

УДК 615.33:577.182.

М.В. РАБИК, Б.О. ОСТАШ, В.О. ФЕДОРЕНКО

Львівський національний університет імені Івана Франка

E-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

МЕРЕЖІ ГЕНІВ РЕГУЛЯЦІЇ ВТОРИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ АКТИНОМІЦЕТІВ: ПЛЕЙОТРОПНІ РЕГУЛЯТОРИ

Зроблено огляд сучасних досягнень в дослідженні та практичному застосуванні плейотропних генів, які регулюють продукцію антибіотиків у актиноміцетів. Розглянуто основні регуляторні механізми за участі таких генів, що виявлені у цих бактерій. Наведені в огляді приклади демонструють, що маніпулювання регуляторними системами, які впливають на синтез антибіотиків, є важливим напрямком метаболічної інженерії актиноміцетів. Крім того, вивчення цих генів є підґрунтям для розробки генно-інженерних підходів до активації «мовчазної» частини вторинного метаболізму актиноміцетів, потенціал якого щодо продукції біологічно активних сполук значно перевищує той, що вивчено за допомогою традиційного скринінгу мікроорганізмів. Крім суто практичних завдань, дослідження плейотропних регуляторних генів дасть змогу краще зрозуміти шляхи еволюції складних регуляторних систем, що координують експресію генних оперонів, кластерів і регулонів, задіяних у контролі вторинного метаболізму та морфогенезу актиноміцетів.

Ключові слова: плейотропні регулятори, двокомпонентні сигнальні системи, вторинний метаболізм, *γ*-бутиролактони, *Streptomyces*.

Вступ

Актиноміцети продукують багато промислово важливих сполук, однак вони відомі насамперед як продуценти двох третин описаних антибіотиків [1]. Біосинтез антибіотиків у цих бактерій збігається в часі та координовано регулюється із формуванням повітряного міцелію і спор [2]. Антибіотики токсичні для самих

продуцентів, їхній синтез накладає значний метаболічний тягар і відіграє важливу роль у взаємодії з іншими організмами. Тому біосинтез антибіотиків підлягає суворому генетичному контролю [3, 4]. Аналіз геному модельного об'єкта *Streptomyces coelicolor* виявив 965 білків (кодуються 12,3 % геному), більшість з яких потенційно задіяна у транскрипційній регуляції вторинного метаболізму [5]. Впливаючи на вторинний метаболізм в цілому, вони діють на двох рівнях регуляції: 1) специфічному для шляху біосинтезу певного антибіотика; 2) глобальному (плейотропному). Серед плейотропних регуляторів є чимало таких, що впливають і на морфогенез актиноміцетів. Шлях-специфічні регуляторні гени зазвичай знаходяться у кластерах структурних генів біосинтезу антибіотиків [6]. Плейотропні регулятори часто містяться поза цими кластерами і модулюють експресію шлях-специфічних генів, опосередковано впливаючи на продукцію антибіотика. Однак є й такі глобальні регулятори, що безпосередньо діють на структурні гени біосинтезу антибіотиків [7]. Вивчення процесів регуляції біосинтезу антибіотиків має як теоретичне, так і прикладне значення. Зрозумівши взаємодію між регуляторними генами і джерелами живлення, можна створювати спеціальні середовища для індукування експресії «мовчазних» кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів – тих, що не експресуються за стандартних умов ферментації [8]. Геноми актино-

© М.В. РАБИК, Б.О. ОСТАШ, В.О. ФЕДОРЕНКО, 2014

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2014. Т. 48. № 1

міцетів містять чимало таких кластерів [5, 9], і важливим завданням біотехнології стає більш повне розкриття їхнього біосинтетичного потенціалу. Маніпулювання регуляторними генами є одним із способів активації мовчазних кластерів. Крім того, вони набувають важливого значення у створенні промислових надпродуцентів відомих антибіотиків. Інший аспект вивчення регуляції – чи можна ті закономірності регуляції, що досліджені у *S. coelicolor* та інших модельних об'єктів, переносити на регуляцію продукції вторинних метаболітів в усіх стрептоміцетів, а також використовувати для підвищення продукції відомих сполук та виявлення нових. Зокрема це стосується мікроорганізмів, у яких кластери генів синтезу антибіотиків не містять шлях-специфічних регуляторів, як у випадку кластера генів біосинтезу моюноміцину А (ММА; *moe*-кластер) *S. ghanaensis*, еритроміцину (*ery*-кластер) у *Saccharopolyspora erythraea* [7, 10]. Для дослідження регуляції таких нетипових кластерів доцільно дослідити вплив плейотропних регуляторів на синтез. Щоб оцінити їхню можливу роль у регуляції вторинного метаболізму, використовують метод титрування промоторів для дослідження того, чи гени таких кластерів підлягають впливу транскрипційних регуляторів. Наприклад, за допомогою методу титрування вивчено промотори двох ключових генів біосинтезу ММА – *moeO5* та *moeE*, які контролюють перші кроки біосинтезу моюноміцину А у *S. ghanaensis* [10]. Титрування згаданих промоторів показало, що ці гени підлягають транскрипційній регуляції, де панівна роль належить позитивним регуляторам, оскільки введення великої кількості копій промоторів призводить до падіння рівня продукції моюноміцинів [11]. Отже виявивши, що гени у кластері регулюються певними регуляторами, можна використовувати генетичні маніпуляції з цими регуляторними генами для створення штамів надпродуцентів.

Плейотропні гени-регулятори, які координують морфогенез і синтез антибіотиків

Першими серед плейотропних генів, мутації яких зумовлюють припинення синтезу антибіотиків і втрату здатності утворювати повітряний міцелій, описані *bld*-гени (від англ. *bald* – лисий) у *S. coelicolor* [12]. Ідентифіковано

понад 10 *bld*-локусів *S. coelicolor*, зокрема, *bldA-D*, *bldF-H*, *bldI*, *bld261(J)*, *bldM* і *bldN* [13, 14]. Ці гени кодують різноманітні продукти, включаючи тРНК (*bldA*), мембранний транспортер (*bldK*), σ -фактор (*bldN*), анти-анти- σ -фактор (*bldG*) і численні транскрипційні фактори (*bldH*; *bldB*; *bldD*) [15–20]. Гомологи *bld*-генів виявлено в геномах інших актиноміцетів [11, 21, 22]. Наприклад, у *S. erythraea* BldD регулює біосинтез еритроміцину, взаємодіючи з промоторами генів *ery*-кластера [7].

Спільною рисою всіх *bld*-мутантів є втрата здатності синтезувати та секретувати гідрофобний пептид SapB – сурфактант, який забезпечує подолання поверхневого натягу та підняття повітряних гіфів над поверхнею твердого середовища [23]. Формування повітряного міцелію може відновлюватися у Bld⁻колоній, які ростуть поблизу тих колоній, що продукують SapB. Це явище також спостерігається при рості у безпосередній близькості певних пар *bld*-мутантів і свідчить про те, що *bld*-гени прямо чи опосередковано регулюють продукцію білка SapB [14, 22]. За допомогою комплементарних тестів встановлено ієрархію *bld*-генів, яка ґрунтується на здатності одних *bld*-мутантів відновлювати формування повітряного міцелію в інших *bld*-мутантів – *bldJ* < *bldK/bldL* < *bldA/bldH* < *bldG* < *bldC* < *bldD/bldM*, проте деякі гени, зокрема *bldB* і *bldN*, не належать до жодної з цих груп комплементарності [22].

BldK – один з перших білків у сигнальному каскаді, що регулює формування SapB [15]. Його продуктом є ABC-транспортер, що переносить в клітини сигнальну молекулу – олігопептид, який «вмикає» експресію каскаду *bld*-генів [24]. Локус *bldG* містить два гени – *bldG* і *orf3*, які кодують відповідно анти-анти- σ -фактор та анти- σ -фактор, що задіяні у транскрипцію генів біосинтезу антибіотиків і споруляції [17]. Ген *bldD* кодує білок, розміщений у кінці сигнального каскаду. Його продукт – ключовий репресор генів морфологічної диференціації та антибіотикоутворення протягом вегетативного розвитку. Регулон, який «обслуговує» BldD, включає 167 транскрипційних одиниць, серед яких більше 20 відіграють важливу роль у морфологічному розвитку актиноміцетів (*bldA*, *bldC*, *bldH/adpA*, *bldM*, *bldN*, *ssgA*, *ssgB*, *ftsZ*, *whiB*, *whiG*) і вторинному метаболізмі (*nsdA*, *bldA*, *bldC*)

[25]. Ген *bldN* кодує σ -фактор, який належить до субродини ECF σ -факторів РНК-полімераз. Експресія гена *bldN* залежить від продуктів генів *bldG*, *bldH* і *bldD*. Його транскрипція практично не відбувається протягом вегетативного росту, але досягає найвищого рівня під час формування повітряного міцелію [20]. Таким чином, цей σ -фактор забезпечує експресію генів, необхідних для морфологічної диференціації актиноміцетів і вторинного метаболізму в стаціонарній фазі розвитку.

