також умови, такі як рН і аерація, можуть впливати на виробництво ОТС. Наприклад, висока концентрація крохмалю використовується у процесах бродіння для виробництва ОТС на промисловому рівні. Також виявлено, що фосфатне голодування сприяє виробництву ОТС. Дослідження показали, що в генному кластері, що кодує біосинтез ОТС, існують регуляторні елементи, такі як SARP-подібні фактори транскрипції OtcR і OtcG. OtcR відіграє позитивну роль в біосинтезі ОТС, активуючи транскрипцію в умовах низького фосфату. OtcG також відіграє регуляторну роль у виробництві ОТС. Зокрема, гени *otrA*, *otrB* і *otrC*, що кодують стійкість до ОТС, були ідентифіковані. *OtrA* захищає рибосому від зупинки трансляції ОТС, *otrB* кодує мембранний білок, відповідальний за вихід ОТС з клітини, а *otrC* забезпечує додатковий рівень стійкості до ОТС. OxyTA1, інший ген у кластері, регулює експресію *otrB* [84].

Узагальнюючи, фактори навколишнього середовища і регуляторні механізми впливають на ефективність виробництва ОТС у *Streptomyces rimosus*.

### 3.3.2 Клавуланова кислота

Клавуланова кислота (КК) є необоротним інгібітором ферменту  $\beta$ -лактамази, що виробляється *Streptomyces clavuligerus*. (рис 11) Використовується в комбінації з  $\beta$ -лактамними антибіотиками для лікування бактерій, що стійкі до  $\beta$ -лактамів. Виробництво КК потребує оптимізації умов культивування та інших аспектів для покращення витрат. Резистентність до антибіотиків є глобальною загрозою для охорони здоров'я, і фармацевтична промисловість грає ключову роль у розробці нових ліків. КК є ефективним інгібітором  $\beta$ -лактамаз, здатним покращувати ефективність антибіотиків. [85].



Рис 11. *Streptomyces clavuligerus*

Процес біосинтезу клавуланової кислоти в *Streptomyces clavuligerus* протікає через клавамний шлях, який має "ранні" та "пізні" етапи. Починаючи з N2-(2-карбоксиетил)-аргініну, конденсація його з проміжним продуктом гліколізу гліцеральдегід-3-фосфату каталюється N2-(2-карбоксиетил)-аргінінсинтазою (CEAS). Цей процес приводить до утворення (3S, 5S)-клавамінової кислоти. Пізні етапи біосинтезу КК розпочинаються з біфуркації потоку вуглецю на дві гілки. Одна з гілок веде до утворення КК, а інша формує сполуки клавума 5S. Ключовий момент полягає в стереохімії 3S, 5S, яка зберігається в усіх сполуках клавума 5S, але для КК необхідна інверсія до 3R,

5R. Ця інверсія може відбуватися через проміжну сполуку N-гліцилклавамінової кислоти. Умови обмеження фосфату індуюють біосинтез КК. Цей процес може бути пов'язаний з гомеостатичною відповіддю на компенсацію дефіциту АТФ при виснаженні фосфатів. Виробництво КК також може бути частиною механізму саморезистентності, що включає синтез  $\beta$ -лактамних антибіотиків, ферментів  $\beta$ -лактамаз та інгібіторів  $\beta$ -лактамаз для захисту від антимікробних препаратів. Загальна гіпотеза вказує на те, що *Streptomyces*, виробляючи антибіотики, контролює конкуренцію за поживні ресурси в ґрунтовому середовищі. Цей адаптивний механізм дозволяє регулювати організми, що конкурують за обмежені ресурси. Невизначені проміжні реакції та точний механізм інверсії стереохімії в біосинтезі КК ще потребують додаткових досліджень для повного розуміння цього процесу [85].

Дослідники також виявили ряд інших метаболітів, які утворюються в процесі біосинтезу КК в *S. clavuligerus*. Серед них N-гліцилклавамінова кислота, N-ацетилгліцилклавамінова кислота та N-ацетилклавамінова кислота, які є результатом проміжних етапів у перетворенні стереохімії 3S, 5S у 3R, 5R КК. Деякі інші метаболіти, такі як 2-гідроксиметилклавам, 2-формілоксиметилклавам, клавам-2-карбонова кислота та аланілклавам, є сполуками клаваму 5S через їх стереохімію 3S, 5S. Проте, лише сполуки клавама з біциклічним ядром, які мають стереохімію 3R, 5R, ефективно інгібують  $\beta$ -лактамази [85].

Гліцерин виступає основним субстратом у виробництві КК у *S. clavuligerus*, оскільки він безпосередньо включається у гліколітичний шлях через утворення 3-фосфату гліцеральдегіду, першого попередника С-3 КК. Потім потік вуглецю розпадається на три шляхи: два належать до первинного метаболізму (гліколіз та глюконеогенез), а один до вторинного метаболізму - ключовий шлях. Крім гліцеральдегіду 3-фосфату, для синтезу СА потрібний

постійний постачання L-аргініну, який синтезується в циклі сечовини, а L-глутамат і L-аспартат сприяють його біосинтезу [86].

Крім клавуланічної кислоти, *Streptomyces clavuligerus* виробляє різноманітні вторинні метаболіти, такі як  $\beta$ -лактамні антибіотики (пеніцилін N, цефамідин C, цефалоспорини та інші клави) і не- $\beta$ -лактамні антибіотики (голоміцин, інгібіторний білок  $\beta$ -лактамази та антибіотик, споріднений з тунікаміцином). В даний момент КК є ключовим метаболітом, що виробляється *S. clavuligerus*, з огляду на його клінічну та промислову важливість. Процес виробництва КК вивчається під час глибинного культивування *S. clavuligerus*, включаючи як дикі, так і сконструйовані штами. Різні стратегії та умови культивування, такі як використання гліцерину як джерела вуглецю, додавання амінокислот та інших поживних речовин, можуть впливати на виходи КК. Гліцерин хоч і є основним джерелом вуглецю для біосинтезу КК, але високі концентрації гліцерину можуть спричиняти субстратне інгібування. Додавання амінокислот та інших джерел азоту, таких як соєвий білок, може покращити біосинтез, але слід слідкувати за щільністю та в'язкістю ферментаційних бульйонів. Поживні умови та параметри культивування, такі як рН, температура, тиск кисню і швидкість змішування, впливають на накопичення СА. Наприклад, нейтральне або слабо кисле рН сприяє вищим концентраціям КК. Температура і гідродинамічні умови також важливі, і вони можуть варіювати в залежності від штаму та культуральних умов. У біореакторах типу STR (з резервуаром із перемішуванням) забезпечують гарне змішування, теплопередачу та масопередачу, і є стандартною геометрією для культур *Streptomyces*. Однак нові технології, такі як одноразові біореактори, можуть мати переваги в певних випадках [85].

Регуляторами у *Streptomyces* для клавуланової кислоти є ClaR і CsaR, дефекти в яких можуть бути використані для підвищення виробництва клавуланової кислоти в штаммах *Streptomyces clavuligerus*. Крім того, дослідники

Kizildoğan та інші зробили важливий крок у вдосконаленні виробництва клавуланової кислоти, створивши штам *S. clavuligerus* IDG3, який має надзвичайно високі титри КК. Шляхом надекспресії генів *cas2*, *claR* і *ssaR* вони досягли значного збільшення виробництва КК, використовуючи різні промотори. У додаток до *claR* і *ssaR*, інші важливі регулятори, такі як *AreB* і *ScaR*, брали участь у контролі виробництва КК. *AreB*, зв'язуючи послідовності ARE, регулює цільові гени вище за ген *ssaR*, впливаючи на виробництво КК і цефаміцину C. *ScaR*, як ауторегулятор, контролює *ssaR* та опосередковано *claR* через сигнальний шлях *AdpA*, що визначає виробництво КК. Зниження рівня регулятора транскрипції *AdpA*, котре відбувається за допомогою *ScaR*, позитивно впливає на виробництво СА [87].

Дії над TCS також можуть покращити біосинтез вторинного метаболіту. В даному випадку, *CagRS* є плейотропним TCS, який позитивно впливає на виробництво клавуланової кислоти, *snk* і *res2*, регулюють біосинтез 5S *clavams* і *Pho* регулон відповідає за реакцію на фосфатне голодування. Серин/треонінкіназна система *AfsK-AfsR* також грає роль у регуляції виробництва антибіотиків у *Streptomyces*, включаючи *S. clavuligerus*. Крім того, регулятори, такі як *SerRS*, які визначають виробництво конкретних антибіотиків, можуть становити інтерес для покращення виробництва клавуланової кислоти. Численні сигма-фактори та анти-сигма-фактор *BldG* також впливають на експресію генів у біосинтезі КК та морфологічний розвиток самої бактерії. Зазначено, що стресова відповідь може впливати на біосинтез клавуланової кислоти та інших антибіотиків. Мутанти *relA* у *S. clavuligerus*, які втратили здатність синтезувати *ppGpp*, демонстрували зменшену продукцію як КК, так і цефаміцину C. [85].

