

УДК 577.181.4:543.51

ВТОРИННИЙ МЕТАБОЛОМ І ТРАНСКРИПТОМ *STREPTOMYCES ALBUS* J1074 В РІДКОМУ СЕРЕДОВИЩІ SG2

О.Т. КОШЛА^{1,1}, І.В. РОКИЦЬКИЙ^{1,2}, І.С. ОСТАШ^{1,3},
Т. БУШЕ^{2,4}, Й. КАЛІНОВСЬКИЙ^{2,5}, Є. МЬОСКЕР^{3,6},
Р.Д. ЗЮСМУТ^{3,7}, В.О. ФЕДОРЕНКО^{1,8}, Б.О. ОСТАШ^{1,9*}

¹ Львівський національний університет ім. Івана Франка, кафедра генетики та біотехнології, вул. Грушевського 4, к. 102, 79005 Львів, Україна

² Технологічна платформа геноміки, Білефельдський університет, 33615 Білефельд, Німеччина

³ Технічний університет Берліна, Інститут хімії, 10623 Берлін, Німеччина

E-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua, oksana.koshla@lnu.edu.ua¹, igorrito@gmail.com²,

iryna.ostash@lnu.edu.ua³, tbusche@cebitec.uni-bielefeld.de⁴, joern@cebitec.uni-bielefeld.de⁵,

eva.moesker@win.tu-berlin.de⁶, roderich.suessmuth@tu-berlin.de⁷, viktor.fedorenko@lnu.edu.ua⁸, bohdan.ostash@lnu.edu.ua^{9*}

Streptomyces albus J1074 — одна із найпопулярніших платформ для гетерологічної експресії актинобактерійних біосинтетичних генних кластерів (BGCs). Докладають значних зусиль, аби зрозуміти всі фізіологічні та генетичні аспекти вторинного метаболізму J1074, з тим щоб максимізувати експресію гетерологічних BGCs. Слід відзначити, що геном J1074 містить багато (>20) BGCs, експресія яких значно варіює. Отже, ідентифікація факторів, що обмежують вияв BGCs в J1074 можуть допомогти покращити цей штам для потреб гетерологічної експресії. Як перший крок в цьому керунку нами описано вторинний метаболом J1074 в рідкому середовищі SG2, що, як показано нами раніше, підтримує продукцію протибактерійних і протигрибкових сполук. Ми порівнюємо метаболомні дані з транскриптомом J1074 в SG2 на 60 год росту. Результати наших досліджень обговорено в контексті поточного розуміння метаболомних і транскриптомних даних для штаму J1074.

Ключові слова: *Streptomyces albus* J1074, вторинний метаболізм, RNA-seq.

Вступ. Актинобактерію *Streptomyces albus* J1074 вперше виділено як похідний штаму *S. albus* G

дефектний за системою рестрикції-модифікації SalGI [1]. Пізніше, J1074 слугував як модель вивчення феномену обмеження розвитку фагів в клітинах стрептоміцетів, а в 1990-х здобув популярність як господар для експресії генів біосинтезу антибіотиків. Швидкий і високодисперсний ріст, простота генетичних маніпуляцій — все це зробило J1074 штамом «першого вибору» для експресії гетерологічних генних кластерів актинобактерій [2]. Геном J1074 винятково компактний (6.8 млн п.н. порівняно з 9 млн п.н. для типового генома *Streptomyces*), і все ж він містить 7 *rrn* оперонів і щонайменше 24 біосинтетичні генні кластери (BGCs) [1]. Зменшення розміру генома імовірно еволюціонувало головно унаслідок втрати чисельних паралогічних генів. Наприклад, в геномі *S. coelicolor* A3(2) закодовано сім глікозилтрансфераз стінкових тейхоевих кислот, в той час як J1074 має лише три; аналогічна картина спостерігається для багатьох інших родин білків. Усі наявні дані зображують J1074 як оптимальний стартовий майданчик для розробки ефективної платформи з метою гетерологічної експресії (метагеномної) ДНК. Очікується, що така платформа значно підвищить можливості відкриття біоактивних природних сполук, зашифрованих у метагеномній ДНК та

© О.Т. КОШЛА, І.В. РОКИЦЬКИЙ, І.С. ОСТАШ,
Т. БУШЕ, Й. КАЛІНОВСЬКИЙ, Є. МЬОСКЕР,
Р.Д. ЗЮСМУТ, В.О. ФЕДОРЕНКО, Б.О. ОСТАШ,
2019

мовчазних генних кластерах актинобактерій. Потреба у нових природних речовинах відчувається усіма галузями медицини, сільського господарства і ветеринарії, але особливо гостро постала у царині лікування бактерійних інфекцій. Зростання стійкості до загально-вживаних антибіотиків за останнє десятиліття призвело до зниження якості життя, людських смертей і зростання витрат на охорону здоров'я [3]. Ця проблема – основний рушій суспільних намагань винайти нові, творчі підходи до відкриття нових природних низькомолекулярних сполук [4].