Найбільш вивченим з *bld*-генів є *bldA*, який кодує лейцил-тРНК, що зчитує кодон UUA мРНК [16, 26]. UUA є одним із шести лейцинових кодонів. Для актиноміцетів він особливий, бо в G+C-багатій ДНК цих бактерій кодони TTA зустрічаються рідко [27–29]. Тільки 145 з 7825 хромосомних генів *S. coelicolor* містять TTA-кодони. Більшість з цих генів містять тільки один TTA-кодон, натомість в 10 генах є два таких кодони. Вважають, що ген *bldA* регулює трансляцію мРНК генів, які містять TTA-кодон і, очевидно, контролюють морфогенез та антибіотикоутворення [30]. Однак роль у первинному та вторинному метаболізмі *S. coelicolor* досліджено лише в декількох TTA-вмісних генів. Ген *bldH* також містить TTA-кодон. Коли ж його замінили на інший лейциновий кодон, то *bldA*-мутант формувал повітряний міцелій і спори. Нещодавно виявлено взаємодію між *bldH* та геном *absB*, який у *S. coelicolor* кодує РНКазу III. Вона гідролізує транскрипти гена *bldH*, зменшуючи його експресію. У свою чергу BldH впливає на функціонування AbsB, стимулюючи його деградацію і, ймовірно, активуючи експресію неідентифікованих генів протеаз [45]. Ген *adpA* *S. griseus*, гомолог *bldH*, кодує ключовий регулятор із множинними функціями [31]. Його регулон налічує понад 500 генів, і ген *bldA* *S. griseus* також є мішенню AdpA [32].

Мало вивченою особливістю *bld*-мутантів є їхня здатність відновлювати морфологічні і фізіологічні ознаки дикого типу при рості на різних джерелах вуглецю. Мутанти *bldA*, *bldD*, *bldG* утворюють нормальний повітряний міцелій, але не синтезують антибіотики при додаванні в середовище манітолу замість глюкози [18]. Водночас за цих умов мутант *bldH* повністю відновлює обидва фенотипи. Однак му-

тація в гені *bldB* блокує формування повітряного міцелію і синтез антибіотиків незалежно від умов культивування. Мутантам за геном *bldB* властиві порушення вуглецевої катаболітної репресії – в них експресуються гени, які у нормі пригнічені за наявності глюкози. Цікавим фактом є те, що гомологи гена *bldB* виявляються тільки у актиноміцетів, які формують повітряний міцелій [33]. Плейотропність мутацій гена *bldB*, а також наявність ДНК-зв'язувального мотиву типу «спіраль – поворот – спіраль» у білка BldB наштотує на думку, що він контролює експресію генів [18, 33].

Отже, в каскаді *bld*-генів *S. coelicolor* один кодує синтез специфічної сигнальної молекули (імовірно, олігопептид), а інші – білкові продукти, задіяні у його сприйманні та передачі сигналу, необхідного для координованого переходу у стаціонарну фазу і дальшого морфологічного розвитку та синтезу вторинних метаболітів. Вважають, що *bld*-каскад дає змогу стрептоміцетам адаптуватись до мінливих умов середовища, зокрема, наявністю різних поживних речовин [34].

Здійснюючи генетичні маніпуляції з *bld*-генами, можна досягти підвищення рівня продукції антибіотиків у актиноміцетів. Наприклад, надекспресія *bldA_{gh}* у *S. ghanaensis* спричиняє збільшення продукції меноміцинів у три рази порівняно з вихідним штамом [35].

Регуляція синтезу антибіотиків за допомогою бактерійних гормонів

Серед факторів, що регулюють синтез антибіотиків і морфогенез в актиноміцетів, важливу роль відіграють γ -бутиролактонні авторегулятори, які діють як зовнішньоклітинні сигнальні молекули. Залежно від структурних відмінностей С-2 бокового ланцюга сполуки їх класифікували у три типи: 1) вірджиніабутаноліди *S. virginiae* (VB-A, B, C, D, E) з α -гідроксильною групою; 2) IM2-подібні сполуки *S. lavendulae*, що містять β -гідроксил у шостому положенні; 3) А-фактор-подібні речовини, які містять β -кетогрупу (А-фактор із *S. griseus* і сполуки *S. coelicolor* SCB1 і SCB2) (рис. 1) [36, 37]. Ці авторегулятори виробляються гіфами у відповідь на сигнали із зовнішнього середовища. Сигнальні молекули можуть поширюватися по одній гіфі або проникати у сусідні гіфи. Отже,

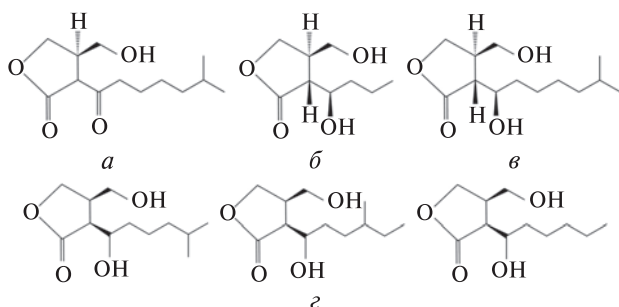


Рис. 1. Структурні формули представників трьох груп γ -бутиролактонів, виявлених у різних штамів стрептоміцетів – продуцентів антибіотиків: *a* – А-фактор *S. griseus*; *b* – ІМ-2 *S. lavendulae*; *v* – фактор І *S. viridochromogenes*; *z* – вірджиніабутаноліди *S. virginiae*

актиноміцети розвинули систему низькомолекулярних регуляторів, здатних до дифузії, що сприяє комунікації у межах однієї гіфи або між різними гіфами [36]. Перший такий авторегулятор – А-фактор (2-ізокаприлоїл-3*R*-гідроксиметил- γ -бутиролактон) виявлено у *S. griseus* як індуктор синтезу стрептоміцину і формування повітряного міцелію [36]. А-фактор також контролює синтез пігментів – жовтого гріксазону і меланін-подібного гексагідроксипериленехінону. AfsA здійснює синтез А-фактора шляхом конденсації похідних гліцеролу та β -кетокислот [38, 39]. Ген *afsA* знаходиться на відстані 272 п.н. від одного з кінців лінійної хромосоми *S. griseus*, що зумовлює високу нестабільність синтезу А-фактора [36]. На кінцях хромосом актиноміцетів часто відбуваються делеції внаслідок рекомбінації між розміщеними там повтореннями нуклеотидних послідовностей. Мутанти *afsA* *S. griseus* не утворюють повітряного міцелію і не синтезують вторинних метаболітів [40].

Роль ключового «гравця» у регуляторному каскаді, залежному від А-фактора, виконує білок AgrA, що зв'язує його. AgrA репресує промотор гена *adpA* за відсутності А-фактора. Ген *adpA* кодує транскрипційний фактор з родини AraC/XylS, який активує ген *strR* шлях-специфічного регулятора біосинтезу стрептоміцину. Позитивний регулятор SrtR у свою чергу активує транскрипцію генів біосинтезу стрептоміцину [36]. Зв'язуючись з AgrA, А-фактор зумовлює дерепресію гена *adpA*. Оскільки AgrA репресує гени, що контролюють формування повіт-

ряного міцелію і вторинний метаболізм, *arpA*-мутанти швидше, ніж дикий тип, переходять до утворення повітряних гіф і синтезують підвищені кількості антибіотика [41, 42]. Мутанти зі зруйнованим геном *adpA* не синтезують антибіотик, а його надекспресія спричиняє більш ранній початок синтезу і нагромадження більшої кількості антибіотика [43]. Припускають, що А-фактор є основним активатором продукції більшості, якщо не усіх, вторинних метаболітів і формування повітряного міцелію у *S. griseus* [44]. В інших стрептоміцетів такий зв'язок втрачений, наприклад *bldH*, гомолог гена *adpA* у *S. coelicolor*, також регулює морфогенез і вторинний метаболізм, але не регулюється γ -бутиролактоном [28].

Штам *S. coelicolor* A3(2) продукує декілька γ -бутиролактонів [46, 47], які можуть відновлювати синтез стрептоміцину у мутантів *S. griseus*, дефектних за синтезом А-фактора, проте жодна з цих сполук не індукує морфологічної диференціації. Продукт гена *scbA*, який задіяний в синтезі нещодавно виявленого γ -бутиролактона *S. coelicolor* – SCB1, гомологічний до інших білків синтезу бутиролактонів (AfsA *S. griseus*, BarX *S. virginiae* і FarX *S. lavendulae* FRI-5) [48]. Імовірно, крім участі у синтезі гормону, він виконує очевидно і регуляторну функцію [48, 49]. Дивергентно розміщений ген *scbR* кодує білок-гомолог AgrA. ScbR властива ДНК- і SCB1-зв'язувальна активність. Він також, імовірно, задіяний у білок-білкових взаємодіях. Цей регулятор зв'язується з промоторними ділянками генів *scbA* і *scbR*, у такий спосіб здійснюючи свою репресорну функцію.