Окрім маніпуляцій зі штамом, що ґрунтуються на індукції надмірної експресії або просто мутуванні регуляторних генів, деякі дослідження були сконцентровані на впливі первинного, необхідного для клітини, метаболізму на

виробництво клавуланової кислоти. Наприклад, при спробі видалення гена *gar1* у мутанта *S. clavuligerus* NRRL3585 відбулось подвоєння продукції КК, через збільшення гліцеральдегід-3-фосфатного пулу резервуару для біосинтезу КК. Також застосовували цей підхід іншим способом — комбінуючи видалення гена *gar1* із надлишковою експресією *ssaR* і *claR* для створення сконструйованого штаму [88].

В інших дослідженнях було виявлено, що надмірна експресія гена *lysA*, який бере участь у біосинтезі L-лізину, покращує вироблення КК, цефаміцину С і тунікаміцину в *S. clavuligerus* NRRL 3585. Вартує уваги і найрозповсюдженіший метод — мутагенез різними способами. Наприклад, промисловий штам DS48802, отриманий повторюваним процесом мутагенезу та скринінгу *S. clavuligerus* ATCC 27064, продукував рівень КК у 100 разів вище, ніж дикий тип. УФ-мутагенез також використовували для посилення титру КК у *S. clavuligerus* ATCC 27064 та інших штамів. Ці дослідження спрямовані на вдосконалення метаболічних шляхів та генетичної структури, сприяючи покращенню виробництва клавуланової кислоти в *Streptomyces clavuligerus* [85].

Узагальнюючи, ці дослідження вказують на потенціал оптимізації виробництва клавуланової кислоти шляхом генетичної модифікації штамів *Streptomyces clavuligerus* та раціонального впливу на різноманітні регулятори в біосинтезі КК.

### 3.3.3 Ністатин

У 2000 році почалась робота з клонування кластерів біосинтезу полієнових антибіотиків. Прикладами них є пімарицин, амфотерицин В, кандицидин і ністатин, про який тут і піде мова. Проведені дослідження за допомогою секвенування виявили модульні полікетидсинтази, що й допомагає у побудові макролактонних ядер цих сполук. Для покращення виробництва цих

речовин використовують типові модифікації, що включають метильне відгалуження та приєднання цукру D-мікозаміну. Деякі полієни можуть бути піддані подальшим модифікаціям, наприклад гідроксилування на конкретних позиціях. Дослідження геному продуцентів полієнів не тільки дозволяє виявити нові сполуки, а й винайти аналоги, що будуть дешевші чи матимуть інші переваги. Кластери генів біосинтезу включають PKS, цитохром P450, мікозамінілювання, експортні та регуляторні білки. Послідовності геному також розкривають додаткові гени, що впливають на виробництво полієнів. Вивчення біосинтезу полієнів допомагає розуміти, як PKS визначають стереохімію у своїх продуктах. Мотиви стереоспецифічності дозволяють прогнозувати стереохімію, але іноді виникають невідповідності між очікуваними та виявленими структурами. Робота в цьому напрямку може виявити нові аспекти метаболічного шляху полієнів та сприяти створенню нових біологічно активних сполук.

Дослідження біосинтезу полієнів включає виділення нових сполук з різних джерел, таких як морські мікроорганізми та рідкісні актиноміцети. Плідні виробники полієнів були виявлені серед симбіонтів мурах та інших джерел. Секвенування мікробного геному сприяє відкриттю нових полієнів і розширює розуміння їхнього біосинтезу. Кластери генів біосинтезу полієнів включають кодування PKS, цитохрому P450, мікозамінілювання, експортних та регуляторних білків. Секвенування геному надає інформацію про незв'язані гени, які впливають на виробництво полієнів. Геноми різних виробників, таких як *S. noursei*, *S. nodosus* і інші рідкісні нестрептоміцетні актиноміцети, можуть служити джерелами нових біосинтетичних генів для антибіотиків і біоактивних сполук.

Тепер, після кращого розуміння біосинтезу у полієнів взагалі, можна перейти до суто ністатину, що має доволі складний шлях. Цей шлях проходять такі стрептоміцети, як *Streptomyces noursei*.(рис 12).



Рис 12. *Streptomyces noursei*

Макролактонове кільце полієнових антибіотиків, зокрема ністатину, складається з 38 вуглецевих атомів і формується шляхом послідовної конденсації 16 молекул ацетату та 3 молекул пропіонату. Передкурсори для включення цих одиниць у макролактонове кільце - малоніл-CoA та метилмалоніл-CoA - формуються через карбоксилювання ацетил-CoA та пропіоніл-CoA відповідно. Дослідники виявили, що ефективність біосинтезу ністатину корелює з рівнем карбоксилювання ацетату та пропіонату [45].

Вищі рівні неорганічного фосфату у середовищі культивування мають негативний вплив на біосинтез ністатину, зокрема оптимальні умови для його виробництва вимагають низьких рівнів фосфату (<5 mM). Показано, що високі рівні глюкози також негативно впливають на виробництво ністатину. Додатково,

швидкість росту мікроорганізмів, таких як *Streptomyces*, також впливає на біосинтез ністатину, де оптимальні умови сприяють виробництву [93].

Генний кластер ністатину складається з 20 генів, які кодують ферменти, відповідальні за його синтез. Ці ферменти мають різноманітні активності, такі як активація, конденсація, та модифікація полікетидних ланцюгів, які потрібні для створення макролактонового кільця ністатину. Синтез макролактонового кільця ністатину починається з завантаження стартової (ді)карбоксильної кислоти білком NysA, що містить кетосинтазний (KS), ацилтрансферазний (AT), дегідратазний (DH) та ацилноносний (ACP) домени. Встановлено, що амінокислотна заміна в домені KS NysA може бути важливою для декарбоксилювання малоніл-КоА, і цей залишок може бути критичним для цього процесу [89].

Після ініціації синтезу, макролактонове кільце ністатину далі зростає за допомогою конденсації двох пропіонатних одиниць з ацетатним стартером під керівництвом бімодульного PKS NysB. Присутність неактивного домену DH в модулі 2 NysB відповідає за появу гідроксила на C35 молекули ністатину [89].

Білок NysC, гексамодульний PKS, додає шість ацетатних одиниць до полікетидного ланцюга. П'ять із шести модулів NysC містять редуктивні петлі KR-DH, тоді як додатковий домен ER присутній у модулі 5. Ці редуктивні домени відповідають за появу різних подвійних зв'язків та насичених зв'язків на молекулі ністатину, що формуються в процесі біосинтезу [89].

Завдяки домену ER у модулі 5, ністатин синтезується як тетраен. Цікаво, що гексамодульний PKS AmphC, що відповідає за синтез амфотерицину у *S. nodosus*, має схожість з NysC і також містить повний набір редуктивних доменів у модулі 5. Однак домен ER у AmphC погано працює, що призводить до синтезу як тетраена, так і гептаена. Після завершення синтезу полікетидного ланцюга шляхом ферментів PKS NysI, ряд пост-синтезних модифікацій додаються до молекули ністатину. Ці модифікації включають глікозилювання, окислення та

гідроксилування, кожне з яких може відбуватися в різних частинах молекули. Наприклад, глікозилування може відбуватися за допомогою ферменту NysDI, який є схожим на UDP-глюкоронілтрансферазу, та відповідає за приєднання мікозамінового залишка до молекули ністатину на позиції C19.

Окислення та гідроксилування відбуваються за участю цитохром P450 монооксигеназних ферментів, таких як NysL та NysN. Відомо, що NysL відповідає за гідроксиляцію групи на позиції C10, тоді як NysN, імовірно, каталізує окислення метильної групи на позиції C16.

Крім того, для виведення ністатину з мікроорганізму, використовуються спеціальні білки-транспортери, такі як NysH і NysG, які відповідають за активний транспорт ністатину через клітинні мембрани. Ці білки забезпечують ефективне виведення ністатину з мікроорганізму, що його виробляє, для того, щоб він міг взаємодіяти з іншими організмами або середовищем.

NysH та NysG, ймовірно, утворюють гетеродимер і є ключовими компонентами для експорту ністатину з *S. noursei*. Після видалення будь-якого з цих генів спостерігалось зменшення біосинтезу ністатину і накопичення прекурсора ністатину без гідроксильної групи на C10. Це свідчить про можливість існування інших транспортних систем, які можуть компенсувати дефект NysH/NysG [89].