Глибше розуміння ендегенного вторинного метаболізму J1074 – передумова створення високоефективних стратегій надпродукції гетерологічних сполук. Наразі, із 24 потенційних BGCs принаймні сім ведуть до накопичення відповідних вторинних метаболітів [5, 6]. З них лише пауломіцини надають екстрактам J1074 протибактерійної активності [5], тоді як шуграміди, кандидіцини, альтераміди й антиміцини імовірно відповідають за протигрибкові властивості цих екстрактів [6, 7]. Продукція пауломіцинів – вельми лабільна, й умови ефективної експресії решти BGCs загалом невідомі. Проаналізовано транскриптом і метаболом J1074 вирощеного у різних рідких середовищах [1, 6]: багато BGCs експресувалися дуже слабо, пояснюючи криптичну чи нестабільну (у випадку пауломіцинів) природу їхнього синтезу. Нещодавно, у ході вивчення кількох мутантів *S. albus*, ми виявили нове рідке середовище на основі сойтону, SG2, що стабільно підтримувало високий рівень продукції протибактерійних і протигрибкових сполук [8]. Це середовище досі не використовували для J1074, і немає докладної інформації про хімічну будову продуктованих сполук та транскрипційні рівні BGCs штаму J1074 в SG2. Враховуючи простоту складу й ефективність цього середовища, ми вирішили дослідити вторинний метаболом та транскриптом J1074 в SG2. В цій роботі ми описуємо результати наших досліджень.

Матеріали і методи. *Streptomyces albus* SAM2 (також відомий як Δpse) – похідний J1074 з делецією псевдо-*attB*^{pc31} [9] – використовували у всіх дослідах. SAM2 культивували в таких рідких середовищах: SG2 (г/л: глюкоза 20,

дріжджовий екстракт 5, сойтон 10, рН 7.2 до автоклавування, доведено кількома краплями 1N NaOH); YMPG (г/л: дріжджовий екстракт 4, Бакто-пептон 1, мальтозний екстракт 10, MgCl₂ × 6H₂O 2, рН 7.2) [10]; TSB (EMD, Merck). Якщо інакше не зазначено, то всі живильні компоненти середовищ придбано в BD Biosciences, рівень очищення – Difco.

Вторинний метаболом штаму SAM2 аналізували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії спряженої з мас-спектрометрією (HPLC-MS) на мас-спектрометрі HiRes Extractive Oribtrap (Thermo Fisher Scientific). SAM2 засівали із замороженого на –80 °C сахарозного архіву в 50-мл колби з 10 скляними кульками (Ø 5 мм, Sigma) і 8 мл TSB. Культуру вирощували 24 год при 30 °C, потім 1 мл інокулювали в основну 250-мл колбу з 20 скляними кульками і 35 мл SG2 або YMPG. Основну культуру вирощували 120 год при 30 °C (200 об/хв). Біомасу з 35-мл ферментаційного середовища екстрагували метанол-ацетонітрилом (3 : 1), тоді як 10-мл зразки супернатанту екстрагували рівним об'ємом бутанолу. Далше очищення й аналіз екстрактів виконували як описано в [6] за допомогою програми Xcalibur 5,1 (Thermo Scientific). Система розчинників (А+В): вода + 0,1 % мурашина кислота (HFO), ацетонітрил + 0,1 % HFO; з 95 % А до 0 % А за 8 хв, потім 1,5 хв при 0 % А, потім реверсія до 95 % А за 1,5 хв.

Для виділення сумарної РНК попередню і основну культуру SAM2 вирощували як описано вище, за винятком того, що використовували SG2, і клітини відбирали на 60 год культивування унаслідок значної деградації РНК на пізніших стадіях росту. Протягом експерименту аналізували три технічні повтори. 1-мл зразки осаджували протягом 15 с при 22 °C, супернатант видаляли шляхом перевертання пробірок. Осад клітин (прибл. 50 мг, волога вага, ~5×10⁸ клітин) одразу заморожували в рідкому азоті і зберігали при –80 °C. Клітини розморожували на льоді, ресуспендували в 1 мл розчину RNA Shield (Zymo Research, США), осаджували протягом 30 с при 22 °C, і знову ресуспендували в 0,5 мл RNA Shield. Суспензію клітин поміщували в охолоджені 2,0-мл гомогенізаційні пробірки з ,1-мм скляних кульок і переносили в гомогенізатор Precel-