Запропоновано модель регуляції за участі бутиролактона SCB1 (рис. 2). ScbR під час експоненційної фази росту *S. coelicolor* репресує транскрипцію *scbA* та власного гена. Проте, експресія *scbA* на базальному рівні все ж відбувається, і до моменту переходу у стаціонарну фазу росту накопичується достатньо ScbA. Відбувається формування білкового комплексу ScbA – ScbR, який активує транскрипцію гена *scbA*. Нагромадившись, SCB1 приєднується до ScbR, перешкоджаючи його зв'язуванню із власним промотором, та інактивує комплекс ScbA – ScbR. Це зумовлює зменшення рівня транскрипції гена *scbA*. Імовірно, ScbR здійснює репресію

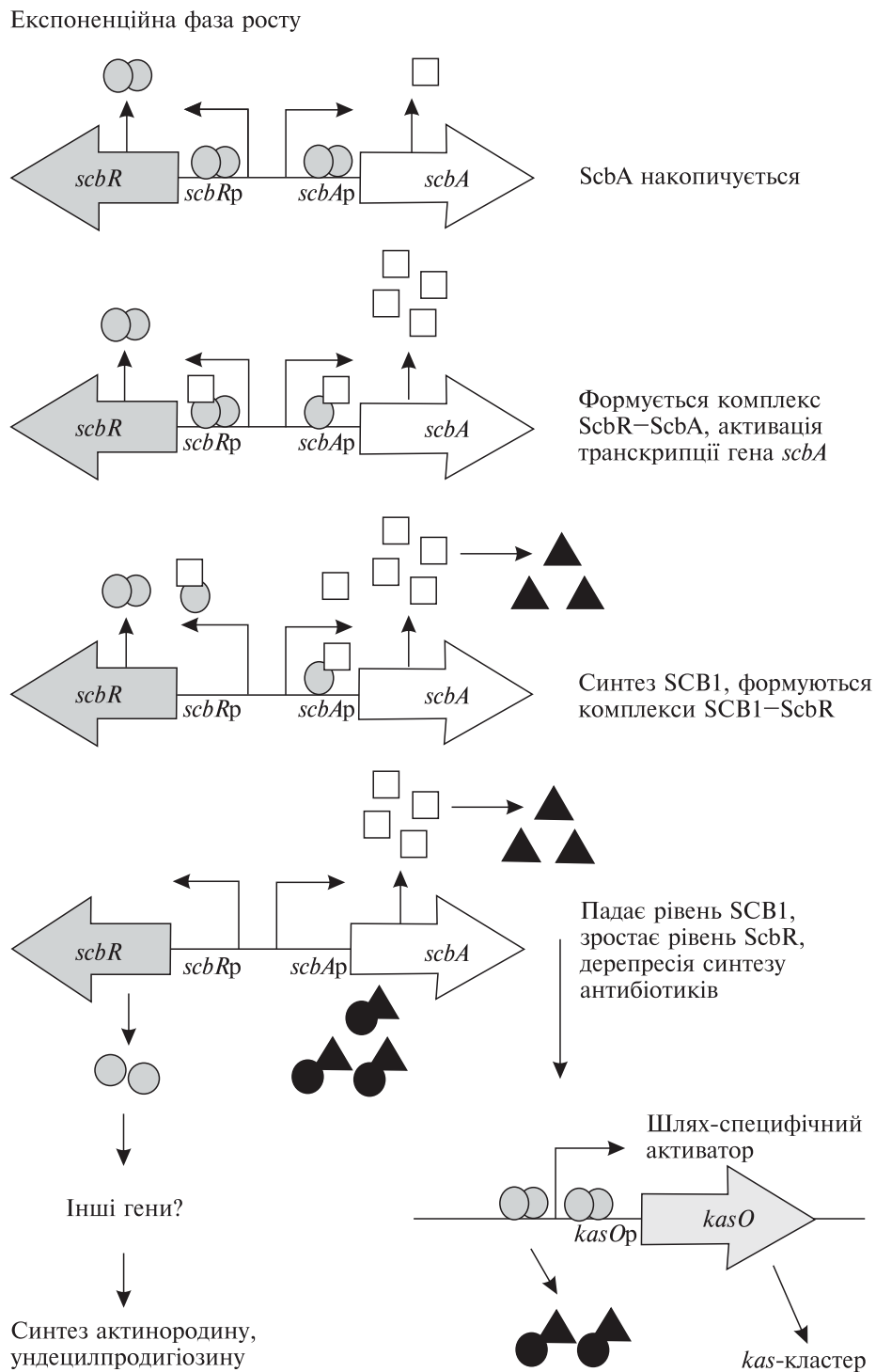


Рис. 2. Схематична модель регуляції вторинного метаболізму *S. coelicolor* за допомогою SCB1-бутиролактону (деталі у тексті): ScbR – коло, ScbA – білий квадрат, γ -бутиролактон – трикутник, комплекс ScbR–SCB1 – чорне коло із трикутником, *scbRp*, *scbAp* та *kasOp* – промотори генів *scbR*, *scbA*, *kasO* відповідно

наразі неідентифікованого репресора продукції антибіотиків у *S. coelicolor*. Отже падіння рівня SCB1, очевидно внаслідок дифузії, а також високий рівень білка ScbR призводять до депресії синтезу антибіотиків [37]. Виходячи з цієї запропонованої моделі стає зрозуміло, що делеція *scbA* зумовлює передчасну надпродукцію ундецилпродигіозину і актинородину, оскільки у мутантів *scbA* базальний рівень ScbR достатній для того, щоб відбувався надсинтез цих сполук [48]. Відповідно, делеція *scbR* призводить до затримання їхнього синтезу [37].

Ідентифіковано ще одну мішень дії білка ScbR – ген *kasO*, продукт якого є гомологом шлях-специфічних регуляторних білків SARP-родини (від *Streptomyces antibiotic regulatory protein*) і активує експресію криптичного кластера генів синтезу полікетиду. Отже, γ -бутиролактони можуть також безпосередньо впливати й на шлях-специфічні регуляторні гени у кластерах генів біосинтезу антибіотиків [50].

Роль гуанозинтетрафосфату (ppGpp) в ініціації вторинного метаболізму у стрептоміцетів

Існує зв'язок між швидкістю росту актиноміцетів та біосинтезом вторинних метаболітів. Затримка росту є сигналом для початку синтезу антибіотиків. У *S. coelicolor* транскрипція шлях-специфічних регуляторних генів *redD* і *actII-ORF4* корелює із появою ppGpp. В *E. coli* (p)ppGpp синтезується з АТФ і ГТФ за участі ppGpp-синтетази RelA, зв'язаної із рибосомами, яка активується, коли неацильована тРНК потрапляє в А-сайт рибосоми [51]. Для активації RelA необхідний білок L11 (RelC) 50S субодиниці рибосоми. Поява (p)ppGpp корелює зі зменшенням рівня транскрипції багатьох генів, необхідних для швидкого росту, і зростанням рівня транскрипції тих, що активні у стаціонарній фазі росту та при інших фізіологічних стресах. Припускають, що ppGpp може впливати на спорідненість РНК-полімерирази до промоторів цих генів [51]. Зниження рівня синтезу антибіотиків, яке часто спостерігається у *relC*-мутантів деяких стрептоміцетів, імовірно, є результатом синтезу дефектного білка L11. У *S. coelicolor* *relA*-мутанти із непошкодженим доменом, що відповідає за синтез ppGpp, не синтезують антибіотики, але зберігають залишкову активність RelA. Делеція *relA*

має вибірковий вплив на синтез антибіотиків залежно від складу поживного середовища, зокрема ppGpp необхідний для активації синтезу вторинних метаболітів у відповідь на азотне голодування [52–54]. Інактивація гена *relA* у *S. clavuligerus* зумовлює зростання синтезу клавуланової кислоти та цефаміцину С. Мутанти *relA* *S. clavuligerus* не можуть формувати повітряний міцелій і спорувати [55]. Натомість надекспресія *relA* у *S. ghanaensis* веде до зростання продукції моюніцину А [11]. Отже, ppGpp виявляє як позитивний, так і негативний вплив на синтез антибіотиків. У *S. coelicolor* і *S. antibioticus*, але не в *E. coli*, (p)ppGpp інгібує полінуклеотидфосфорилазу, яка розщеплює РНК, підвищуючи стабільність клітинних мРНК [56].

Регуляція біосинтезу антибіотиків в актиноміцетів за участі джерел живлення

Синтез вторинних метаболітів, як правило, відбувається у стаціонарній фазі росту актиноміцетів і зумовлений виснаженням джерел живлення або зменшенням швидкості росту [3, 28, 57–60].