Регуляторні гени NysRI, II, III та NysRIV знаходяться поряд із кластером генів ністатину та прямо регулюють його біосинтез. Експерименти показали, що всі ці гени є необхідними для ефективного виробництва ністатину, і їх експресія повинна бути координованою для забезпечення оптимальної продукції.

Додаткові дослідження виявили інші поліенмакроліди в екстрактах культури *S. noursei*, окрім ністатинів A1 і A3. Ці сполуки, такі як 35-мікарозилністиатин і 28,29-дидегідроністиатин, можуть бути важливими для подальших досліджень у синтезі нових поліенмакролідів [89].

### 3.3.4. Доксорубіцин

Цей антибіотик має достатньо складний біосинтетичний шлях у *Streptomyces peucetius* (рис. 13), що починається з утворення проміжного продукту —  $\epsilon$ -родоміцинону, чий вуглецевий скелет продукується ферментом полікетидної синтази типу II. Вона ж у свою чергу кодується генами *dpsABCDGEFY*. Відбувається цей процес таким чином — для початку синтезується 21-вуглецевий декакетид, що утворюється почерговою конденсацією від дев'ятої одиниці малоніл-CoA до першої (початкової) пропіонілу-CoA, за участю полікетидних синтаз. Кеторедуктаза (*DpsE*) перетворює декакетид на проміжний продукт, який потім пройде альдольну конденсацію та три стадії циклізації кілець, керовані *DpsF* і *DpsY*, щоб утворити 12-дезоксиканоїнову кислоту. Монооксигеназа (*DnrG*) додає кето-групу до цього проміжного продукту, перетворюючи його на алканову кислоту. Потім ця кислота за допомогою метилтрансферази алканової кислоти-S-аденозил-л-метіоніну (закодованої геном *dnrC*) перетворюється на акавікетон. Циклаза метилованого естеру алканової кислоти (закодована геном *dnrD*) керує реакцією циклізації. Нарешті, акавікетон редуктаза (закодована геном *dnrH*) та гідроксилаза (закодована геном *dnrF*) приводять до перетворення 7-оксо залишку акавікетону на гідроксильну групу, утворюючи  $\epsilon$ -родоміцинон.

В подальший біосинтез тимідин дифосфату-1-дауносаміну залучені сім генів — *dnmL*, *dnmM*, *dnmU*, *dnmT*, *dnmJ* і *dnmV*. Початковою хімічною сполукою є d-глюкози-1-фосфат. Початкові дві ензиматичні реакції, які відбуваються за участю глюкозо-1-фосфат тимідилілтрансферази та тимідин дифосфат-d-глюкози 4,6-дегідратази, що кодуються генами *dnmL* і *dnmM*. Ці реакції створюють проміжний продукт - тимідин дифосфат-4-кето-6-дезоксид-глюкозу (ТКДГ). [90].



Рис 13. *Streptomyces peucetius* FH 1308

Потім DnmU, яка є епімеразою, забезпечує епімеризацію ТКДГ до тими́дин дифосфат-4-кето-6-дезокси-1-глюкози. На наступному етапі до цієї молекули в позицію С-3 додається кетогрупа та аміногрупа за участю гідратації та амінотрансферази, які кодуються генами *dnmT* та *dnmJ* відповідно. Нарешті, *dnmV*, що є кеторедуктазою, знижує кетонову групу в позиції С-4 до гідроксильної групи, щоб утворити тими́дин дифосфат-1-дауносамін [90].

Після стадії синтезу полікетиду  $\epsilon$ -родоміцінон перетворюється у родоміцин D за участю ферменту DnrS, який зв'язує його з дауносаміном. Потім родоміцин D перетворюється на 13-дезоксикарміноміцин ферментом DnrP, а після цього відбувається О-метилування за допомогою метилтрансферази, кодованої геном DnrK, щоб утворити 13-деоксидаунорубіцин. Цей метаболіт піддається окисленню в позиції С-13 ферментом цитохрому Р450 у два етапи, перш за все утворюється проміжний продукт 13-дигідродаунорубіцин, а потім цей продукт перетворюється на даунорубіцин. Фермент DoxA відповідає за обидва цих етапи. Далі даунорубіцин гідроксидується в позиції С-14 тим же ферментом DoxA, щоб утворити доксорубіцин [90].

## **4. Генетичні маніпуляції кластерів генів біосинтезу для отримання нових вторинних метаболітів**

### **4.1 Геномне дослідження (Genome Mining)**

Не буде перебільшенням сказати, що бактерії — це чи не найуніверсальніші організми за місцем проживання, що здійснюється завдяки швидкій адаптації та горизонтальному перенесенню генів, що забезпечує необхідні мутації. Саме ця властивість без людського втручання забезпечує нові гени, завдяки яким можливості бактерій залишаються необмеженими, та й для них самих вторинні метаболіти це не біосинтетики необхідні для росту, але вони підвищують конкурентоспроможність.

На початку XXI століття знання про геноми стрептоміцетів розширились, що відкрило нові можливості для дослідження продукції вторинних метаболітів. Як ми вже дослідили в інших частинах цієї роботи, саме певні геномні кластери при дослідженні показують дослідникам користь тієї чи іншої бактерії в винайденні нових вторинних метаболітів. Також деякі дослідження показали, що хімічні особливості, сформовані у продуктах мікроорганізмів, можуть бути корисні для ідентифікації генетичних кластерів, які, в свою чергу, виробляють продукти з необхідною характеристикою - «цільовою біоактивною особливістю». Одним з прикладів є енедіїни, які спричиняють мутагенні та цитотоксичні ефекти. Лабораторія Шена використовує геномний підхід для пошуку нових енедієнових природних продуктів [91].

Наукові групи з усього світу працюють над скринінгом і подальшою ізоляцією для відкриття нових і нових вторинних метаболітів. Завдяки можливостям сучасної техніки та дослідженню геному цей підхід претендує на революцію. Для початку пошуку і відкриття нових з'єднань використовується ідентифікація кластера біосинтетичних генів (BGC) за допомогою аналізу геному. Також може проводитися аналіз геному після виявлення біологічної

активності шляхом скринінгу для розуміння молекулярних та функціональних основ. Основна ідея полягає в ідентифікації BGC, гомологія яких базується на відомих класифікаціях. Такі класифікації використовують типи шляхів (наприклад, PKS I, PKS II, NRPS, RiPP), доменну структуру, збережені мотиви та інші фактори. Програми, такі як antiSMASH 4.0 і PRISM 3, є популярними і використовують різні стратегії виявлення та візуалізації. Незважаючи на потужні методи прогнозування структури продукту на основі послідовності, використання їх у конвеєрах, таких як antiSMASH і PRISM, залишається проблемою через складність даних. Ідентифікація нових BGC також залежить від гомологій з елементами відомих BGC. Розробка зручних для користувача конвеєрів є критичною, оскільки вони повинні оптимізувати ефективність використання та обчислення [92].

Аналіз розподілу BGC у генах *Streptomyces* та інших мікроорганізмів представляє собою виклик через великий обсяг даних. Дослідження, здійснене за допомогою програми AntiSMASH, виявило значну кількість BGC у генах стрептоміцетів, зокрема виявлено 1346 BGC у 39 геномах стрептоміцетів. Цей об'єм даних робить аналіз складним завданням. База даних MIBiG містить вказівки щодо деяких BGC, що кодують гени, пов'язані із збереженням великих таксономічних груп, таких як ектоїн, гопін, сидерофори і каротиноїди. Загалом, 998 BGC мають схожість з 252 різними записами бази MIBiG, під час коли 348 BGC не демонструють значної подібності. Аналіз показав, що деякі BGC загальні для всіх геномів, як от ектоїн та гопін, вказуючи на високий рівень генетичної схожості у мікробному світі. Проте більшість BGC мають низьку подібність до еталонів MIBiG, що свідчить про генетичну різноманітність та можливість наявності невідомих речовин або нових генетичних кластерів. Такий аналіз дозволяє отримати краще уявлення про генетичну мінливість у світі мікроорганізмів та потенційно нових природних продуктів [92].

Регуляторні мережі в *Streptomyces*, відповідальні за фізіологічну диференціацію та виробництво вторинних метаболітів, є складними. Глобальне та специфічне регулювання біосинтезу антибіотиків включає різні механізми, такі як регуляція реакції сиріт, двокомпонентне регулювання та регуляція, специфічна для шляху. Ці мережі включають різні регуляторні гени, які контролюють виробництво антибіотиків шляхом тонкої настройки транскрипції генів. Гетерологічна експресія, яка передбачає введення генетичних областей для біосинтезу вторинних метаболітів в інші мікроорганізми, є важливим методом для отримання нових природних продуктів. Цей підхід дозволяє вивчати криптичні гени та отримувати нові сполуки, які можуть мати біологічну активність. Узагальнюючи, інженерія рибосом, регуляторні мережі та гетерологічна експресія є перспективними стратегіями для покращення виробництва вторинних метаболітів у *Streptomyces* та інших мікроорганізмах. Ці методи можуть сприяти відкриттю нових антибіотиків та інших біологічно активних сполук [93].

