

УДК 575.224+577.21

## УЧАСТЬ МОЛЕКУЛ (p)ppGpp У ФОРМУВАННІ «СТРОГОЇ ВІДПОВІДІ» У БАКТЕРІЙ, А ТАКОЖ БІОСИНТЕЗІ АНТИБІОТИКІВ І МОРФОЛОГІЧНІЙ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ У АКТИНОМІЦЕТІВ

Д.О. КЛИМИШИН<sup>1,2,3</sup>, О.М. СТЕФАНИШИН<sup>2</sup>, В.О. ФЕДОРЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

<sup>2</sup> Інститут біології тварин НААН України, Львів

<sup>3</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка

E-mail: klymyshyn.d@gmail.com

*Строга відповідь* — це плейотропна фізіологічна реакція клітини, викликана недостаткою аміноацильованих тРНК і, відповідно, зупинкою синтезу білка. Експериментально така відповідь може бути викликана як нестачею амінокислот у середовищі, так і обмеженням здатності до аміноацилювання молекул тРНК навіть за наявності відповідних амінокислот у клітині. Багато рис такої відповіді вказують на її залежність від накопичення молекул ppGpp. Існує зв'язок між швидкістю росту актиноміцетів та біосинтезом ними вторинних метаболітів. Зокрема встановлено, що введення додаткових копій гена ppGpp синтетази relA може впливати на рівень продукції антибіотиків стрептоміцетів. В огляді наведено власні експериментальні дані авторів, присвячені дослідженням впливу гетерологічної експресії гена relA в клітинах *Streptomyces nogalater* — продуценті ноґаламіцину.

**Ключові слова:** строга відповідь, ppGpp, RelA-синтетаза, *Streptomyces*.

**Вступ.** Малі сигнальні молекули ppGpp є похідними ГДФ, що містять пірофосфатну групу, приєднану до 3'-гідроксильного залишку рибози [1, 2]. Часто процес накопичення ppGpp супроводжується акумуляцією їхніх аналогів — pppGpp, тому зазвичай використовують спільну назву — молекули (p)ppGpp [3, 4].

Генетичні дані про те, що строга відповідь у клітині здійснюється завдяки одному механізму,

отримано шляхом аналізу мутантів *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium* за одним локусом, що були здатні до зміни такої відповіді [5]. Ген цього локусу початково назвали геном RC (від «RNA control gene»), тому що першою виявленою фенотиповою рисою строгої відповіді було швидке інгібування тРНК і синтезу рРНК. Регуляторні зв'язки між наявністю амінокислот у клітині і акумуляцією РНК назвали «строгим контролем». Вони викликали значний інтерес, бо раніше зв'язок між метаболізмом РНК і амінокислот був невідомим. У мутантів із зміненою строгою відповіддю спостерігався стабільний синтез РНК, що продовжувався (хоча із тенденцією до зниження) під час нестачі амінокислот у клітині. Така поведінка мутантних клітин була навана «розслабленою» (relaxed) у порівнянні з диким типом. Згодом алель дикого типу RC<sup>sr</sup> і мутантний алель RC<sup>rel</sup> отримали назву relA<sup>+</sup> і relA відповідно [6].

Під час досліджень мутантів за геном relA, не здатних до накопичення молекул (p)ppGpp за умови нестачі амінокислот у середовищі, було запропоновано гіпотезу про участь даних молекул як ефекторів впродовж строгої відповіді. Вважалося, що синтез (p)ppGpp відбувається на рибосомах, які припинили синтез поліпептидів через відсутність відповідних аміноацильованих молекул тРНК. Ця реакція, імовірно, забезпечується приєднаною до рибосом RelA-синтетазою [7].

У ході ранніх досліджень мутантів за геном relA і сформовано гіпотезу про існування додаткового механізму синтезу (p)ppGpp. Підтвердження отримано завдяки конструюванню мутантів ΔrelA. Згодом бу-

© Д.О. КЛИМИШИН, О.М. СТЕФАНИШИН,  
В.О. ФЕДОРЕНКО, 2016

ли отримані мутантні штами із делеціями генів *relA* і *spoT*, такі штами не синтезували (p)ppGpp. Відкриття цих двох генів дозволило впливати на концентрації молекул (p)ppGpp у клітині без зміни вмісту поживних речовин в середовищі [7–9].