Глутамат та N-ацетилглюкозамін – важливі джерела карбону та нітрогену для актиноміцетів, зокрема у *S. coelicolor* вони засвоюються швидше, ніж глюкоза [8]. Глюкозамін-6-фосфат – один з метаболітів, що утворюється при засвоєнні N-ацетилглюкозаміну, є основним попередником синтезу клітинної стінки і водночас мономером хітину. При додаванні N-ацетилглюкозаміну у концентраціях 5–10 мМ інгібуються морфологічна диференціація та біосинтез антибіотиків за наявності інших джерел карбону. За їх відсутності спостерігається зворотний ефект. N-ацетилглюкозамін по-різному впливає на морфологічний розвиток та вторинний метаболізм залежно від його походження. Коли джерелом N-ацетилглюкозаміну є хітин (на багатих середовищах), то синтез антибіотиків і споруляція пригнічується. Натомість за дефіциту поживних речовин у середовищі N-ацетилглюкозамін, що утворився внаслідок лізису клітинної стінки, стимулює розвиток повітряного міцелію і продукцію вторинних метаболітів. Важливу роль у цьому процесі відіграє глобальний регулятор DasR, що належить до GntR-родини регуляторних білків.

Він регулює гени транспортування і метаболізму N-ацетилглюкозаміну, а також продукції антибіотиків [58, 61]. DasR зв'язується з промотором шлях-специфічного регуляторного гена біосинтезу актинородину *actII-ORF4* і впливає на транскрипцію генів біосинтезу ундецилпродегіозину та кальцій-залежного антибіотика в *S. coelicolor* A3(2). На мінімальному середовищі у *dasR*-мутантів *S. coelicolor* спостерігається збільшення рівня транскрипції генів усіх відомих кластерів вторинного метаболізму (*act*-, *cda*-, *red*- та криптичних *cpk*-генів). Глюкозамін-6-фосфат – продукт метаболізму N-ацетилглюкозаміну, зв'язуючись з DasR, зменшує його спорідненість до ДНК і у такий спосіб інактивує репресорну функцію цього білка [61].

Експресія генів біосинтезу антибіотиків негативно регулюється фосфатом: транскрипція відповідних генів здійснюється за умов його обмеженої кількості [62]. Ключову роль у фосфатній регуляції відіграє двокомпонентна сигнальна система PhoR/P. PhoR – це трансмембранний сенсорний білок, а PhoP належить до OmpR-родини білків із типовим доменом зв'язування ДНК «спіраль – поворот – спіраль» на С-кінці [62].

Мутанти *phoR-phoP* *S. lividans* не здатні синтезувати лужну фосфатазу, яка кодується геном *phoA*, та не ростуть на мінімальному середовищі з 10 мкМ неорганічного фосфату, тоді як за такої низької концентрації дикий тип *S. lividans* росте добре. *S. lividans* містить кластер *act*, але на відміну від *S. coelicolor* не синтезує актинородину. Коли мутанти Δ *phoP* та Δ *phoRP* вирощували у рідкому середовищі з низькою концентрацією фосфору, вони синтезували збільшені кількості актинородину. За надлишку фосфору у середовищі біосинтез актинородину зменшувався, отже при високій концентрації фосфору регуляторний ефект PhoR-PhoP оминається [62]. Як уже зазначалося, білок PhoP є коактиватором транскрипції гена *afsS*, який у свою чергу активує біосинтез актинородину та ундецилпродегіозину. Отже, система *phoR-phoP* відіграє важливу роль у регуляції біосинтезу вторинних метаболітів, виконуючи роль посередника між зовнішнім і внутрішньоклітинним середовищем (рис. 3).

У *S. lividans* ген *ppk* кодує поліфосфаткіназу. Його гомологи виявлено і у *S. coelicolor* та інших актиноміцетів. Коли *S. lividans* росте на багатому середовищі, то протягом розвитку субстратного міцелію метаболізм дуже активний і синтезується надлишок АТФ. При цьому Ppk перетворює АТФ у поліфосфат. Він може розкладатися до фосфатних мономерів під дією екзополіфосфатази і слугує джерелом фосфату протягом розвитку повітряного міцелію. Цей фермент також здатний каталізувати синтез АТФ за надлишку АДФ [63]. При рості *S. lividans* ТК24 за умов надлишку фосфору експресія *ppk* слабка. За таких умов експресія *ppk* може репресуватися. Експресія гена імовірно репресора стимулюється АТФ, отже АТФ є корепресором *ppk*. Відповідно, коли концентрація фосфору в середовищі зменшується, внутрішньоклітинна концентрація АТФ теж зменшується.

Це спричиняє часткову дерепресію *ppk*. Синтез ендогенного фосфату очевидно затримує експресію генів Pho-регулона. Мутанти за геном *ppk* не синтезують поліфосфату, мають більшу нестачу фосфату, ніж дикий тип. Нестача фосфору зумовлює зростання синтезу вторинних метаболітів, наприклад актинородину, при цьому зростає експресія шлях-специфічного позитивного регулятора *act*-генів *actII-ORF4*, хоча точний механізм цього явища не встановлений [64, 65].

Джерела нітрогену також є важливими для початку синтезу вторинних метаболітів у актиноміцетів. Основну роль у метаболізмі нітрогену у *S. coelicolor* відіграють два гени глутаматсинтетази: *glnA*, що кодує глутаматсинтетазу типу I та *glnII* – типу II [66]. Регуляція активності ензиму типу I відбувається на транскрипційному та посттрансляційному рівнях [67]. Цей фермент бере участь у синтезі глутамату та глутаміну – основних джерел азоту у клітині. Аденілтрансфераза GlnE за умов високої концентрації амонію аденілює глутаматсинтетазу GlnA, інактивуючи її. GlnE може здійснювати також зворотну реакцію. Транскрипція *glnA* здійснюється регулятором GlnR, який належить до родини OmpR-регуляторів. GlnR активує експресію *glnA*, *glnII*, генів транспортера амонію *amtB* та нітритредуктази *nirB* за умов нестачі нітрогену [68].