Комбінаторний біосинтез у морських *Streptomyces* використовується для маніпулювання генами та кластерами для отримання нових метаболітів. Цей підхід важливий для виробництва антибіотиків із специфічними структурами, що можуть бути складними для синтезу іншими методами. Інженерія промоторів дозволяє активувати тихі BGC, а гетерологічна експресія створює нові можливості для отримання вторинних метаболітів. Спільно із синтетичною біологією та системною біологією ці стратегії розширюють можливості відкриття та використання природних продуктів від морських *Streptomyces* [94].

*Streptomyces* відрізняються великими лінійними хромосомами та високим вмістом G + C. Їхні гени для вторинного метаболізму часто розташовані в нестабільних областях хромосоми, що може сприяти варіабельності метаболітів. Низька стабільність хромосоми може призводити до спонтанних делецій і перебудов, впливаючи на гени, пов'язані з життєво важливими функціями

клітини. Доступні геномні дані для *Streptomyces* включають 1749 геномів, проте лише 11% є високоякісними, що ускладнює прогнозування геномів та вивчення виробництва вторинних метаболітів. Нові методи секвенування сприяють вдосконаленню аналізу геномів та виявленню потенційних біосинтетичних генів для подальших досліджень в області синтезу антибіотиків та інших корисних сполук [95].

У минулі роки досягнення в інструментах аналізу геному дозволили вченим використовувати зворотний підхід для ідентифікації генетичних кластерів вторинних метаболітів, вироблених *Streptomyces*. Зокрема, інструменти, такі як antiSMASH і PRISM, забезпечують точне передбачення структури хімічних продуктів, що полегшує вивчення нових сполук. Інформація, отримана зі зворотних підходів, значно розширила бази даних генетичних кластерів вторинних метаболітів і зробила їх ефективніше використовуваними для подальших досліджень. Це особливо важливо для вивчення потенційно корисних сполук, таких як антрациміцин та куракозол. Інструменти аналізу геному відкривають можливості для передового підходу до ідентифікації генетичних кластерів вторинних метаболітів, дозволяючи вченим визначати нові гени та їх продукти. Такий підхід є ефективним для вивчення біосинтезу та впливу вторинних метаболітів на *Streptomyces* та його оточуюче середовище [69].

Щоб максимізувати виробництво вторинних метаболітів в *Streptomyces*, застосовують інтегровані технології, такі як геномна інженерія та гетерологічна експресія. Використання елісаторів та мутагенів допомагає активувати мовчазні біосинтетичні генетичні кластери (smBGC). Геномна інженерія і CRISPR-Cas9 використовуються для індукції мовчазних smBGC та створення гібридних молекул. Гетерологічна експресія в інших штаммах є альтернативою. Прогноз структури продуктів залишається складним завданням через невідомі гени.

Подальший розвиток синтетичної біології та геномної інженерії сприятиме відкриттю нових біоактивних сполук [96,97].

#### 4.2 Інженерія генетичних маршрутів

При дослідженні методів модифікації геному варто почати саме з активації мовчазних генів, бо це не просто надання нових властивостей, а розкриття повного потенціалу. Виконується активація або непрямим шляхом (імітація сигналів навколишнього середовища), або цільовим (активація неохарактеризованих генів). Останній підхід передбачає створення регуляторів у генах, що кодують біосинтез, або гетерологічну експресію цих генів. Для таких маніпуляцій створені ефективні інструменти генетичної редакції, такі як система CRISPR/Cas, яка дозволяє точно редагувати геном, про яку детальніше буде сказано згодом [98].

Таким чином, активація мовчазних генів у *Streptomyces* може призвести до відкриття нових вторинних метаболітів і сприяти подальшому розвитку антибіотиків, ефективних проти мультирезистентних патогенів. [99].

Система CRISPR/Cas використовується для редагування генетичного матеріалу в клітинах. Вона складається з білка Cas та направляючої РНК (crRNA або tracrRNA). Функціонує вона наступним чином. Направляюча РНК вказує білку Cas конкретне місце в геномі для редагування. При редагуванні гена, направляюча РНК містить послідовність, яка комплементарна до рядка ДНК, який потрібно змінити. Коли система CRISPR/Cas вводиться в клітину, направляюча РНК утворює комплекс з білком Cas і направляє його до цільового місця в геномі. Білок Cas виконує функцію ендонуклеази, що захищає подвійноланцюгові розриви в ДНК у місці, яке було визначено направляючою РНК [100].

Після утворення розриву в ДНК клітина може використовувати два основні механізми для свого відновлення: негомологічне з'єднання кінців

(NHEJ) або гомологічне відновлення (HDR). У випадку NHEJ кінець розщепленої ДНК просто з'єднується разом, що часто допомагає додати невеликі вставки або делеції. З іншого боку, у випадку HDR, клітина може використовувати зовнішній шаблон ДНК для відновлення розриву, що дозволяє точніше редагувати геном [101].

У випадку *Streptomyces*, де бактерії не мають генів, задіяних на шляху NHEJ, редагування гену, опосередковане HDR, є більш перспективним. Використання CRISPR/Cas допоможе виконати цей процес швидше й ефективніше, зменшуючи час і ресурси, необхідні для генної інженерії. Таким чином, система CRISPR/Cas є потужним інструментом для точного редагування гена в *Streptomyces* та інших організмах [102].

Система CRISPR/Cas, (рис. 14) вперше застосована в *Streptomyces*, обґрунтовується класом 2, типом II, використовуючи ендонуклеазу Cas9 з *Streptococcus pyogenes*. Ця система перетворюється на використання направляючої РНК для спрямування Cas9 на конкретну послідовність ДНК, де відбувається розщеплення дволанцюгової ДНК. Система CRISPR/Cas9 була дієвою для генетичних модифікацій у різних видів *Streptomyces*, таких як *S. lividans*, *S. viridochromogenes* і *S. albus* [102].

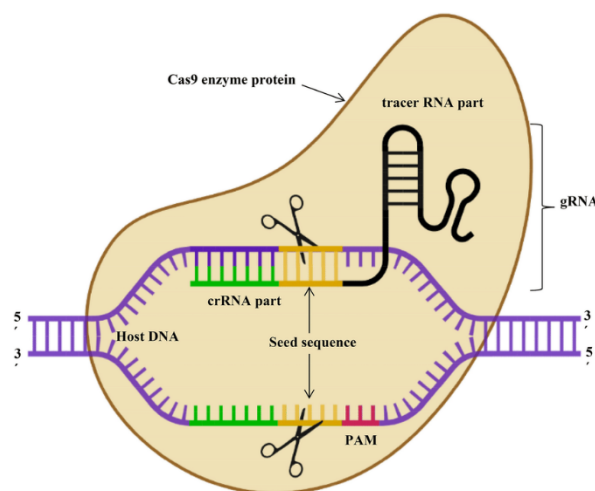


Рис 14. CRISPR/Cas9 - білок, що складається з ферменту Cas9 і направляючої РНК (gRNA). gRNA містить crRNA, яка розпізнає ДНК хазяїна

(20-22 нуклеотиди) і PAM мотив (NGG), необхідний для активності Cas9. Ця система здатна створювати одностежіві уколи та двустежіві розриви в ДНК з високою точністю.

Згодом дослідження привели до застосування інших систем CRISPR/Cas9, а також до вивчення системи класу 2 типу V, використовуючи Cas12a з *Francisella novicida*. Ця система відрізняється від Cas9 тим, що розпізнає компоненти PAM з 5'-TTTV-3', що дозволяє редагувати геном у GC-багатих регіонах *Streptomyces*. Крім того, Cas12a може забезпечити більшу ефективність при мультиплексному редагуванні [103].

В процесі згадувалось розщеплення подвійного ланцюга ДНК, що може призвести до летальності серед зразків. Ця проблема стала поштовхом до створення видів Cas9, розщеплюючих лише один ланцюг (nCas). Цей спосіб робить ланцюги достатньо стабільними для збільшення виживання серед бактерій, що піддались цьому методу. [104].

Розроблені базові редактори, що ґрунтуються на системі CRISPR/Cas, дозволяють здійснювати точкові мутації у геномі без необхідності руйнування подвійного ланцюга ДНК. Замість того, щоб впроваджувати зміни шляхом розриву ланцюга, ці редактори оперують на рівні одиночних нуклеотидів, дозволяючи точно внести зміни в геном, наприклад, заміну одного нуклеотиду на інший. Такий підхід відкриває шлях до прецизійного редагування геному без шкоди для його цілісності. [104].