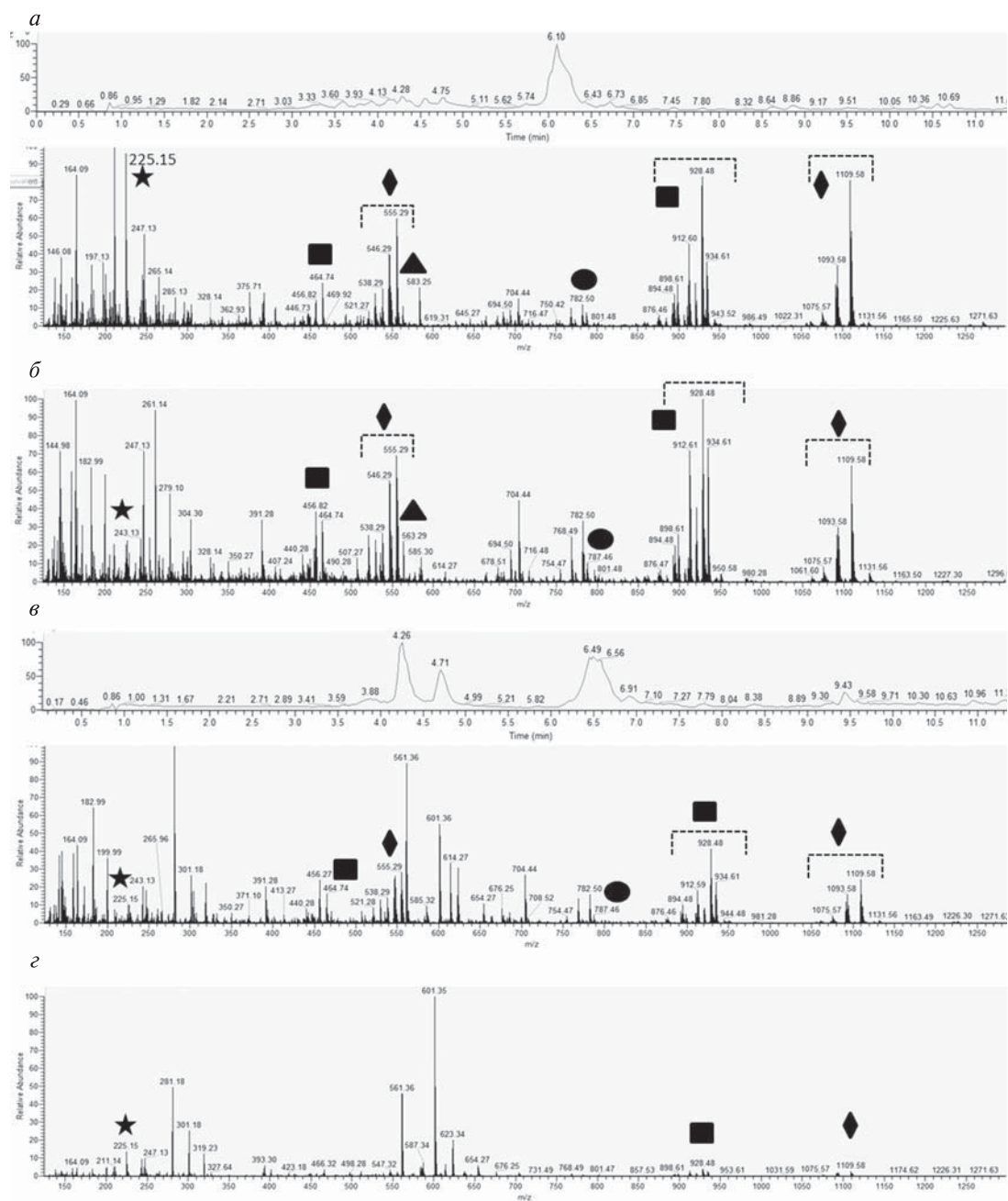


Рис. 1. Хроматограми мас-пиків (MS) та окремих іонів з екстрактів *S. albus* SAM2 вирощеного в середовищах SG2 й YMPG. MS (верхня частина А й С) ідентичні для супернатанту й біомаси, тому наведено тільки одну з них. Вісь ординат – відносна поширеність піка, %. *а*, біомаса з SG2; *б*, супернатант SG2; *в*, біомаса з YMPG; *г*, супернатант YMPG. 5 класів сполук ідентифіковано: бутенолід (позначено зіркою, 225,15 Да), антимиціни (563,29 Да, трикутник), пауломіцини (787,46 Да, овал), шуграміди (912,61, 928,48 Да, 2H⁺-іон 464,74 Да, прямокутник), кандидидини (1109,58 Да, 1093,58 Да, 2H⁺-іон 555,29 Да, ромб). Перераховано лише мажорні мас-піки. Пунктирні дужки позначають кластери мас-пиків однієї структурної родини. Мас-спектри записано в режимі позитивної іонізації. Хроматограми репрезентують типовий результат принаймні трьох незалежних дослідів