Сьогодні існують дані про відсутність кореляційного зв'язку між накопиченням малих сигнальних молекул і виявом різних фенотипових рис строгої відповіді; часто у таких випадках пропонуються альтернативні регуляторні механізми. Сучасні дослідження свідчать про те, що практично усі регуляторні ефекти, які спостерігаються під час строгої відповіді у клітині, залежать від змін концентрації молекул (p)ppGpp. Зокрема відомо, що мутації, які змінюють метаболізм (p)ppGpp, впливають на формування строгої відповіді і навпаки. Важливо, що мутанти із порушеннями такої залежності ніколи не були отримані [3, 10, 11].

#### Компоненти системи строгої відповіді

*Реакція синтезу (p)ppGpp in vitro.* Вперше було експериментально обґрунтовано механізм синтезу (p)ppGpp молекул *in vitro*. Для цього використали РНК фага R17, що транслювалася рибосомами у присутності факторів ініціації трансляції та молекулу fMet-тРНК<sup>Met</sup>.

Для початку синтезу молекул (p)ppGpp необхідна наявність вільних молекул, не з'єднаних з відповідними амінокислотами — тРНК<sup>Ala</sup>, тРНК<sup>Ser</sup> і тРНК<sup>Lys</sup>. Аміноацильовані тРНК не стимулювали синтез (p)ppGpp навіть у суміші з вільними аналогами. Зазначено також, що молекули Ala-тРНК<sup>Ala</sup> і Ser-тРНК<sup>Ser</sup> у суміші з факторами EF-Tu та EF-Ts зупиняють синтез молекул (p)ppGpp, активованих відповідними неаміноацильованими тРНК. Це пояснюється зв'язуванням комплексу аміноацильованої молекули тРНК, EF-Tu і ГТФ у А-сайті рибосоми, який витісняє вільні молекули тРНК і таким чином сприяє транслокації рибосоми на наступний унікальний кодон серину. Ця дія одночасно усуває стимулюючий ефект тРНК<sup>Ala</sup> і тРНК<sup>Ser</sup> та викликає потребу у наявності молекул тРНК<sup>Lys</sup> для запуску реакції синтезу (p)ppGpp. Отже для RelA-залежної реакції синтезу (p)ppGpp необхідна зупинка рибосоми під час елонгації на так званому «голодному кодоні» і неферментативне зв'язування відповідної неаміноацильованої тРНК у А-сайті рибосоми, що містить даний кодон. Встановлено, що транслокація рибосом і наявність факторів ініціації та елонгації трансляції (IF1, IF2, IF3, EF-Tu, EF-Ts, EF-G) не є необхідною умовою для проходження реакції. Вважається, що кожен цикл синтезу (p)ppGpp молекули супроводжується від'єднанням неаміноацильованої тРНК від рибосоми (рис. 1) [12–14].

Синтез (p)ppGpp здійснюється RelA-синтетазою за рахунок перенесення пірофосфатної групи з молекули АТФ на 3'-гідроксильну групу ГДФ чи ГТФ

(рис. 2). Донорами у такій реакції можуть бути лише молекули АТФ і дАТФ, а роль акцепторів не можуть виконувати дезоксипуринові та піримідинові нуклеотиди. Доведено, що реакція синтезу малих сигнальних молекул не чутлива до низьких концентрацій хлорамфеніколу чи до такої кількості фузидієвої кислоти, достатньої для блокування транслокації рибосом *in vitro*. Однак акумуляція молекул (p)ppGpp під час строгої відповіді *in vivo* інгібується антибіотиками, включаючи хлорамфенікол. Є просте пояснення такої різниці у чутливостях реакцій *in vivo* та *in vitro*: будь-яке джерело зменшення рівнів синтезу білка у клітині відповідно зменшує потребу у аміноацил-тРНК молекулах, що призводить до відновлення нормального співвідношення між аміноацильованими та вільними тРНК [1, 15, 16].

Синтез молекул (p)ppGpp може індукуватися не лише нестачею амінокислот у середовищі [17], але й іншими несприятливими умовами, наприклад низьким вмістом фосфору, заліза, джерела карбону чи жирних кислот у середовищі [18].