У контексті дослідження вторинних метаболітів, які часто виробляються *Streptomyces*, CRISPR/Cas використовується для ідентифікації та характеристики генетичних кластерів, відповідних для синтезу цих сполук. Інструменти CRISPR/Cas, такі як CRISPRi (I – interference) та CRISPRa (a – activation), дуже зручні, бо регулюють експресію гена без редакції геному, а отже без жодних пошкоджень. Також застосування CRISPR/Cas для видалення або зміни генів,

які контролюють синтез вторинних метаболітів, дозволяє дослідникам з'ясувати їхню функціональну роль у біосинтезі, що робить цей молекулярний інструмент одним з найважливіших у майбутньому розвитку використання вторинних метаболітів. Також CRISPR/Cas може досліджувати і змінювати гени поза кластерами. Окрім того, згадані вище види даної системи можуть приглушувати (CRISPRi) чи підсилювати (CRISPRa) генну експресію, регулюючи можливості бактерії під людські потреби [105].

Окрім того, існують фагові системи рекомбінації, що відкривають можливість для вставки додаткових копій генетичних кластерів. Зрозуміло, що це призводить до збільшення продуктивності. Встановлення спеціальних промоторів, які активуються за певних умов, дозволяє автономний контроль системи CRISPR/Cas за допомогою направляючих РНК. Це допомагає використовувати ресурси ефективніше та отримувати кращу продукцію. [106].

Система CRISPR/Cas допомагає впроваджувати в *Streptomyces* нові метаболічні шляхи з інших організмів. Це дозволяє збільшити виробництво корисних сполук, таких як медичні препарати або хімічні речовини. Користуючись CRISPR/Cas, ми можемо точно редагувати геном, щоб вибрати, які гени мають бути активними, а які - ні, забезпечуючи ефективне виробництво. Видалення деяких генетичних регіонів допомагає звільнити від додаткового навантаження клітинні ресурси, які можуть бути використані для виробництва інших корисних сполук. Такий підхід допомагає створювати ефективніші штами мікроорганізмів, які виробляють більше цінних речовин [105,107].

Хоча лише кілька штамів *Streptomyces* було змінено за допомогою системи CRISPR/Cas, очікується, що у майбутньому буде створено більше модифікованих штамів. Але потрібно бути обережним при редагуванні генів, щоб уникнути серйозних проблем з бактеріями, щоб, через недостатні знання, не створити невідомі раніше патогени. Для швидкого вимкнення певних генів

можна використовувати базові редактори CRISPR, але ці процеси ще потребують оптимізації для покращення їх ефективності [105,108].

Коли створюється новий штам-господар, можуть виникати труднощі з клонуванням великих фрагментів ДНК, які містять важливі гени. Однак застосування системи CRISPR/Cas *in vitro* може сприяти подоланню цих обмежень. Використання Cas12a може полегшити процес клонування, створюючи "липкі" кінці для збирання фрагментів ДНК [109].

Гетерологічна експресія вторинних метаболітів у *Streptomyces* є перевагою порівняно з інженерією нативних організмів-продуцентів, але вимагає модифікації промоторів та інших регуляторних елементів. Використання системи CRISPR/Cas для безпечного та мультиплексного редагування ДНК може спростити цей процес і відкрити нові можливості для створення нових вторинних метаболітів [109].

Генетична модифікація *Streptomyces* включає вибір метаболітів та розробку методів їх трансформації. Після трансформації важливо використовувати метаболічну інженерію для підвищення виробництва корисних сполук. Цей процес є ключовим для розвитку нових біотехнологічних продуктів та оптимізації промислового виробництва. Отже, інженерний підхід у цьому випадку полягає в модифікації генетичних властивостей деяких ферментів, щоб підвищити доступність різних вихідних речовин у метаболічних шляхах [63].

Один з таких шляхів - гліколітичний шлях (Ембдена-Мейєргофа), що перетворює глюкозу на піруват. Для виробництва клавуланової кислоти, що згадувалась у минулій частині, використовували підхід розробки прекурсорів. Це було досягнуто шляхом руйнування генів *gar1* і *gar2*, які кодують гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, які беруть участь у перетворення D-гліцеральдегід-3-фосфату (G3P) в 1,3-дифосфогліцерат (1,3-BPG). При даному руйнуванні генів перетворення стає неможливим, и G3P, який ще й попередник клавуланової кислоти, вільно перетворюється на неї і продукція збільшується

чи не вдвічі. Гени руйнуються за допомогою механізму розщеплення та лігування в різних плазмідах [63].

Проте це не єдиний спосіб збільшити виробництво клавуланової кислоти. Також можливі дуплікацію гена *rah2*, що кодує проклавамінатидіногідролазу, та підвищення виробництва гена *cas2* за допомогою рекомбінантних плазмід, які кодують ген клавамінатсинтазита інших попередників. Абсолютно зрозуміло, що ті ж самі дії та багато інших можна вчинити і над іншими генами.

Перетасування гена - це метод, коли ДНК розчленовується і знову з'єднується, створюючи корисні зміни у генетичній послідовності. Цей спосіб швидко підвищує виробництво вторинних метаболітів. Наприклад, виробництво  $\epsilon$ -PL у п'яти різних видів *Streptomyces* було значно покращено за допомогою перетасування генів і міжвидової гібридизації, що призвело до 3-кратного зростання виробництва  $\epsilon$ -PL [110].

Останнім часом, системи метаболічної інженерії, що базуються на математичних моделях метаболічних шляхів у широкому масштабі генів (GSMM), стали ефективними для вдосконалення мікроорганізмів. GSMM охоплює всі метаболічні процеси в організмі, дозволяючи передбачати різноманітні метаболічні явища і використовувати ці знання для поліпшення виробництва вторинних метаболітів. Сучасні стратегії генної інженерії для активації генів BGC у актиноміцетах включають різноманітні методи [110].

Ці стратегії для покращення виробництва вторинних метаболітів використовують молекулярні інструменти для різних цілей. Вони включають експресію кількох копій BGC або факторів, які обмежують продукцію, експресію генів-активаторів, делецію генів-репресорів BGC, рефакторинг BGC, і використання експресії BGC в оптимізованих господарях. Ці методи вимагають розробки нових технологій для клонування та впровадження генетичних конструкцій, а також подолання перешкод, таких як високий GC-вміст у геномах і генетична нестабільність. Стратегії збирання включають

методи, такі як iCatch, клонування прямого шляху (DiPaC), система складання штучного генного оперона (AGOS), і модифікована збірка Gibson для клонування великих фрагментів ДНК з високим вмістом GC [63].

Таким чином, в даному підрозділі ми розібрали методи модифікації генетичних маршрутів, які допомагають покращити якість бактерії чи навіть подолати складності, пов'язані з клонуванням та збором великих фрагментів ДНК з високим вмістом GC. Більша частина була присвячена різним використанням CRISPR/Cas, і не просто так — цей метод у сучасному світі молекулярної біології привертає увагу найбільше через його можливості. Проте інші способи також поки що не втрачають актуальності.

#### 4.3. Досягнення у генетичній модифікації

Стрептоміцети, які є важливими мікроорганізмами у біотехнології, виявилися складними для генетичних маніпуляцій через їхню міцну клітинну стінку та системи обмеження рестрикції. Однак вчені розробили кілька методів для введення ДНК у ці бактерії. Так, метод трансформації протопластів, спочатку розроблений Оканіші та іншими у 1974 році, був модифікований для підвищення ефективності шляхом додавання поліетиленгліколю. Електропорація стала ще одним методом, що дозволяє вводити плазмідну ДНК безпосередньо у фрагменти міцелію деяких видів *Streptomyces* [106].

Однак найбільш широко використовуваним методом стало введення ДНК за допомогою кон'югації з *Escherichia coli*. Цей метод дозволяє легко передавати плазмиди від *E. coli* до *Streptomyces*, використовуючи плазмиди, які мають незвичайну властивість — передачі генів між видами. Ця кон'югація, зазвичай, ефективніша, ніж трансформація протопласту, і застосовна до багатьох штамів *Streptomyces* [111].

Для генетичних маніпуляцій у *Streptomyces* використовуються різноманітні векторні системи, включаючи реплікативні, інтегруючі та

суїцидальні нереплікуючі вектори. Реплікативні вектори, які містять джерело реплікації *Streptomyces*, були сконструйовані на основі плазмід, таких як pIJ101, pJV1, pSG5 та SCP2. Вони використовуються для конструювання нетрансмісивних векторів реплікативного клонування. Такі методи стали ключовими для генетичних досліджень і біотехнологічних застосувань *Streptomyces* [106].