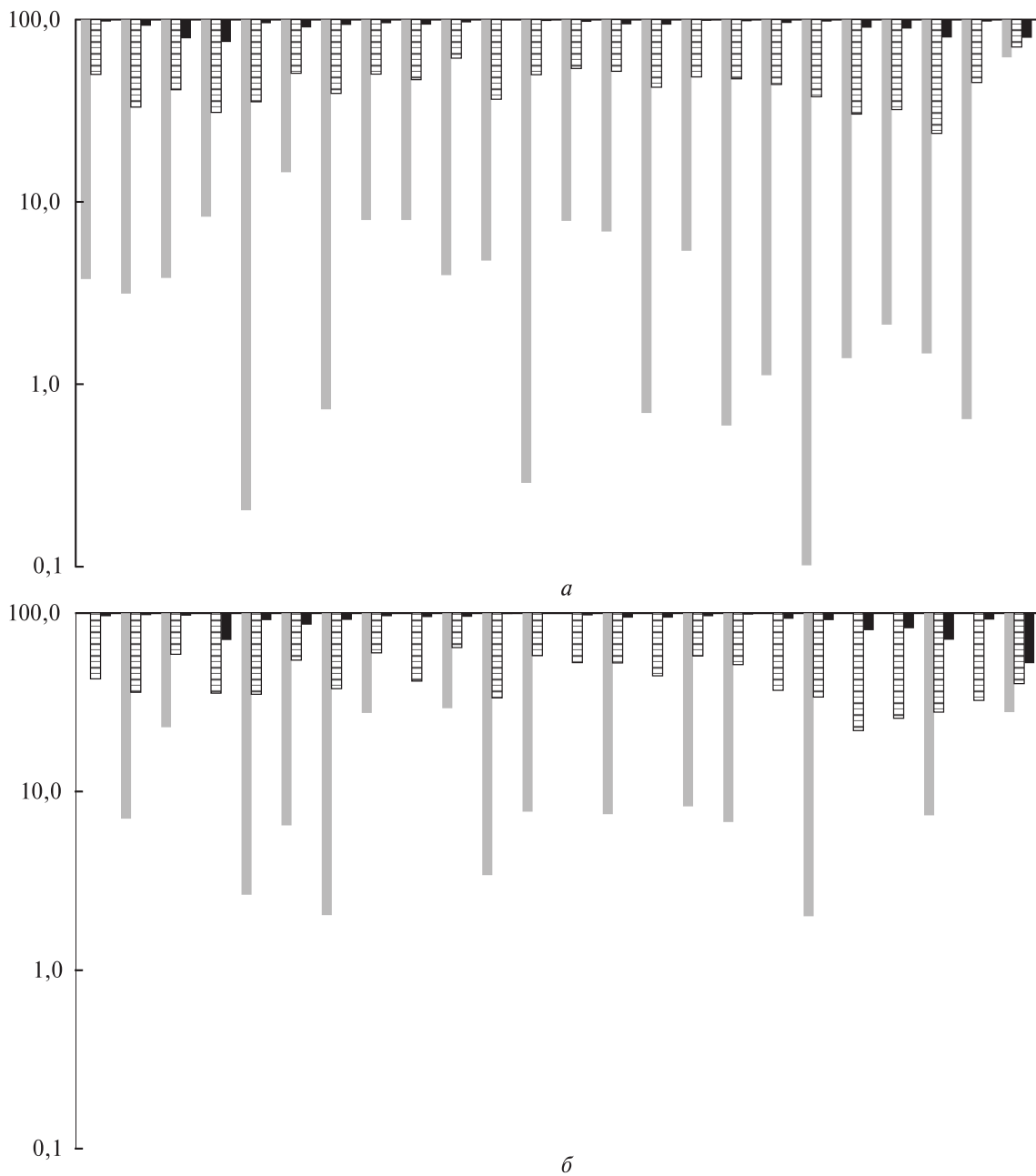


Рис. 2. Транскрипційна активність усіх BGCs в хромосомі *S. albus* J1074 в SG2 (а) та TSB (б). Дані виражено у перцентильних рангах (% , вісь ординат) відносно усіх генів *S. albus*. Для кожного BGC наведено значення мінімальної активності (сірий стовпчик), усереднене значення експресії усіх генів в межах кожного BGC (чорний посмугований стовпчик) і максимальне значення (чорний стовпчик). Наприклад, в BGC #7 (шуругамід; *sur*) виявлено ген з мінімальним рівнем експресії (*XNR_RS04865*, 0,31 RPKM), що входить до 1 % перцентильного класу; тобто, тільки 1 % *S. albus* генів має рівень експресії менший за *XNR_RS04865*. На загал, експресія *sur* генів знаходиться у 10–100 перцентильних межах; найекспресивніший *sur* ген (*XNR_RS04840*, 1500 RPKM) високий настільки, що приблизно 99 % генів J1074 мають нижчі рівні експресії. Нумерація BGC відповідає тій що у таблиці. В середовищі TSB деякі BGCs містять гени з нульовою транскрипцією (відсутність сірих стовпчиків)