Доведено, що ацилпереносний білок (АПБ) має здатність взаємодіяти з SpoT (фермент, що одночасно володіє здатністю до синтезу молекул (p)ppGpp та їхнього розкладу до ГТФ/ГДФ і пірофосфату). Ця взаємодія є необхідною для акумуляції (p)ppGpp у відповідь на нестачу жирних кислот, вона має здатність змінювати рівновагу між синтетичною і гідролітичною активностями SpoT. Запропоновано гіпотезу, згідно з якою шляхом взаємодії SpoT і АПБ передається інформація про кількість джерел карбону у клітині. Очевидно, що нестача джерел карбону може знижувати швидкість гліколізу, тим самим викликаючи зниження кількості жирних кислот у клітині [19].

#### Гени, задіяні у формуванні строгої відповіді, та їхні продукти

*Гену relA і relA1.* Ген *relA* розташований на 59,2-й хвилині хромосоми *Escherichia coli* і вперше клонований у складі ColE1 плазмід. Присутність цього гена у великій кількості копій в клітині спричиняє підвищення рівня молекул (p)ppGpp і сповільнює ріст бактерій. Ген *relA* входить до складу великого оперону, що фланкується генами метилази тРНК і генами *mazE*, *mazF* (включені у підтримання стабільності плазмід R100 у клітині). Даний ген складається з 743 кодонів, що забезпечують синтез білка розміром 84 кДа, відкрита рамка читування гена *relA* термінується стоп-кодоном, який за умов супресії подовжує білок на 27 амінокислотних залишків, таким чином інактивує його [20].

Мутантний алель *relA1* містить елемент IS2, який знаходиться між 85 і 86 кодонами, володіє слабкою залишковою активністю по відношенню до синтезу молекул (p)ppGpp. Лише наявність висококопійних

плазмід, що містять ген *relA1* у клітині, забезпечує синтез малих сигнальних молекул у кількостях, характерних для клітин дикого типу. Причини такої залишкової активності довгий час були невідомими, але пізніше встановили, що послідовність елемента IS2 кодує пептид, який складається з дев'яти амінокислот і приєднується до білка RelA. Таким чином синтезуються два фрагменти, здатні до комплементування *in trans* і часткової здатності синтезувати (p)ppGpp [3, 4].

Сконструйовано аallel гена *relA1*, що містив інсерцію гена стійкості до канаміцину (позначений як аallel *relA251*). За допомогою рекомбінації *relA251* (що знаходився у складі вектора) з хромосою отримали штам *E. coli* із зруйнованим геном *relA*. Цей штам не накопичував молекули (p)ppGpp під час строгої відповіді [4].

Ген *relB*. Мутації у локусі *relB* «ослаблюють» строго відповідь впродовж 10 хв від її початку. Мало відомо про деталі механізму дії такого «ослаблення». Отримано три мутантних штами (*relB101-103*), що характеризувалися сповільненою акумуляцією РНК після початку строгої відповіді. Ці штами також виявляли підвищену чутливість до хлорамфініколу і сульфаметаміду під час нормального росту. Для штаму, що містив аallel *relB101*, характерна короткочасна акумуляція ppGpp у відповідь на нестачу амінокислот, що відбувається паралельно із строгою відповіддю, з поступовим зниженням кількості ppGpp, яка збігається із початком «ослабленої» відповіді [21].

Поблизу локусу *relB* ідентифіковано три відкриті рамки зчитування – *relD*, *relE* і *relF*. Послідовність RelB виявляє 40 % гомології до фактора *hok*, що кодується системою *parB* плазмиди R1. Показано, що і надекспресія RelB викликає пошкодження клітин, як у випадку із фактором *hok* [22].

Ген *relC* (*rplK*). RelA-залежний синтез молекул (p)ppGpp на рибосомах наводив на думку про існування мутацій у генах, що кодують білки рибосом, які можуть виявлятися через «ослаблений» фенотип. Такі мутації ідентифіковані у гені *rplK*, що забезпечує синтез рибосомного білка L11 шляхом оброблення пеніциліном клітин з пролонгованою затримкою росту після нестачі амінокислот. Рибосоми, що містили мутантну форму білка L11, продовжували зв'язувати RelA, але виявляли близько 10 % від синтетичної активності (p)ppGpp *in vitro*. Білок L11 також включений до механізмів стійкості клітини до тіострептону – антибіотика, що інгібує синтез малих сигнальних молекул на рибосомах *in vitro* [23].