Стратегія динамічного метаболічного регулювання є ефективним методом для підвищення виробництва цільових сполук у мікроорганізмів, балансує ріст бактерій і біосинтез специфічних метаболітів. Це досягається за допомогою трьох основних підходів: систем визначення кворуму, промоторів, що реагують на метаболіти, та біосенсорів [112].

Промотори, що реагують на метаболіти, це регулятори транскрипції, які відгукуються на наявність певних метаболітів у середовищі. Вони дозволяють автоматично контролювати рівень експресії генів, що відповідають за біосинтез сполук. Наприклад, деякі дослідники ідентифікували промотори, які реагують на метаболіти, такі як антибіотики, і використовують їх для підвищення виробництва цих антибіотиків у мікроорганізмах. Ця стратегія дозволяє досягти більш ефективного використання метаболічних ресурсів та підвищення виходу бажаних продуктів [78].

Генетичні біосенсиори - це інструменти, що використовуються для виявлення метаболітів у клітинах у реальному часі. Вони складаються з трьох частин: модулю введення сигналу, який реагує на метаболіт, регуляторного модулю і вихідного модулю, які генерують сигнал для подальшого аналізу. Це важливий інструмент для метаболічної інженерії, який дозволяє точно контролювати виробництво цільових сполук у мікроорганізмах [113].

Існують різні типи біосенсорів, такі як датчики з флуоресцентним резонансним переносом енергії, транскрипційні фактори та рибосвічі, які знаходять широке застосування в метаболічній інженерії. Недавно було

розроблено біосенсиори, які реагують на метаболіти, що є важливими для виявлення метаболітів, що впливають на виробництво цільових сполук [113].

Ці біосенсиори можуть бути використані для регулювання виробництва антибіотиків у мікроорганізмах. Наприклад, було розроблено біосенсор, який реагує на антибіотик, і використовується для підвищення виробництва цих антибіотиків у мікроорганізмах. Також, спеціальні біосенсиори можуть бути використані для оцінки експресії генів, які кодують вторинні метаболічні шляхи, після генетичних маніпуляцій або зміни умов культивування. Це важливий інструмент для прискорення розвитку клітинних фабрик для фармацевтичного виробництва та для активації потенційних біосинтетичних шляхів для відкриття нових сполук у мікроорганізмах [113].

Метод мультиплексної сайт-специфічної геномної інженерії (MSGE) використовує штучні сайти attB для введення кількох копій цільових генів або біосинтетичних генних кластерів в геном актиноміцетів, таких як *Streptomyces*. Цей підхід, описаний у роботі Лі та співавторів у 2017, дозволяє підвищити виробництво природних продуктів шляхом дискретної ампліфікації BGC. Проте, метод MSGE має обмеження, такі як потреба в уведенні чужорідних сайтів attB у геном актиноміцетів та обмеження на кількість інтегрованих копій BGC через надмірне навантаження на ріст бактерій [63].

Розроблений у 2019 році метод розширеної мультиплексної сайт-специфічної геномної інженерії (aMSGE) вирішує ці проблеми. Він базується на концепції "кілька інтеграз - кілька сайтів attB", використовуючи нативні сайти attB в геномі актиноміцетів. Це дозволяє вводити кілька копій BGC без необхідності введення чужорідних сайтів attB [61].

Метод aMSGE використовує набір інструментів ампліфікації plug-and-play, який містить модульні рекомбінаційні плазмиди з однією або кількома системами сайт-специфічної рекомбінації (SSR). Він дозволяє досягти високоефективного введення кількох копій BGC в геном актиноміцетів, що

значно підвищує виробництво природних продуктів. Отже, метод aMSGE вирішує обмеження методу MSGE, спрощуючи та прискорюючи процес створення високопродуктивних штамів актинобактерій для виробництва біоактивних сполук [114].

Рефакторинг біосинтетичних генних кластерів є ключовою стратегією в синтетичній біології, спрямованою на підвищення виробництва природних продуктів за допомогою перебудови генетичного матеріалу. Він включає редизайн BGC для видалення складної природної регуляції та забезпечення точного контролю над експресією генів. Це може бути досягнуто шляхом впровадження нових регуляторних елементів і змінення структури генних кластерів [115].

Ключовими етапами рефакторингу BGC є:

Розробка нових регуляторних елементів: Для точного контролю експресії генів в BGC потрібні нові промотори, RBS (регіони зв'язування рибосом) та інші елементи. Ці елементи розробляються і випробовуються для забезпечення оптимального рівня експресії.

Методи складання ДНК: Для перебудови BGC використовуються різноманітні методи складання ДНК, які дозволяють швидко та ефективно змінювати структуру генетичного матеріалу. Ці методи включають збірку ДНК *in vitro* та *in vivo*, а також методи, що використовують рекомбінацію.

Видалення надлишкових елементів: Надлишкові BGC або інші геномні елементи, які не сприяють виробництву NP, можуть бути видалені з геному, щоб звільнити ресурси та полегшити контроль над біосинтезом.

Створення ефективних господарів: Господарі, такі як *Streptomyces*, можуть бути модифіковані з використанням рефакторингу BGC, щоб стати ефективними виробниками вторинних метаболітів. Це включає створення генетично змінених штамів зі зменшеним геномом та покращеним виробництвом NP [116].

Загалом, рефакторинг BGC є важливою стратегією для максимізації виробництва природних продуктів та дослідження їхніх потенційних застосувань у медицині, сільському господарстві та інших галузях.

Розробка надійних господарів *Streptomyces* для гетерологічної експресії клонованих генних кластерів стає все важливішою на тлі використання аналізу геному для відкриття нових лікарських засобів. Одним із найбільш вивчених модельних штамів є *S. coelicolor*, який використовується для дослідження біосинтезу антибіотиків і морфологічної диференціації. За останні десять років було розроблено ряд інструментів редагування геному та синтетичних регуляторних елементів для оптимізації гетерологічних шляхів у *S. coelicolor* [117].

На основі *S. coelicolor* M145 були створені універсальні сконструйовані штами M1146 і M1152, які містили делеції в чотирьох BGC, відповідальних за біосинтез певних антибіотиків. Ці штами виявилися ефективними для гетерологічної експресії клонованих BGC та значно підвищили виробництво антибіотиків порівняно з вихідним штамом.

Інший штам, *S. lividans* SBT5, був модифікований зі зменшеним геномом шляхом видалення BGC, що дозволило підвищити ефективність гетерологічної експресії. Це дозволило створити потужний сконструйований господар Dell4, який продуктивно виробляє вторинні метаболіти. Крім того, стратегія зменшення геному використовується для розробки немодельних штамів *Streptomyces*. Наприклад, штам SUKA5 *S. avermitilis* був модифікований зі зменшеним геномом, що покращило виробництво більш ніж 20 екзогенних вторинних метаболітів. Ці підходи використовуються для розробки ефективних штамів для гетерологічної експресії клонованих BGC і можуть мати значний вплив на виробництво біоактивних сполук у медицині та інших галузях [117].

## ВИСНОВКИ

Проаналізувавши сучасні наукові літературні джерела ми зробили наступні висновки:

1. *Streptomyces* – найбільший рід серед *Actynobacteria*, до якого належить, на момент 2023 року 699 видів. Він займає 40% від інших мікроорганізмів в ґрунті, проте може жити і в інших умовах, прикладом чого є екстремофільні та морські стрептоміцети. Їх життєвий цикл трьохстадійний — формування спор, проростання спор, розвиток міцелію, на якому потім і утворюються вторинні метаболіти. Розвиток відбувається у відповідь на несприятливі обставини.

2. Вторинні метаболіти є низькомолекулярними сполуками, які виробляються організмами, особливо мікроорганізмами, і відіграють важливу роль у захисті від конкурентів і адаптації до змін у середовищі. Ці біологічно активні молекули мають потенціал для медичного застосування, так як деякі з них проявляють антибіотичну та протипухлинну активність. Вивчення вторинних метаболітів є важливим напрямком досліджень у фармацевтиці та біотехнології для розробки нових ліків та біоактивних речовин. Для прикладу були досліджені тетрациклін (антибіотик), що виробляється *Streptomyces rimosus*, доксорубіцин (антитуморальний) з *Streptomyces peucetius* та ністатин з *Streptomyces noursei*. Ці метаболіти і досі викликають інтерес і зазнають різних модифікацій і покращень, що долають їх обмеження.

3. Сучасні технології секвенування та біоінформатики змінили наше розуміння геномів, перетворивши його на обширні бази даних з генетичних послідовностей, що відкриває нові можливості для створення біоактивних речовин і фармацевтичних препаратів. Механізми біосинтезу дуже різноманітні за генетичним упорядкуванням та шляхом, що було доведено при дослідженні наукової літератури щодо біосинтезу тетрацикліну, доксорубіцину, клавуланової кислоти та ністатину. Кластери також дуже різняться за своєю

дією і серед них є навіть ті, що впливають не тільки на свої гени, а й на сусідні кластери.