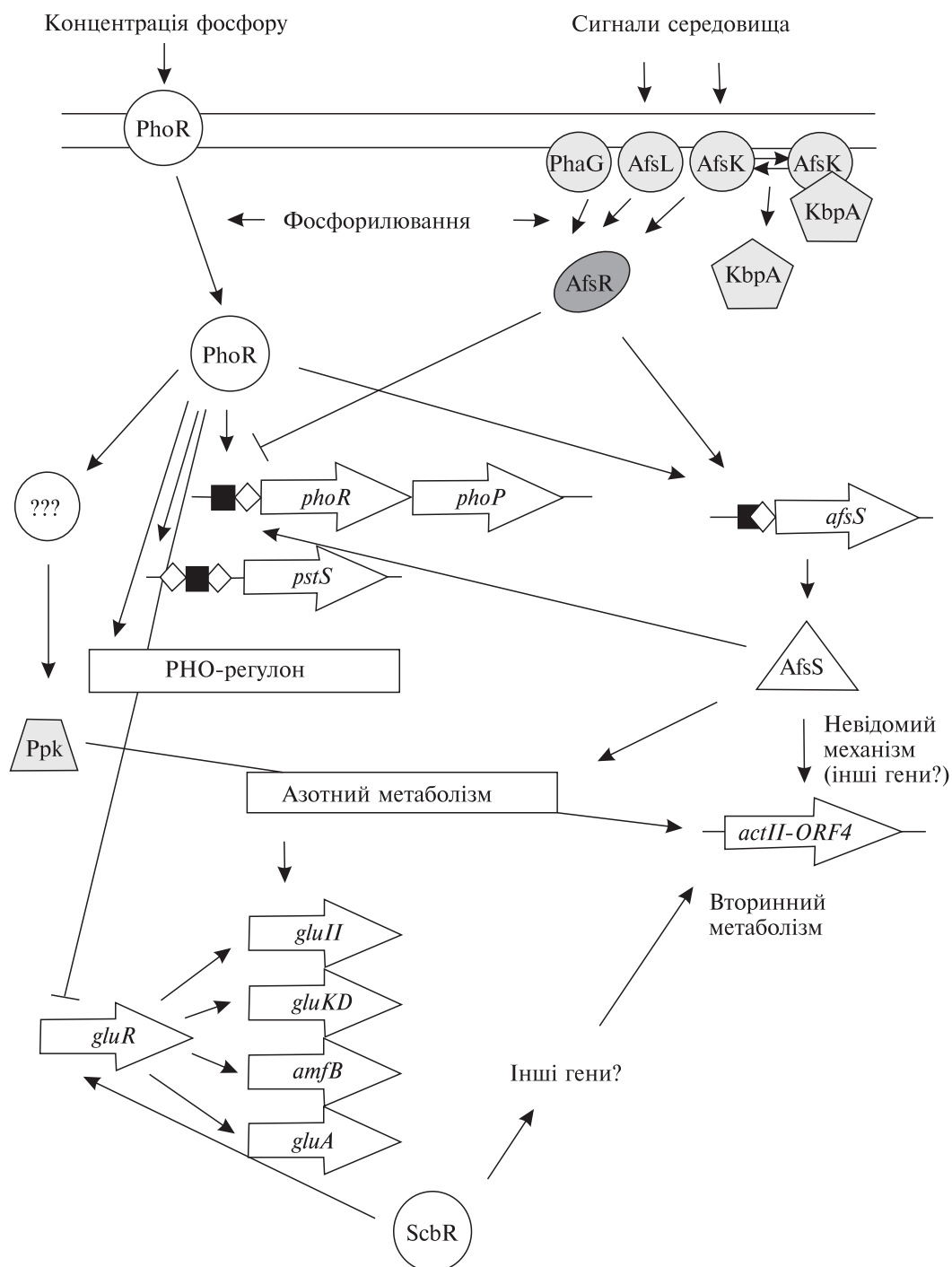


Рис. 3. Регуляторні мережі *S. coelicolor* PhoP-PhoR та AfsK-AfsR-AfsS та їхній взаємозв'язок. Показано взаємопов'язаність фосфатного та азотного метаболізму, вплив регулятора ScbR та ключову роль AfsS у сприйнятті та передачі сигналів із зовнішнього середовища на шлях-специфічні регуляторні гени, зокрема *actII-ORF4* (деталі у тексті). PHO-бокси представлені на схемі квадратами, а сайти зв'язування AfsR – ромбами, стрілки символізують активаторну функцію, лінії із поперечними перегородками – репресорну. Модифіковано на основі [77]

Метаболізм нітрогену підлягає негативній регуляції з боку фосфату [59]. Цей контроль здійснюється завдяки безпосередньому зв'язуванню ключового регулятора метаболізму фосфату PhoP із промотором *glnR*, так впливаючи на експресію генів метаболізму нітрогену.

Інші гени, що мають плейотропний вплив на біосинтез вторинних метаболітів

Незважаючи на велику різноманітність зовнішньоклітинних сигналів, для їхньої передачі у клітину використовується порівняно невелика кількість механізмів. Одним із фундаментальних механізмів є фосфорилування білків [69]. У прокаріотичних системах типовим є механізм сигнальної трансдукції, при якому відбувається фосфорилування залишків гістидину та аспарагіну [69, 70]. Деякі бактерії (*Streptomyces*, *Mycobacterium*, окремі представники ціанобактерій) також володіють механізмом фосфорилування залишків серину, треоніну та тирозину, який характерний для еукаріотів [71]. Наявність численних ДСС, які використовують два механізми сигнальної трансдукції, у цих бактерій пояснюється їхнім складним життєвим циклом (що включає морфологічну та фізіологічну диференціацію), розвинутою міжклітинною комунікацією.

Однією із перших, виявлених у *S. coelicolor*, була ДСС AbsA1/2, яка складається з сенсорної кінази (СК) AbsA1 – регуляторного білка-ефектора (РБЕ) AbsA2. Гени *absA1* та *absA2* знаходяться в межах кластера генів синтезу кальцій-залежного антибіотика (CDA), але вони впливають на синтез чотирьох антибіотиків, хоча не задіяні в морфогенезі. У фосфорильованій формі AbsA2 репресує біосинтез антибіотиків, оскільки делеція *absA1* чи *absA2* зумовлювала підвищену продукцію антибіотика [72]. Описано точкові мутації в гені *absA1*, що підвищують кіназну або фосфатазну активності AbsA1, зумовлюючи гіперрепресію або активацію синтезу антибіотика відповідно. Ідентифіковано три мішені білка AbsA2, це промотори генів *redZ*, *cdaR*, *actII-ORF4*. Зв'язування AbsA2 із мішенями посилювалося, коли білок був у фосфорильованій формі [72]. Тоді як у *S. coelicolor* ця ДСС є одним з ключових репресорів продукції антибіотиків, у *S. ghanaensis* гени *absA_{gh}1/2* необов'язкові для регуляції продук-

ції ММА. Негативний ефект на синтез антибіотиків спостерігається при надекспресії гена *absA2_{gh}*, а при його руйнуванні не виявлено жодних змін у продукції ММА та морфології (М. Рабик, неопубліковані дані).

У *S. coelicolor* і *S. griseus* серин/треонін-кіназа AfsK і її мішень – білок AfsR – контролюють вторинний метаболізм і морфогенез. Надекспресія *afsR* зумовлює надпродукцію актинородину, ундецилпродигіозину та А-фактора у *S. lividans*, який не накопичує їх за звичайних лабораторних умов [36]. Нокаут *afsR* викликає значну, проте не повну втрату продукції антибіотиків. Варто зазначити, що позитивний ефект AfsR на продукцію антибіотиків спостерігається за умов обмеженої і достатньої концентрації фосфату [73]. За N-кінцевою частиною AfsR подібний до шлях-специфічних активаторів транскрипції ActII-ORF4, RedD, DnrI та CsaR [74]. Біля *afsR* виявлено ген *afsK*, що кодує гомолог еукаріотичних протеїнкіназ. Кіназа AfsK фосфорилує залишок треоніну в AfsR [36]. Фосфорилування важливе для функціонування AfsR, оскільки делеція *afsK* призводить до значного падіння синтезу актинородину, проте воно не таке сильне, як у мутантів *afsR*.

Це можна пояснити наявністю додаткових протеїнкіназ (PkaG, AfsL), які фосфорилують AfsR за відсутності AfsK [75]. Припускають, що автофосфорилування AfsK залежить від рівня S-аденозил-L-метіоніну – імовірного міжклітинного сигнального фактора [76]. Встановлено, що KbpA (від англ. AfsK-binding protein Δ) зв'язується із каталітичним доменом нефосфорильованого AfsK і так інгібує автофосфорилування AfsK. Оскільки протягом росту культури *afsK* транскрибується конститутивно, KbpA, відповідно, зупиняє необмежений синтез антибіотика, який запускається системою AfsK–AfsR [36].

Головною мішенню дії AfsR є ген *afsS*. Він кодує невеликий (63 а/к) білок, надекспресія якого підвищує продукцію антибіотиків у *S. coelicolor* і *S. lividans*. У *S. ghanaensis* *afsS* також задіяний у позитивній регуляції синтезу моюміцину А – гетерологічна надекспресія цього гена із *S. coelicolor* спричиняє зростання продукції антибіотика [11]. Точний механізм функціонування AfsS досі невідомий. Припускають,

що він відіграє роль своєрідного шаперона, який взаємодіє з іншими регуляторами [36].

У промоторі гена *afsS* виявлено ділянку зв'язування головного регулятора метаболізму фосфатів PhoP, які перекриваються з сайтом зв'язування AfsR. Нещодавні дослідження показали, що ці два регулятори є конкурентними активаторами транскрипції *afsS*. Очевидно, що таким чином здійснюється інтеграція різних сигналів із зовнішнього середовища на ключовий регуляторний ген [77]. Перехресну регуляцію систем PhoR–PhoP та AfsK–AfsR–AfsS детально досліджено нещодавно. Автори порівняли транскриптомні профілі дикого типу та мутантних штамів Δ *afsS* у рідкій культурі і виявили, що AfsS позитивно контролює деякі гени РНО-регулона, включаючи систему *phoRP* [78]. Отже, AfsS виявляє протилежний ефект на експресію генів РНО-регулона, ніж AfsR, який репресує гени РНО-регулона (рис. 3).

Низка мутантів *S. coelicolor* за синтезом антибіотиків містять мутації у локусі *absB*. Ген *absB S. coelicolor* – гомолог *rnc E. coli*, що кодує РНКазу III, яка здійснює процесинг певних дволанцюгових РНК і так регулює експресію бактерійних та фагових генів [79]. Місенс-мутація *absB120* сильно знижує рівень транскрипції *act-* і *red-*генів *S. coelicolor* [79, 80]. Додаткові копії генів шлях-специфічної регуляції *actIII-orf4* і *redD* відновлювали біосинтез відповідних сполук. Ще не встановлено, чи AbsB безпосередньо регулює експресію структурних генів за допомогою специфічного процесингу РНК, чи дефект експресії генів є непрямим наслідком. У *absB*-мутантів *S. coelicolor* накопичуються попередники 30S рРНК, які не виявляються в штамів дикого типу [79]. Отже, РНКазу III задіяна не лише в процесингу мРНК, а й рРНК. В *E. coli* та *S. coelicolor* вона процесує власну 5'-лідерну послідовність [81]. AbsB також незначно впливає на морфогенез [45].