lys 24 (Bertin Instruments). Клітини руйнували в два етапи, кожен тривалістю 30 с, рівень потужності 6,5; між етапами пробірки поміщували в лід. Даліше виділення РНК виконували згідно інструкцій набору Quick RNA Miniprep kit (Zymo Research) з додатковим кроком обробки ДНКазою на колонці (30 хв, 37 °С). Далі зразки РНК очищували за допомогою набору RNA Cleanup and Concentrator kit (Zymo Research). Чистоту зразків РНК перевіряли в п'ять кроків. По-перше, концентрацію нуклеїнових кислот аналізували на спектрофотометрі NanoDrop (PepLab). По-друге, зразки розділяли електрофоретично для візуальної оцінки нуклеїнових кислот. По-третє, зразки РНК аналізували за допомогою діагностичної ПЛР з праймерами до гена *XNR_1636* (*Xnr1636_XbaI*up: AGAGGCCGTTTCGCTAGGAGACTG; *Xnr1636_EcoRI*rp: AAAGAATTCTCAGGAGGCCAGGCCAGC), щоб підтвердити відсутність ДНК. По-четверте, зразки аналізували на спектрофотометрі Trinean Xpose (Nova Biostorage, США) з тим, щоб перевірити відсутність ДНК, фенолу і вільних нуклеотидів. Насамкінець, зразки аналізували на капілярному біоаналізаторі Agilent 2100 (Agilent, США) щоб оцінити довжину мРНК. Зразки, що успішно пройшли усі етапи контролю, використали для прямого секвенування спарованих кінців РНК методом Illumina TruSeq (RNA-seq), як описано в [11, 12]. Секвеновані фрагменти картували відносно генома J1074 і аналізували як в [11].

Результати. *Порівняння вторинних метаболітів S. albus в двох рідких середовищах.* Попередні дослідження вказали на невідтворюваність продукції пауломіцину за більшості умов [5], тоді як SG2 стабільно підтримувало високий рівень накопичення протибактерійних та протигрибкових сполук, швидше всього за рахунок пауломіцинів і кандицидинів [8]. Ми вирішили виконати докладніший HPLC-MS аналіз вторинних метаболітів, що продукує SAM2 в SG2. Для порівняння ми вибрали середовище YMPG, яке, згідно попередніх біотестів, вело до низького рівня біосинтезу антибіотиків. Окремо проаналізовано екстракти з клітин і супернатанта, як наведено на рис. 1. *S. albus* накопичував приблизно однакові кількості біомаси в обидвох середовищах (суха вага клітин з 10 мл середовища: 17 ± 2 мг в SG2, 16 ±

+ 2 мг в YMPG). В SG2 ми зазвичай виявляли п'ять класів сполук, згідно їхньої точної маси і часу виходу. Полієнові полікетиди з родини кандицидинів і макролактами шуругаміди (*sur*) переважали в клітинах і супернатанті з SG2. Цікаво, що остання родина сполук зазвичай не виявляється в *S. albus*, ведучи до припущення що *sur* BGC мовчазний [7]. Метаболіти, приписані до родин бутенолідів, антиміцинів і пауломіцинів, накопичувались у менших кількостях порівняно з кандицидинами, втім усі вони чітко присутні в біомасі та надосадовій рідині. Клітинна фракція з YMPG містила ті самі п'ять класів сполук, але в менших кількостях ніж у SG2 (рис. 1). Надосадова фракція YMPG містила слідові кількості бутеноліду, шуругамідів і кандицидинів.

Нам не вдалось приписати імовірну хімічну структуру кільком мажорним мас-пікам. Зокрема, в SG2 постійно присутній пік з масою M + H⁺ 704,44 Да. В YMPG виявлено ідентичний мас-пік, а також два додаткові сигнали – 601,35 Да й 561,36 Да. Ні точна маса, ані час виходу цих сполук не збігався з жодною описаною в хімічних базах даних сполукою.

RNA-seq аналіз штаму SAM2 в SG2. Хоча метаболізм аналізували після 120 год вирощування, транскриптом SAM2 визначали на 60-ту год з огляду на таке. По-перше, нам неодноразово не вдавалось отримати якісні зразки РНК після 96 год росту. По-друге, на 60 і 120 год росту в SG2 спостерігали якісно ідентичний набір вторинних метаболітів, хоча в менших кількостях на 60 год (дані не показано). Отже, резонно припустити, що 60-год транскриптом адекватно відображає вторинний метаболізм SAM2 на пізній фазі зростання.