4. Генетичні маніпуляції кластерів генів біосинтезу використовуються як старі і перевірені (мутації, гетерологічні господарі), так і більш нові і цікаві (Crispr/Cas9, фагові методи, метаболічна інженерія і т.і.). З них найбільший інтерес викликає Crispr/Cas9, як найсучасніший метод генетичних маніпуляцій.

.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1-43.
2. Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and biotechnology*, 19(1), 72.
3. Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, 126708.
4. Mast, Y., & Stegmann, E. (2019). Actinomycetes: The antibiotics producers. *Antibiotics*, 8(3), 105.
5. Parra, J., Beaton, A., Seipke, R. F., Wilkinson, B., Hutchings, M. I., & Duncan, K. R. (2023). Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 76, 102385.
6. Yi, J. S., Kim, J. M., Kang, M. K., Kim, J. H., Cho, H. S., Ban, Y. H., ... & Yoon, Y. J. (2022). Whole-genome sequencing and analysis of *Streptomyces* strains producing multiple antinematode drugs. *BMC genomics*, 23(1), 610.
7. Hungund, B. S., Honnangi, S., Desai, S. S., Badiger, K., & Tennalli, G. B. (2022). Diversity and Classification of *Streptomyces*. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 89-116). Singapore: Springer Nature Singapore.
8. Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5.
9. Komaki, H. (2023). Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces*. *Microorganisms*, 11(4), 831.

10. Hasani, A., Kariminik, A., & Issazadeh, K. (2014). Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities.
11. Goredema, N., Ndowora, T., Shoko, R., & Ngadze, E. (2020). Morphological and molecular characterisation of *Streptomyces* spp. which suppress pathogenic fungi. *African Crop Science Journal*, 28(4), 555-566.
12. Chouyia, F. E., Ventrino, V., & Pepe, O. (2022). Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1035358.
13. Zotchev, S. B., Sekurova, O. N., & Katz, L. (2012). Genome-based bioprospecting of microbes for new therapeutics. *Current opinion in biotechnology*, 23(6), 941-947.
14. Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292.
15. Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., & Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS microbiology ecology*, 92(8), fiw119.
16. Jayashantha, E. (2015). Actinobacteria: Morphology, physiology, biochemistry, diversity, & industrial applications of genus Actinobacteria. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2632.5928>
17. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, 59-86.
18. Hamedi, J., Poorinmohammad, N., & Papiran, R. (2017). Growth and life cycle of Actinobacteria. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, 29-50.

19. Bobek, J., Šmídová, K., & Čihák, M. (2017). A waking review: old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. *Frontiers in microbiology*, 8, 306308.
20. Al-Joubori, B. M. (2020). Identification of novel streptomyces strains with antimicrobial and antitumour activity isolated from terrestrial habitats (Doctoral dissertation, University of Birmingham).
21. El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Current understanding on adhesion and biofilm development in actinobacteria. *International Journal of Microbiology*, 2021.
22. Koehler, S. (2014). Protective *Streptomyces* in beewolves: ecology, evolutionary history and specificity of symbiont-mediated defense in Philanthini wasps (Hymenoptera, Crabronidae) (Doctoral dissertation, Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diss., 2014).
23. Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., & Restaino, O. F. (2021). *Streptomyces* as platform for biotechnological production processes of drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 551-568.
24. Jones, S. E., & Elliot, M. A. (2018). 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Current opinion in microbiology*, 42, 25-30.
25. Hoskisson, P. A., Barona-Gómez, F., & Rozen, D. E. (2024). Phenotypic heterogeneity in *Streptomyces* colonies. *Current Opinion in Microbiology*, 78, 102448.
26. Roy, S. (2020). Growth, differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Acta Scientific Microbiology*, 3(4), 56-59.
27. Mosunova, O., Navarro-Muñoz, J. C., & Collemare, J. (2021). The biosynthesis of fungal secondary metabolites: From fundamentals to biotechnological applications. In *Encyclopedia of mycology* (pp. 458-476). Elsevier.

28. Zotchev, S. B. (2014). Genomics-based insights into the evolution of secondary metabolite biosynthesis in actinomycete bacteria. In *Evolutionary biology: genome evolution, speciation, coevolution and origin of life* (pp. 35-45). Cham: Springer International Publishing.
29. Huang, X. Q., & Dudareva, N. (2023). Plant specialized metabolism. *Current Biology*, 33(11), R473-R478.
30. Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhania, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566.
31. Bauman, K. D., Butler, K. S., Moore, B. S., & Chekan, J. R. (2021). Genome mining methods to discover bioactive natural products. *Natural Product Reports*, 38(11), 2100-2129.
32. Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 392-416.
33. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological research*, 231, 126374.
34. Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2-3), 155-176.
35. Ramachandran, R., & Schaefer, B. (2021). Tetracycline antibiotics. *ChemTexts*, 7(3), 18.
36. Bader, C. D., Nichols, A. L., Yang, D., & Shen, B. (2023). Interplay of emerging and established technologies drives innovation in natural product antibiotic discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 75, 102359.
37. Eisen, D. P. (2017). Tetracycline. In *Kucers' the use of antibiotics* (pp. 1195-1203). CRC Press.

38. Kaur, R., Rani, P., Atanasov, A. G., Alzahrani, Q., Gupta, R., Kapoor, B., ... & Chawla, P. (2022). Discovery and development of antibacterial agents: Fortuitous and designed. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 22(7), 984-1029.
39. Chukwudi, C. U. (2016). rRNA binding sites and the molecular mechanism of action of the tetracyclines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(8), 4433-4441.
40. Roberts, M. C. (2019). Tetracyclines: mode of action and their bacterial mechanisms of resistance. *Bacterial Resistance to Antibiotics—From Molecules to Man*, 101-124.
41. Dashtbani-Roozbehani, A., & Brown, M. H. (2021). Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: challenges and the quest for inhibition. *Antibiotics*, 10(12), 1502.
42. Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical pharmacology*, 133, 4-19.
43. Farzam, K., Nessel, T. A., & Quick, J. (2023). Erythromycin. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
44. Jelić, D., & Antolović, R. (2016). From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics*, 5(3), 29.
45. Ullah, I., & Ali, E. (2020). Bioavailability of antibiotics and their toxicity. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies*, 211-238.
46. Gündüz, Ö. (2016). Immunomodulation with antibiotics. *Immunomodulatory and immunosuppressive drugs in dermatology*, 19.
47. Hoshino, K., Imai, Y., Mukai, K., Hamazu, R., Ochi, K., & Hosaka, T. (2020). A putative mechanism underlying secondary metabolite overproduction by *Streptomyces* strains with a 23S rRNA mutation conferring erythromycin resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 2193-2203.

48. Sousa, F., Nascimento, C., Ferreira, D., Reis, S., & Costa, P. (2023). Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114969.
49. Song, M., He, W., Cai, S., Wang, F., Xu, W., & Xu, W. (2023). Nysfungin production improvement by UV mutagenesis in *Streptomyces noursei* D-3-14. *Catalysts*, 13(2), 247.
50. Kristanc, L., Božič, B., Jokhadar, Š. Z., Dolenc, M. S., & Gomišček, G. (2019). The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(2), 418-430.
51. Johnson, M. D. (2021). Antifungals in clinical use and the pipeline. *Infectious Disease Clinics*, 35(2), 341-371.
52. Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life sciences*, 278, 119527.
53. Masood, I., Kiani, M. H., Ahmad, M., Masood, M. I., & Sadaquat, H. (2016). Major contributions towards finding a cure for cancer through chemotherapy: a historical review. *Tumori Journal*, 102(1), 6-17.
54. Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729-741.
55. Varela-López, A., Battino, M., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., ... & Quiles, J. L. (2019). An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110834.
56. Zotchev, S. B. (2012). Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of biotechnology*, 158(4), 168-175.
57. Butt, U. D., Khan, S., Liu, X., Sharma, A., Zhang, X., & Wu, B. (2024). Present status, limitations, and prospects of using *Streptomyces* bacteria as a potential probiotic agent in aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16(2), 426-442.