Відкриття нових плейотропних регуляторів у *S. coelicolor* триває. Наприклад, виявлено TetR-подібний регулятор AtrA, що специфічно активує біосинтез актинородину, безпосередньо зв'язуючись із промотором *actII-orf4* [82]. Сайти зв'язування AtrA виявлені у *cda*-кластері синтезу КЗА [8], у промоторі гена пермеази *nagE2* [83], а надекспресія *atrA* супресує ін-

гібуючий ефект мутантних алелів *absA1* [8]. Його гомолог в *S. avermitilis*, AveI, функціонує як негативний регулятор. Відомо, що білки родини TetR можуть функціонувати і як активатори, і як репресори [84]. AtrA-подібні білки виконують ці функції залежно від виду стрептоміцета, що вказує на гнучкість їхньої функції [85]. Проте введення додаткових копій гена *atrA_{gh}* не приводить до змін в продукції ММА у *S. ghanaensis* і в його морфологічній диференціації [86]. Жодних змін у продукції антибіотиків не спостерігається і при гетерологічній надекспресії цього гена у *S. coelicolor*. Незважаючи на значний рівень ідентичності AtrA_{gh} та AtrA, ймовірно, що в цих штамів вони задіяні у регуляції різних процесів або регуляції того ж процесу, але за різних умов. Серед нещодавно виявлених плейотропних регуляторів у *S. coelicolor* слід відзначити *nsdA* та *nsdB*, що кодуєть репресори біосинтезу антибіотиків. Вони не діють як транскрипційні фактори і, ймовірно, функціонують за рахунок білок-білкових взаємодій у зв'язку із присутністю тетратрікопептидних повторів (TPR). Відомо, що TPR – це структурний мотив, що представлений у великій кількості білків та бере участь у формуванні білок-білкових взаємодій, формуванні мультипротеїнових комплексів [87]. Ген *nsdA* належить до BldD-регулона [25]. Водночас надекспресія ортолога *nsdA* у *S. ghanaensis* не виявляє жодного ефекту на продукцію антибіотиків [86]. Очевидно, що у різних штамів актиноміцетів NsdA-білки можуть бути по-різному задіяні у регуляції процесів вторинного метаболізму та споруляції або впливати на інші клітинні процеси.

Увагу дослідників привертає родина WhiB-подібних білків, яку виявлено тільки в актиноміцетів. Сьогодні відомо, що геноми актиноміцетів містять численні *whiB*-подібні гени, тому для цієї родини запропоновано нову назву – Wbl (від англ. *whiB*-like) [87], проте для інших організмів прийняті інші назви цієї родини: WhiB1-7 для *Mycobacterium tuberculosis* та *M. leprae*; WhmА-Е у *M. smegmatis* та Whc у *Corynebacterium glutamicum*. Абсолютна більшість цих білків порівняно невеликі (81–122 а/к), вони містять чотири консервативних залишки цистеїну, з яких два центральних формують мотив СХХС [89]. Цистеїнові залишки зв'язу-

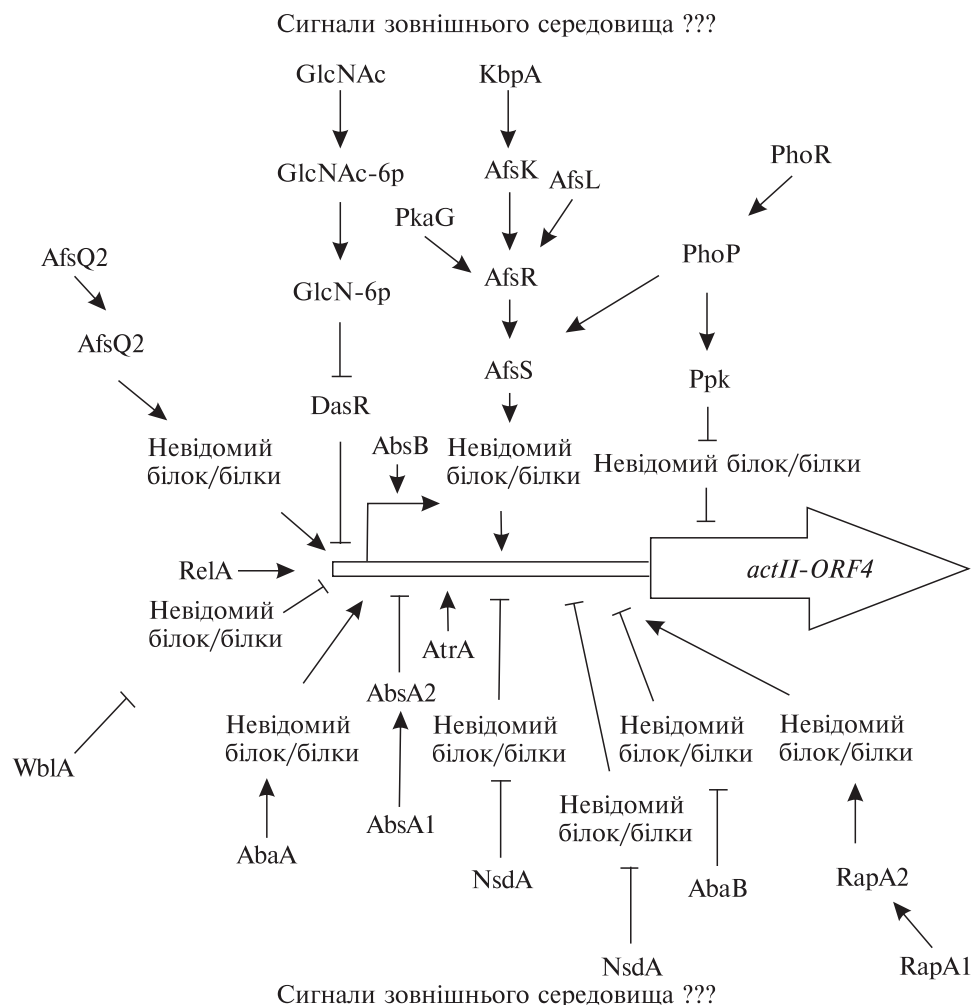


Рис. 4. Мережа плейотропних регуляторів *S. coelicolor* A3(2), що регулює біосинтез актинородину (деталі у тексті). Стрілки символізують активаторну функцію, лінії із поперечними перегородками – репресорну

ють редокс-чутливий Fe-S кластер [90]. Дані щодо біохімічної ролі Wbl суперечливі. Грунтуючись на непрямих доказах, дослідники припускають, що білки Wbl функціонують як транскрипційні фактори [91]. Імовірно, вони реагують на певні сигнали, у сприйманні яких важливу функцію відіграє кластер Fe-S [89]. Зважаючи на присутність чотирьох консервативних залишків цистеїну, інші дослідники вважають, що білки Wbl виявляють дисульфідредуктазну активність. В *Mycobacterium tuberculosis* її виявлено практично у всіх білків WhiB [89]. Таким чином, у дисульфідредуктазній моделі функціонування білків Wbl роль кластера Fe-S є зрозумілою [92] – кластер утримує білок

в неактивному стані, поки оксидативний стрес не руйнує його, і це призводить до виявлення білком ферментативної активності. Досліджено, що у *S. ghanaensis* WblA_{gh} – негативний регулятор синтезу ММА та задіяний у регуляції процесів морфологічного розвитку [93]. Делеція гена *wblA_{gh}* блокує синтез спорового пігменту, і газони мутантного штаму мають біле забарвлення. Мікроскопічний аналіз мутантного штаму дає змогу зробити припущення, що WblA_{gh} необхідний на початкових етапах розвитку повітряного міцелію у *S. ghanaensis* [93]. Такі ж результати показано для *wblA* *S. coelicolor*, де WblA є глобальним плейотропним регулятором. Його руйнування призводить до

надпродукції антибіотиків і відіграє важливу функцію у перетворенні початкових клітин повітряних гіфів на субапикальні проростки та апікальні компартменти [94]. Отже, Wbl-білки є факторами актинобактерій, які контролюють низку процесів, таких як морфогенез, стійкість до антибіотиків, відповідь на оксидативний стрес [89], і, зважаючи на свою важливу та непересічну роль, вимагають детальніших досліджень для встановлення точного механізму їхнього функціонування.

Участь описаних у цьому розділі регуляторів на експресію гена шлях-специфічної регуляції біосинтезу актинородину *actII-ORF4 S. coelicolor* підсумовано на рис. 4.