Оскільки BGCs актинобактерій мультигенні і часто мультиоперонні ансамблі, неминуче спостерігатиметься внутрішньокластерна варіація в рівнях транскрипції окремих генів. Відтак у цій роботі ми наводимо максимальний, усереднений і мінімальний рівні експресії для кожного BGC; дані підсумовано на рис. 2; продукти цих BGCs перелічено в таблиці. Нам вдалося виявити в SG2 транскрипційну активність усіх анованих в *S. albus* BGCs, хоча максимальні рівні експресії значно варіювали. Меншу варіацію виявлено в усереднених даних, які коливались у межах 30–80

перцентилів (рис. 2 за додатковими поясненнями). Варто відзначити, що з семи BGCs, чия максимальна експресія перебуває у найвищому перцентильному класі, три (пауломіцин, шуругамід, антиміцин) належать до тих, продукти активності яких виявлено за допомогою LC-MS у цій роботі. Порівнюючи експресію BGCs в SG2 й TSB (останні дані взято з [1]), чітко видно нижчу експресію усіх генних кластерів. В TSB багато BGCs містили гени з нульовим рівнем транскрипції – ознака загальної фенотипової криптичності.

Обговорення. В останнє десятиріччя зросло використання *S. albus* J1074 для потреб відкриття природних сполук [5, 6, 13, 14]. Для J1074 опрацьовано ефективні знаряддя генетики та синтетичної біології [15], досліджено транскриптом за різних умов росту. Аналіз даних RNA-seq й метаболоміки засвідчили, що вибір середовища культивування визначає склад і рівень сполук продукованих штамом J1074 [6]. Такий високий ступінь метаболічної пластичності є загальною рисою фізіології *Streptomyces* [16, 17]. Відтак, вкрай важливо дослідити для цього штаму якомога більше умов вирощування з тим щоб виявити справжній обсяг вторинного метаболізму доступний за рахунок змін складу поживних речовин.

У цій роботі ми вперше наводимо дані HPLC-MS та RNA-seq для штаму *S. albus* вирощеного у середовищі SG2. Метаболомні дані підтвердили високу ефективність SG2 для продукції різноманітних класів біоактивних сполук. З п'яти виявлених класів сполук, три (кандицидини, антиміцини й шуругаміди) виявляють активність проти еукаріотичних клітин, зокрема грибів. Ці сполуки кількісно домінують в екстрактах SG2, і одна з них, кандицидин, продукується за всіх досліджених умов росту [6]. Причина цього не відома, але, імовірно, пов'язана з постійною потребою стрептоміцетної клітини захищатись від грибової інфекції в ґрунтових екосистемах. В SG2 ми спостерігали продукцію штамом SAM2 значних кількостей шуругамідів – макролактамів, які досі вважали криптичними за відсутності певних стресових факторів [7]. Наші результати наголошують на важливості масштабного скринінгу умов росту як способу відкриття нових природних сполук.

RNA-seq виявило в *S. albus* рясну транскрипцію усіх анотованих BGCs. Відмінності у рівнях їхньої експресії не були достатньо великими, аби припустити, що певні BGCs транскрипційно мовчазні і тому їхні продукти не можуть бути виявлені за допомогою LC-MS.

BGCs вторинного метаболізму *S. albus* J1074

Кластер ¹	Продукт	Край ²	Кластер	Продукт	Край
1	ПКС-НРП ³	<i>XNR_RS00010</i>	13	НРП ⁴	<i>XNR_RS15505</i>
2	ПКС-НРП	<i>XNR_RS00915</i>	14	НРП	<i>XNR_RS17000</i>
3	терпен	<i>XNR_RS01205</i>	15	НРП	<i>XNR_RS19445</i>
4	бактеріоцин	<i>XNR_RS01690</i>	16	сидерофор	<i>XNR_RS20695</i>
5	пауломіцин ⁵	<i>XNR_RS02800</i>	17	ектоїн	<i>XNR_RS24520</i>
6	бактеріоцин	<i>XNR_RS03700</i>	18	невідомо	<i>XNR_RS27840</i>
7	шуругамід	<i>XNR_RS04780</i>	19	бактеріоцин-терпен	<i>XNR_RS28110</i>
8	сидерофор	<i>XNR_RS05245</i>	20	ПКС III	<i>XNR_RS28690</i>
9	терпен	<i>XNR_RS06365</i>	21	кандицидин	<i>XNR_RS28855</i>
10	терпен	<i>XNR_RS07810</i>	22	ПКС-НРП	<i>XNR_RS29010</i>
11	тіопептид	<i>XNR_RS29710</i>	23	антиміцин	<i>XNR_RS29115</i>
12	лантипептид	<i>XNR_RS11470</i>	24	бутенолід	<i>XNR_RS11616</i>

¹ Кластери перераховано з довільної «лівої» теломери *S. albus*. ² Ген на одному із країв BGC, як умовна координата розташування BGC в геномі. ³ Гібридний шлях продукції полікетиду-нерибосомного пептиду.