58. Zorzi, V., Bertini, A., Robertson, A., Berardinelli, A., Palmisano, L., & Parrino, F. (2023). The application of advanced oxidation processes including photocatalysis-based ones for the off-flavours removal (GSM and MIB) in recirculating aquaculture systems. *Molecular Catalysis*, 551, 113616.
59. James, G., Prasannan Geetha, P., Thavarool Puthiyedathu, S., & Vattringal Jayadradhan, R. K. (2023). Applications of Actinobacteria in aquaculture: prospects and challenges. *3 Biotech*, 13(2), 42.
60. Chen, R., Wong, H. L., & Burns, B. P. (2019). New approaches to detect biosynthetic gene clusters in the environment. *Medicines*, 6(1), 32.
61. Whitford, C. M., Cruz-Morales, P., Keasling, J. D., & Weber, T. (2021). The design-build-test-learn cycle for metabolic engineering of streptomycetes. *Essays in biochemistry*, 65(2), 261-275.
62. Alanjary, M. (2018). Developing genome mining tools for the discovery of bioactive secondary metabolites (Doctoral dissertation, Universität Tübingen).
63. Liu, R., Deng, Z., & Liu, T. (2018). *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metabolic engineering*, 50, 74-84.
64. Mitousis, L., Thoma, Y., & Musiol-Kroll, E. M. (2020). An update on molecular tools for genetic engineering of actinomycetes—the source of important antibiotics and other valuable compounds. *Antibiotics*, 9(8), 494.
65. Hemmerling, F., & Piel, J. (2022). Strategies to access biosynthetic novelty in bacterial genomes for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 359-378.
66. Karimian, S., Farahmandzad, N., & Mohammadipanah, F. (2024). Manipulation and epigenetic control of silent biosynthetic pathways in actinobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(2), 1-30.
67. Wong, M., Badri, A., Gasparis, C., Belfort, G., & Koffas, M. (2021). Modular optimization in metabolic engineering. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56(6), 587-602.

68. Costa, D., Sebastián, J., Romero, C. M., Rasuk, M. C., Pereyra, J., Guerrero, D., & Álvarez, A. (2020). Nanoparticles for new pharmaceuticals: metabolites from actinobacteria. *Environmental Nanotechnology* Volume 4, 195-213.
69. Iravani, S., & Varma, R. S. (2019). Biofactories: engineered nanoparticles via genetically engineered organisms. *Green chemistry*, 21(17), 4583-4603.
70. Blanco, M. J. (2019). Building upon nature's framework: overview of key strategies toward increasing drug-like properties of natural product cyclopeptides and macrocycles. *Cyclic Peptide Design*, 203-233.
71. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Bioactive compounds of *Streptomyces*: biosynthesis to applications. *Studies in natural products chemistry*, 64, 467-491.
72. Sugai, Y., Katsuyama, Y., & Ohnishi, Y. (2016). A nitrous acid biosynthetic pathway for diazo group formation in bacteria. *Nature Chemical Biology*, 12(2), 73-75.
73. Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548-1556.
74. Xia, H., Zhan, X., Mao, X. M., & Li, Y. Q. (2020). The regulatory cascades of antibiotic production in *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 13.
75. Carrera, M. B. (2019). Unravelling the regulatory network of antibiotic production. The University of Manchester (United Kingdom).
76. Kong, D., Wang, X., Nie, J., & Niu, G. (2019). Regulation of antibiotic production by signaling molecules in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 508259.
77. Mast, Y., Stegmann, E., & Lu, Y. (2020). Regulation of antibiotic production in *Actinomycetes*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 568951.

78. Niu, G., Chater, K. F., Tian, Y., Zhang, J., & Tan, H. (2016). Specialised metabolites regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 554-573.
79. Otani, H., Udvary, D. W., & Mouncey, N. J. (2022). Comparative and pangenomic analysis of the genus *Streptomyces*. *Scientific reports*, 12(1), 18909.
80. Van Der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F., & Van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Natural product reports*, 35(6), 575-604.
81. Barreiro, C., & Martínez-Castro, M. (2019). Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1643-1658.
82. Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1017-1039.
83. Lo, R. (2019). *A systematic analysis of two-component systems of Streptomyces spp* (Doctoral dissertation). University of East Anglia.
84. Weissman, K. J. (2016). Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology. *Natural product reports*, 33(2), 203-230.
85. Risdian, C., Mozef, T., & Wink, J. (2019). Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 7(5), 124.
86. Petković, H., Lukežič, T., & Šušković, J. (2017). Biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: past, present and future directions in the development of tetracycline antibiotics. *Food technology and biotechnology*, 55(1), 3.
87. Scott, L. H. (2016). A system for the directed evolution of tetracyclines.
88. Pšeničnik, A., Slemc, L., Avbelj, M., Tome, M., Šala, M., Herron, P., ... & Petković, H. (2024). Oxytetracycline hyper-production through targeted genome reduction of *Streptomyces rimosus*. *Msystems*, e00250-24.

89. López-Agudelo, V. A., Gómez-Ríos, D., & Ramirez-Malule, H. (2021). Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: Insights from systems biology, strain engineering, and downstream processing. *Antibiotics*, 10(1), 84.
90. Pinilla, L., Toro, L. F., Laing, E., Alzate, J. F., & Ríos-Esteva, R. (2019). Comparative transcriptome analysis of *Streptomyces clavuligerus* in response to favorable and restrictive nutritional conditions. *Antibiotics*, 8(3), 96.
91. Liras, P., & Martín, J. F. (2021). *Streptomyces clavuligerus*: the omics era. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(9-10), kuab072.
92. Ferguson, N. L., Peña-Castillo, L., Moore, M. A., Bignell, D. R., & Tahlan, K. (2016). Proteomics analysis of global regulatory cascades involved in clavulanic acid production and morphological development in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 537-555.
93. Fjærvik, E., & Zotchev, S. B. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 436-443.
94. Shrestha, B., Pokhrel, A. R., Darsandhari, S., Parajuli, P., Sohng, J. K., & Pandey, R. P. (2019). Engineering *Streptomyces peucetius* for doxorubicin and daunorubicin biosynthesis. *Pharmaceuticals from Microbes: The Bioengineering Perspective*, 191-209.
95. Manteca, Á., & Yagüe, P. (2019). *Streptomyces* as a source of antimicrobials: novel approaches to activate cryptic secondary metabolite pathways. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, 119.
96. Ward, A. C., & Allenby, N. E. (2018). Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: the *Streptomyces* paradigm. *FEMS microbiology letters*, 365(24), fny240.
97. Lu, F., Hou, Y., Zhang, H., Chu, Y., Xia, H., & Tian, Y. (2017). Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *3 Biotech*, 7, 1-15.

98. Yang, Z., He, J., Wei, X., Ju, J., & Ma, J. (2020). Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 67-76.
99. Lorenzi, J. N., Lespinet, O., Leblond, P., & Thibessard, A. (2021). Subtelomeres are fast-evolving regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Microbial genomics*, 7(6), 000525.
100. Lee, N., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2019). Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*.
101. Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Kim, J. H., Cho, S., ... & Cho, B. K. (2021). Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes. *Natural Product Reports*, 38(7), 1330-1361.
102. Hug, J. J. (2020). Exploring the biosynthetic logic of myxobacterial natural products.
103. Xu, Z., Ji, L., Tang, W., Guo, L., Gao, C., Chen, X., ... & Liu, L. (2022). Metabolic engineering of *Streptomyces* to enhance the synthesis of valuable natural products. *Engineering Microbiology*, 2(2), 100022.
104. Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(8), 490-507.
105. Sun, W., Liu, H., Yin, W., Qiao, J., Zhao, X., & Liu, Y. (2022). Strategies for enhancing the homology-directed repair efficiency of CRISPR-cas systems. *The CRISPR journal*, 5(1), 7-18.
106. Meliawati, M., Schilling, C., & Schmid, J. (2021). Recent advances of Cas12a applications in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 2981-2990.
107. Hu, Y., & Li, W. (2022). Development and application of CRISPR-cas based tools. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 834646.

108. Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature biotechnology*, 38(7), 824-844.
109. Nivina, A., Yuet, K. P., Hsu, J., & Khosla, C. (2019). Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases: focus review. *Chemical reviews*, 119(24), 12524-12547.
110. Kormanec, J., Rezuchova, B., Homerova, D., Csolleiova, D., Sevcikova, B., Novakova, R., & Feckova, L. (2019). Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5463-5482.
111. Cho, S., Shin, J., & Cho, B. K. (2018). Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1089.
112. Karthik, L., Arivarasan, V. K., Vignesh, M. R., & Anitha, P. (2022). CRISPR ERA: Current Applications and Future Perspectives on Actinobacteria. *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology*, 181-202.
113. Kang, H. S., & Kim, E. S. (2021). Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 118-127.
114. Bekker, V., Dodd, A., Brady, D., & Rumbold, K. (2014). Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered*, 5(5), 293-299.
115. Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Manzo, M., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2018). Development of an efficient conjugal DNA transfer system between *Escherichia coli* and a non-sporulating *Streptomyces* strain. *Journal of microbiological methods*, 144, 60-66.
116. Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2016). *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontiers in microbiology*, 7, 178998

117. Khushboo, Kumar, P., Dubey, K. K., Usmani, Z., Sharma, M., & Gupta, V. K. (2022). Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16(1), 244-264.