Сьогодні відома лише частина усіх регуляторних механізмів, що контролюють вторинний метаболізм актиномицетів. Найбільших успіхів досягнуто у дослідженні шлях-специфічних регуляторів, проте ще залишається велика кількість інших регуляторних процесів, що потребують докладнішого дослідження. Є великі прогалини у розумінні регуляторних каскадів, що зв'язують сигнали із зовнішнього середовища та процеси розвитку актиномицетів. Це стосується також і біосинтезу вторинних метаболітів, в яких задіяні плейотропні та шлях-специфічні регулятори. Зараз дослідники відкривають дедалі більше нових плейотропних регуляторів, проте у більшості випадків незрозуміло, як вони взаємодіють із уже вивченими регуляторами, що індукують їхню експресію тощо. Однак наявні дані вже сьогодні дають змогу маніпулювати регуляторами для покращення продукції антибіотиків чи активації «мовчазних» кластерів біосинтезу цих сполук. Серед опрацьованих підходів до створення штамів-надпродуцентів можна виділити такі: надекспресія позитивних регуляторів, спрямована ін-активація генів негативних регуляторів, дуплікації кластерів генів біосинтезу антибіотиків, делеції генів конкурентних шляхів біосинтезу, гетерологічна експресія кластерів, відбір мутацій, що збільшують рівень транскрипції генів вторинного метаболізму та трансляції їхніх мРНК у стаціонарній фазі. Дальший розвиток структурної та функціональної геноміки актиномицетів сприятиме дедалі повнішому розумінню і використанню регуляторів вторинного метаболізму.

M.V. Rabyk, B.O. Ostash, V.O. Fedorenko

Ivan Franko National University of Lviv

E-mail: *v_fedorenko@franko.lviv.ua*

GENE NETWORKS THAT REGULATE SECONDARY METABOLISM IN ACTINOMYCETES: PLEIOTROPIC REGULATORS

Current advances in the research and practical applications of pleiotropic regulatory genes for antibiotic production in actinomycetes are reviewed. The basic regulatory mechanisms found in these bacteria are outlined. Examples described in the review show the importance of the manipulation of regulatory systems that affect the synthesis of antibiotics for the metabolic engineering of the actinomycetes. Also, the study of these genes is the basis for the development of genetic engineering approaches towards the induction of «cryptic» part of the actinomycetes secondary metabolome, which capacity for production of biologically active compounds is much bigger than the diversity of antibiotics underpinned by traditional microbiological screening. Besides the practical problems, the study of regulatory genes for antibiotic biosynthesis will provide insights into the process of evolution of complex regulatory systems that coordinate the expression of gene operons, clusters and regulons, involved in the control of secondary metabolism and morphogenesis of actinomycetes.

M.V. Rabyk, B.E. Ostash, V.A. Fedorenko

СЕТИ ГЕНОВ РЕГУЛЯЦИИ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА АКТИНОМИЦЕТОВ : ПЛЕЙОТРОПНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ

Дан обзор современных достижений в исследовании и практическом применении плейотропных регуляторных генов продукции антибиотиков у актиномицетов. Рассмотрены основные регуляторные механизмы, обнаруженные у этих бактерий. Приведенные в обзоре примеры показывают, что манипулирование регуляторными системами, влияющими на синтез антибиотиков, является важным направлением метаболической инженерии актиномицетов. Кроме того, изучение этих генов служит основой для разработки генно-инженерных подходов к активации «молчащей» части вторичного метаболома актиномицетов, потенциал которого в продуцировании биологически активных соединений значительно превышает тот, который изучен при помощи традиционного скрининга микроорганизмов. Помимо чисто практических задач, исследование генов регуляции биосинтеза антибиотиков позволит лучше понять пути эволюции сложных регуляторных систем, координирующих экспрессию генных оперонов, кластеров и регулонов, участвующих в контроле вторичного метаболизма и морфогенеза актиномицетов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodfellow M., Fiedler H.P. A guide to successful bio-prospecting: informed by actinobacterial systematics // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2010. – **98**, № 2. – P. 119–142.
2. Van Wezel G.P., McDowall K.J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // *Nat. Prod. Rep.* – 2011. – **28**, № 7. – P. 1311–1333.
3. Bibb M.J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. – **8**, № 2. – P. 208–215.
4. Martin J.F., Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2010. – **13**, № 3. – P. 263–273.
5. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeco-Tárraga A.M. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Nature*. – 2002. – **417**, № 6885. – P. 141–147.
6. Horbal L., Rebets Y., Rabyk M. et al. Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tü117 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – **85**, № 4. – P. 1069–1079.
7. Chng C., Lum A.M., Vroom J.A., Kao C.M. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2008. – **105**, № 11. – P. 11346–11351.
8. Van Wezel G.P., McKenzie N.L., Nodwell J.R. Chapter 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics // *Meth. Enzymol.* – 2009. – **458**. – P. 117–141.
9. Gross H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **75**, № 2. – P. 267–277.
10. Ostash B., Doud E.H., Lin C. et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // *Biochemistry*. – 2009. – **48**, № 37. – P. 8830–8841.
11. Makitrynskyi R., Rebets Y., Ostash B. et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – **37**, № 6. – P. 559–566.
12. Hopwood D.A. Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor* // *Bacteriol. Rev.* – 1967. – **31**, № 4. – P. 373–403.
13. Nodwell J.R., Yang M., Kuo D., Losick R. Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* // *Genetics*. – 1999. – **151**, № 2. – P. 569–584.
14. Elliot M.A., Bibb M.J., Buttner M.J., Leskiw B.K. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Mol. Microbiol.* – 2001. – **40**, № 1. – P. 257–269.
15. Nodwell J.R., McGovern K., Losick R. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* // *Mol. Microbiol.* – 1996. – **22**, № 5. – P. 881–893.
16. Lawlor E.J., Baylis H.A., Chater K.F. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Genes. Dev.* – 1987. – **1**, № 10. – P. 1305–1310.
17. Bignell D.R., Warawa J.L., Strap J.L. et al. Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation // *Microbiol.* – 2000. – **146**. – P. 2161–2173.
18. Pope M.K., Green B., Westpheling J. The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor* // *J. Bacteriol.* – 1998. – **180**, № 6. – P. 1556–1562.
19. Molle V., Buttner M.J. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages // *Mol. Microbiol.* – 2000. – **36**, № 6. – P. 1265–1278.
20. Bibb M.J., Molle V., Buttner M.J. Sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *J. Bacteriol.* – 2000. – **182**, № 16. – P. 4606–4616.
21. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // *J. Bacteriol.* – 2008. – **190**. – P. 4050–4060.
22. Elliot M., Damji F., Passantino R. et al. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production // *J. Bacteriol.* – 1998. – **180**, № 6. – P. 1549–1555.
23. Kodani S., Hudson M.E., Durrant M.C. et al. The SapB morphogen is a antibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2004. – **101**, № 31. – P. 11448–11453.
24. Nodwell J.R., Losick R. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor* // *J. Bacteriol.* – 1998. – **180**, № 5. – P. 1334–1337.
25. Den Hengst C.D., Tran N.T., Bibb M.J. et al. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth // *Mol. Microbiol.* – 2010. – **78**, № 2. – P. 361–379.

26. Chater K.F., Chandra G. The use of the rare UUA codon to define «expression space» for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces* // J. Microbiol. – 2008. – **46**, № 1. – P. 1–11.
27. Zaburanny N., Ostash B., Fedorenko V. TTA Lynx: a web-based service for analysis of actinomycete genes containing rare TTA codon // Bioinformatics. – 2009. – **25**, № 18. – P. 2432–2433.
28. Chater K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2006. – **361**, № 1469. – P. 761–768.
29. Li W., Wu J., Tao W. et al. A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – **266**, № 1. – P. 20–28.
30. Rebets Y.V., Ostash B.O., Fukuhara M. et al. Expression of the regulatory protein LndI for lamdomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 is controlled by the availability of tRNA for the rare UUA codon // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – **256**, № 1. – P. 30–37.
31. Kim D.W., Chater K., Lee K.J., Hesketh A. Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor* // J. Bacteriol. – 2005. – **187**, № 9. – P. 2957–2966.
32. Higo A., Hara H., Horinouchi S., Ohnishi Y. Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network // DNA Res. – 2012. – [Epub ahead of print].
33. Eccleston M., Willems A., Beveridge A., Nodwell J.R. Critical residues and novel effects of overexpression of the *Streptomyces coelicolor* developmental protein BldB: evidence for a critical interacting partner // J. Bacteriol. – 2006. – **188**, № 23. – P. 8189–8195.
34. Pope M.K., Green B.D., Westpheling J. The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling // Mol. Microbiol. – 1996. – **19**, № 4. – P. 747–756.
35. Пат. № 63820 України. Спосіб підвищення біосинтезу фосфогліколіпідних антибіотиків / Остап Б.О., Федоренко В.О., Громико О.М., Уокер-Кане С. Опубл. 25.10.11. Бюл. № 20.
36. Horinouchi S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2007. – **71**, № 2. – P. 283–299.
37. Takano E. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – **9**, № 3. – P. 287–294.
38. Ando N., Matsumori N., Sakuda S. et al. Involvement of *afsA* in A-factor biosynthesis as a key enzyme // J. Antibiot. – 1997. – **50**, № 10. – P. 847–852.
39. Horinouchi S., Ohnishi Y., Kang D.K. The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – **27**, № 3. – P. 177–182.
40. Hara O., Beppu T. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* – the role of A-factor // J. Antibiot. – 1982. – **35**, № 3. – P. 349–358.
41. Kato J.Y., Miyahisa I., Mashiko M. et al. A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus* // J. Bacteriol. – 2004. – **186**, № 7. – P. 2206–2211.
42. Onaka H., Ando N., Nihira T. et al. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus* // J. Bacteriol. – 1995. – **177**, № 21. – P. 6083–6092.
43. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor // Mol. Microbiol. – 1999. – **34**, № 1. – P. 102–111.
44. Yamazaki H., Ohnishi Y., Horinouchi S. An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sigma(AdsA)) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus* // J. Bacteriol. – 2000. – **182**, № 16. – P. 4596–4605.
45. Xu W., Huang J., Lin R. et al. Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor // Mol. Microbiol. – 2010. – **75**, № 3. – P. 781–791.
46. Takano E., Nihira T., Hara Y. et al. Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 15. – P. 11010–11016.
47. Hsiao N.H., Nakayama S., Merlo M.E. et al. Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system // Chem. Biol. – 2009. – **16**, № 9. – P. 951–960.
48. Takano E., Chakraborty R., Nihira T. et al. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Mol. Microbiol. – 2001. – **41**, № 5. – P. 1015–1028.
49. Hsiao N.H., Söding J., Linke D. et al. ScbA from