⁴ Шлях продукції нерибосомного пептиду. ⁵ Шляхи, активність яких виявлено на метаболічному рівні (дані LC-MS) надруковано жирним шрифтом.

Отже, середовище SG2 може привести до відкриття нових сполук. Так, нами детектовано низку неідентифікованих мас-пиків, які можуть відповідати продуктам одного чи кількох вискоекспресивних BGCs. Кілька природних сполук *S. albus* – леткі [18], і їхню продукцію не можна виявити за допомогою використаного нами методу LC-MS. Ми також хотіли б відзначити, що SG2 забезпечує відтворенню й одноріднішу транскрипцію BGC, на відміну, наприклад, від TSB (рис. 2, б). Наші метаболомні й транскриптомні дані вказують на перспективність середовища SG2 для докладного дослідження вторинного метаболому *S. albus* J1074.

Цю роботу підтримано грантами Бг-41Нр, М/26-2018 (Б.О.) і БГ-46Ф (В.Ф.), надані Міністерством освіти і науки України. Б.О. підтримано стипендією DAAD. Р.З. й Б.О. дякують Федеральному Міністерству розвитку і досліджень (BMBF) за підтримку досліджень у межах гранту 021DK17013 AWAKEDRUGS.

SECONDARY METABOLOME AND TRANSCRIPTOME OF *STREPTOMYCES ALBUS* J1074 IN LIQUID MEDIUM SG2

O.T. Koshla, I.V. Rokytskyu, I.S. Ostash, T. Busche, J. Kalinowski, E. Mösker, R.D. Süßmuth, V.O. Fedorenko, B.O. Ostash,

Ivan Franko National University of Lviv, 79005 Lviv, Ukraine
Technology Platform Genomics, Bielefeld University, 33615 Bielefeld, Germany
Technische Universität Berlin, Institut für Chemie, 10623 Berlin, Germany

E-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua, oksana.koshla@lnu.edu.ua, igorrito@gmail.com, iryna.ostash@lnu.edu.ua, tbusche@cebitec.uni-bielefeld.de, joern@cebitec.uni-bielefeld.de, eva.moesker@win.tu-berlin.de, roderich.suessmuth@tu-berlin.de, viktor.fedorenko@lnu.edu.ua, bohdan.ostash@lnu.edu.ua

Streptomyces albus J1074 is one of the most popular chassis for heterologous expression of actinobacterial biosynthetic gene clusters (BGCs). Considerable efforts are invested into understanding all the physiological and genetic aspects of secondary metabolism of J1074 in order to maximize the expression of heterologous BGCs.

It has to be noted that the J1074 genome itself is home to numerous (>20) BGCs, whose expression varies widely. Therefore, the identification of the factors limiting the expression of J1074 BGCs might help improve this strain for heterologous expression purposes. As first steps towards this goal, herein we describe the secondary metabolome of J1074 in liquid medium SG2, previously shown by us to support the production of antibacterial and antifungal compounds. We further compare the results of metabolomic studies with the transcriptome of J1074 in SG2 after 60 h of growth. Results of our studies are discussed in the context of current knowledge on the J1074 transcriptome and metabolome data.

ВТОРИЧНИЙ МЕТАБОЛОМ І ТРАНСКРИПТОМ *STREPTOMYCES ALBUS* J1074 В ЖИДКОЇ СРЕДЕ SG2

O.T. Кошла, I.V. Рокицький, I.C. Осташ, T. Буше, Й. Калиновски, E. Мёскер, Р.Д. Зюсмут, В.А. Федоренко, Б.О. Осташ

Streptomyces albus J1074 – одна из самых популярных платформ гетерологической экспрессии актинобактерийных биосинтетических генных кластеров (BGCs). Прилагают значительные усилия к тому, чтобы понять все физиологические и генетические аспекты вторичного метаболизма J1074; это должно максимизировать экспрессию гетерологических BGCs. Следует отметить, что геном J1074 содержит много (>20) BGCs, экспрессия которых сильно варьирует. Идентификация факторов, лимитирующих проявление BGCs в J1074 может помочь улучшить этот штамм для нужд гетерологической экспрессии. В качестве первого шага в этом направлении нами описано вторичный метаболом J1074 в жидкой среде SG2, которая, как было показано ранее, поддерживает продукцию противобактерийных и противогрибковых соединений. Мы сравниваем метаболомные данные с транскриптомом J1074 в SG2 на 60 час выращивания. Результаты наших исследований обсуждены в контексте текущего понимания метаболомных и транскриптомных данных для штамма J1074.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРА

1. Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V., and Luzhetskyy A., Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome, *BMC Genomics*, 2014, vol. 15, pp. 97–108. doi: 10.1186/1471-2164-15-97.
2. Bilyk, O., Luzhetskyy, A., Host organism: *Streptomyces*, in: *Industrial Biotechnology*, Wittmann, Ch., Liao, J.C., Eds, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2017, chapter 13, pp. 487–506. doi: 10.1002/9783527807796.ch13.