Мутанти за геном *relC* є лейцин-чутливими і виявляють довгу затримку перед початком росту, після зміни повноцінного середовища на середовище, що містить L-лейцин [24].

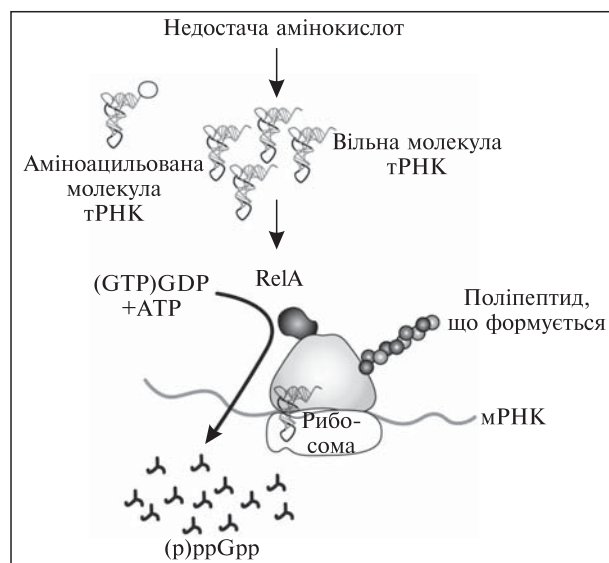


Рис. 1. Схема реакції біосинтезу молекул (p)ppGpp у відповідь на нестачу амінокислот у середовищі

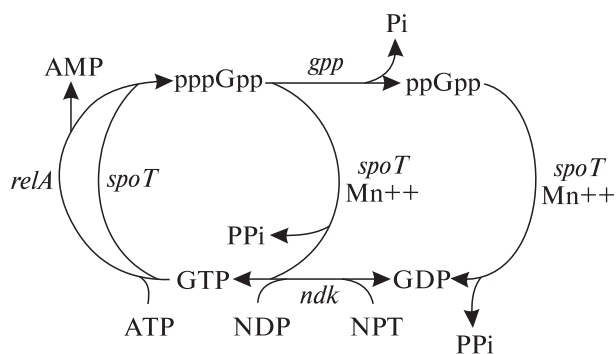


Рис. 2. Схема клітинних шляхів метаболізму молекул (p)ppGpp (деякі можливі перетворення не зображені; наприклад білок RelA може здійснювати перетворення ГДФ до ррGpp, але фізіологічні рівні ГДФ менші у порівнянні з ГТФ, тому частіше відбувається синтез молекул рррGpp з ГТФ)

Ген *relX*. Вперше рецесивну мутацію у гені *relX* описано у 1978 р. Вона виявлялася у десятиразовому зменшенні базального рівня ppGpp у *relA*-мутантів під час росту на середовищі з глюкозою (зазвичай *relA*-мутації мають незначний вплив на базальний рівень ppGpp впродовж експоненційної фази росту культури). Серед інших фенотипових ознак таких мутантів було і зниження життєздатності після швидкої зміни температури від 28 до 42 °C [25].

Ген *spoT*. Білок SpoT імовірно є біфункціональним ферментом, що володіє одночасно (p)ppGpp 3'-пірофосфогідролазною та 3'-пірофосфотрансфе-

разною активністю, у другому випадку використовуючи ГТФ як акцептор. Мутанти за геном *spoT* зазвичай характеризуються такими дефектами метаболізму молекул (p)ppGpp: 1) підвищеним базальним вмістом ppGpp і одночасно повільним, збалансованим ростом; 2) підвищеним рівнем ppGpp під час строгої відповіді; 3) повільними темпами розпаду ppGpp за умов строгої відповіді; 4) низькою здатністю до акумуляції rppGpp під час строгої відповіді [26].

Ген *spoT* розташований на 82-й хвилині хромосоми *E. coli*, входить до складу оперону разом з чотирма іншими генами (гени розташовані у такому порядку: *gmk-rpoZ-spoT-spoU-recG*), кодує білок розміром 79 кДа. Цікаво, що незважаючи на «співпрацю» *gmk* і *spoT*, які разом включені у метаболізм гуаніну, гени цього оперону не мають відомої спільної функції, щоб пояснювала їхнє розташування в одному опероні [9, 26].