- Streptomyces coelicolor* A3(2) has homology to fatty acid synthases and is able to synthesize gamma-butyrolactones // *Microbiology*. – 2007. – **153**. – P. 1394–1404.
50. Takano E., Kinoshita H., Mersinias V. et al. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* // *Mol. Microbiol.* – 2005. – **56**, № 2. – P. 465–479.
 51. Hesketh A., Chen W.J., Ryding J., Chang S., Bibb M. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Genome Biol.* – 2007. – **8**, № 8. – P. 1–18.
 52. Chakraborty R., Bibb M. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation // *J. Bacteriol.* – 1997. – **179**, № 18. – P. 5854–5861.
 53. Hesketh A., Sun J., Bibb M. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis // *Mol. Microbiol.* – 2001. – **39**, № 1. – P. 136–144.
 54. Ryu Y.G., Kim E.S., Kim D.W. et al. Differential stringent responses of *Streptomyces coelicolor* M600 to starvation of specific nutrients // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **17**, № 2. – P. 305–312.
 55. Gomez-Escribano J.P., Martin J.F., Hesketh A. et al. *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp // *Microbiol.* – 2008. – **154**. – P. 744–755.
 56. Gatewood M.L., Jones G.H. (p)ppGpp inhibits polynucleotide phosphorylase from streptomyces but not from *Escherichia coli* and increases the stability of bulk mRNA in *Streptomyces coelicolor* // *J. Bacteriol.* – 2010. – **192**, № 17. – P. 4275–4280.
 57. Angell S., Lewis C.G., Buttner M.J., Bibb M.J. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase // *Mol. Gen. Genet.* – 1994. – **244**, № 2. – P. 135–143.
 58. Rigali S., Titgemeyer F., Barends S. et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces* // *EMBO Rep.* – 2008. – **9**, № 7. – P. 670–675.
 59. Rodriguez-Garcia A., Sola-Landa A. et al. Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – **37**, № 10. – P. 3230–3242.
 60. Hopwood D.A. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome // *Annu. Rev. Genet.* – 2006. – **40**. – P. 1–23.
 61. Rigali S., Nothhaft H., Noens E.E. et al. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development // *Mol. Microbiol.* – 2006. – **61**, № 5. – P. 1237–1251.
 62. Sola-Landa A., Moura R.S., Martin J.F. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, № 10. – P. 6133–6138.
 63. Ghorbel S., Smirnov A., Chouayekh H. et al. Regulation of *ppk* expression and in vivo function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24 // *J. Bacteriol.* – 2006. – **188**, № 17. – P. 6269–6276.
 64. Chouayekh H., Virolle M.J. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans* // *Mol. Microbiol.* – 2002. – **43**, № 4. – P. 919–930.
 65. Ghorbel S., Kormanec J., Artus A., Virolle M.J. Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24 // *J. Bacteriol.* – 2006. – **188**, № 2. – P. 677–686.
 66. Weisschuh N., Fink D., Vierling S. et al. Transcriptional analysis of the gene for glutamine synthetase II and two upstream genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Mol. Gen. Genet.* – 2000. – **264**, № 4. – P. 461–469.
 67. Reuther J., Wohlleben W. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **12**. – P. 139–146.
 68. Tiffert Y., Supra P., Wurm R. et al. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes // *Mol. Microbiol.* – 2008. – **67**, № 4. – P. 861–870.
 69. West A.H., Stock A.M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems // *Trends. Biochem. Sci.* – 2001. – **26**, № 6. – P. 369–376.
 70. Hutchings M.I., Hoskisson P.A., Chandra G., Buttner M.J. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Microbiology*. – 2004. – **150**. – P. 2795–2806.
 71. Petříčková K., Petříček M. Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme // *Microbiology*. – 2003. – **149**. – P. 1609–1621.
 72. McKenzie N.L., Nodwell J.R. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Strep-*

- tomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters // J. Bacteriol. – 2007. – **189**, № 14. – P. 5284–5292.
73. Floriano B., Bibb M. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Mol. Microbiol. – 1996. – **21**, № 2. – P. 385–396.
 74. Wietzorrek A., Bibb M. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold // Mol. Microbiol. – 1997. – **25**, № 6. – P. 1181–1184.
 75. Sawai R., Suzuki A., Takano Y. et al. Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Gene. – 2004. – **334**. – P. 53–61.
 76. Lee Y., Kim K., Suh J.W. et al. Binding study of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and S-adenosyl-L-methionine // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – **266**, № 2. – P. 236–240.
 77. Santos-Beneit F., Rodriguez-Garcia A., Sola-Landa A., Martin J.F. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription // Mol. Microbiol. – 2009. – **72**, № 2. – P. 53–68.
 78. Lian W., Jayapal K.P., Charaniya S. et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // BMC Genom. – 2008. – **9**. – P. 1–14.
 79. Price B., Adamidis T., Kong R., Champness W. A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog // J. Bacteriol. – 1999. – **181**, № 19. – P. 6142–6151.
 80. Adamidis T., Champness W. Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation // J. Bacteriol. – 1992. – **174**, № 14. – P. 4622–4628.
 81. Xu W., Huang J., Cohen S.N. Autoregulation of AbsB (RNase III) expression in *Streptomyces coelicolor* by endoribonucleolytic cleavage of *absB* operon transcripts // J. Bacteriol. – 2008. – **190**, № 15. – P. 5526–5530.
 82. Uguru G.C., Stephens K.E., Stead J.A. et al. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor* // Mol. Microbiol. – 2005. – **58**, № 1. – P. 131–150.
 83. Nothhaft H., Rigali S., Boomsma B. et al. The permease gene *nagE2* is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multilevel control // Mol. Microbiol. – 2010. – **75**, № 5. – P. 1133–1144.
 84. Hillen W., Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance // Annu. Rev. Microbiol. – 1994. – **48**. – P. 345–369.
 85. McAdams H.H., Srinivasan B., Arkin A.P. The evolution of genetic regulatory systems in bacteria // Nat. Rev. Genet. – 2004. – **5**, № 3. – P. 169–178.
 86. Rabyk M., Ostash B., Walker S., Fedorenko V. Identification and characterization of *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 regulatory genes *nsdA_{gh}* and *atrA_{gh}* // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2010. – Вип. **53**. – С. 41–48.
 87. Li W., Ying X., Guo Y. et al. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Bacteriol. – 2006. – **188**, № 24. – P. 8368–8375.
 88. Soliveri J., Vijgenboom E., Granozzi C. et al. Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes // J. Gen. Microbiol. – 1993. – **139**, № 11. – P. 2569–2578.
 89. Den Hengst C.D., Buttner M.J. Redox control in actinobacteria // Biochim. biophys. acta. – 2008. – **1780**, № 11. – P. 1201–1216.
 90. Crack J.C., den Hengst C.D., Jakimowicz P. et al. Characterization of [4Fe-4S]-containing and cluster-free forms of *Streptomyces* WhiD // Biochemistry. – 2009. – **48**, № 51. – P. 12252–12264.
 91. Steyn A.J.C., Collins D.M., Hondalus M.K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for *in vivo* growth // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**, № 5. – P. 3149–3152.
 92. Alam M.S., Garg S.K., Agrawal P. Molecular function of WhiB4/Rv3681c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase // Mol. Microbiol. – 2007. – **63**, № 5. – P. 1414–1431.
 93. Rabyk M., Ostash B., Rebets Y. et al. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production // Biotechnol. Lett. – 2011. – **33**, № 12. – P. 2481–2486.
 94. Fowler-Goldsworthy K., Gust B., Mouz S. et al. The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Microbiology. – 2011. – **157**. – P. 1312–1328.