3. Brown, E.D. Wright, G.D., Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature*, 2016, vol. 529, no. 7586, pp. 336–43. doi: 10.1038/nature17042.
4. Katz, M., Hover, B.M., and Brady, S.F., Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 43, no. 2–3, pp. 129–41. doi: 10.1007/s10295-015-1706-6.
5. Olano C., García, I., González, A., Rodríguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braca, A.F., Méndez, C., and Salas, J.A., Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074, *Microb. Biotechnol.*, 2014, vol. 7, no. 3, pp. 242–56. doi: 10.1111/1751-7915.12116.
6. Ahmed, Y., Rebets, Y., Tokovenko, B., Brötz, E., and Luzhetskyy, A., Identification of butenolide regulatory system controlling secondary metabolism in *Streptomyces albus* J1074, *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 9784. doi: 10.1038/s41598-017-10316-y.
7. Xu, F., Nazari, B., Moon, K., Bushin, L.B., Seyedsayamdost, M.R., Discovery of a cryptic antifungal compound from *Streptomyces albus* J1074 using high-throughput elicitor screens, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, vol. 139, no. 27, pp. 9203–12. doi: 10.1021/jacs.7b02716.
8. Koshla, O., Lopatniuk, M., Rokytskyy, I., Yushchuk, O., Dacyuk, Y., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., and Ostash B., Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA^{Leu}_{UAA} gene *bldA*, *Arch. Microbiol.*, 2017, vol. 199, no. 8, pp. 1175–83. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7.
9. Bilyk, B., Luzhetskyy, A., Unusual site-specific DNA integration into the highly active pseudo-*attB* of the *Streptomyces albus* J1074 genome, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 11, pp. 5095–104. doi: 10.1007/s00253-014-5605-y.
10. Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Beppu, T., A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp., *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, no. 23, pp. 7585–94. doi: 10.1128/jb.174.23.7585-7594.1992.
11. Wittchen, M., Busche, T., Gaspar, A.H., Lee, J.H., Ton-That, H., Kalinowski, J., and Tauch A., Transcriptome sequencing of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 provides detailed insights into its transcriptional landscape and into DtxR-mediated transcriptional regulation, *BMC Genomics*, 2018, vol. 19, no. 1, pp. 82–92. doi: 10.1186/s12864-018-4481-8.
12. Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C., and Kalinowski, J., Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique, *BMC Genomics*, 2013, vol. 14, pp. 888–99. doi: 10.1186/1471-2164-14-888.
13. Lopatniuk, M., Myronovskyy, M., and Luzhetskyy, A., *Streptomyces albus*: a new cell factory for non-canonical amino acids incorporation into ribosomally synthesized natural products, *ACS Chem. Biol.*, 2017, vol. 12, no. 9, pp. 2362–2370.
14. Kallifidas, D., Jiang, G., Ding, Y., and Luesch, H., Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters, *Microb. Cell Fact.*, 2018, vol. 17, no. 1, pp. 25–37. doi: 10.1021/acscchembio.7b00359.
15. Horbal, L., Luzhetskyy, A., Dual control system – a novel scaffolding architecture of an inducible regulatory device for the precise regulation of gene expression, *Metab. Eng.*, 2016, vol. 37, pp. 11–23. doi: 10.1016/j.ymben.2016.03.008.
16. Landwehr, W., Wolf, C., and Wink, J., Actinobacteria and myxobacteria – two of the most important bacterial resources for novel antibiotics, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2016, vol. 398, pp. 273–302. doi: 10.1007/82_2016_503.
17. Urem, M., Świątek-Połatyńska, M.A., Rigali, S., and van Wezel, G.P., Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*, *Mol. Microbiol.* 2016, vol. 102, no. 2, pp. 183–95. doi: 10.1111/mmi.13464.
18. Braca, A.F., Rodríguez, M., Pahari, P., Rohr, J., García, L.A., and Blanco, G., Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*, *Arch. Microbiol.*, 2014, vol. 196, no. 5, pp. 345–55. doi: 10.1007/s00203-014-0977-z.

Надійшла 15.08.18