Блок SpoT є головним ферментом деградації молекул (p)ppGpp. Продуктами такої реакції зазвичай є ГДФ (ГТФ) і пірофосфат. Для проходження реакції фермент потребує наявності іонів  $Mg^{2+}$  та  $Mn^{2+}$ . За нормальних умов SpoT постійно продукується в клітині у низьких концентраціях. Виявлено фізіологічно менш активні, SpoT-незалежні шляхи деградації молекул ppGpp, яка відбувається в екстрактах, виділених з *relA1 spoT1* подвійних мутантів (у таких екстрактах знайдено продукти ppGp, pGpp та pGr) [26].

При порівнянні послідовностей білків SpoT і RelA встановлено наявність значної гомології між ними. Припущення, що блок SpoT може бути включений у синтез молекул (p)ppGpp, підтвержені після конструювання мутантів із делеціями гена *spoT*. У штампів із мутаціями за цим геном синтез малих сигнальних молекул повністю припинявся [27]. Синтез (p)ppGpp відновлювався лише після їхньої комплементації векторами, що містили ген *spoT*. Цікаво, що грампозитивні бактерії часто не містять гомологів SpoT, але включають білки RelA, які володіють здатністю до синтезу і гідролізу (p)ppGpp. Структурне вивчення каталітичного фрагменту біфункціонального RelA білка у *Streptococcus equisimilis* виявило два негативно координовані активні сайти, завдяки яким відбувається зміна вмісту (p)ppGpp у клітині.

Ген *gpp*. Розташований на 84-й хвилині хромосоми *E. coli*, кодує гуанозин пентафосфатазу ((p)ppGpp-γ-фосфогідролазу), що є основним регулятором вмісту rppGpp по відношенню до ppGpp під час строгої відповіді у бактерій [25]. Мутанти за цим локусом ідентифіковані за допомогою прямого скринінгу серед клітин, оброблених нітрозогуанідом, що мали підвищений вміст rppGpp після амінокислотного голодування. Отримані мутантні штами (*gpp-1* штами) характеризувалися зростанням рівня синтезу

rppGpp; загалом вміст (p)ppGpp зростав у два рази в порівнянні з диким типом. Білок Gpp має здатність до гідролізу олігорибонуклеотидів, що містять 5'-трифосфатний «хвіст», до того часу, поки така молекула містить 3'-фосфатні групи. Наприклад, молекули rppGpNp гідролізуються, а rppGpN – ні. Гідролітична активність ферменту знижується із зростанням кількості 3'-фосфатних груп.

Встановлено також, що надпродукція білка Gpp викликає надзвичайно низькі рівні синтезу rppGpp, які практично неможливо визначити у клітинах [4]. Виявлено взаємозв'язок між Gpp і деградацією поліфосфатних молекул у клітині. Поліфосфатний оперон містить два гени: поліфосфаткінази – *ppk* та поліфосфатекзонуклеази – *ppx*. Руйнування гена *ppk* інсерцією гена стійкості до канаміцину дуже знижує активність Ppx *in vitro* завдяки прояву полярного ефекту інсерції. Виділення джерела залишкової активності Ppx і подальше порівняння амінокислотних послідовностей показало його ідентичність до Gpp. Подальші дослідження засвідчували, що Gpp дійсно володіє поліфосфатфосфатазною активністю, тоді як Ppx – (p)ppGpp-γ-фосфогідролазною активністю [4].

Ген *ndk*. Ген *ndk* *E. coli* кодує нуклеозиддифосфаткіназу, що забезпечує перетворення ГДФ у ГТФ, створюючи субстрат для синтезу молекул rppGpp. Під час досліджень гена *ndk* ідентифіковано мутантний алель *ndk-1*, розташований на 55-й хвилині хромосоми *E. coli*, що спричиняв зміну активності ферменту Ndk, однак інші можливі впливи на рівень молекул (p)ppGpp не досліджувалися [4].

#### Кінетика метаболізму молекул (p)ppGpp

Для клітин на експоненційній фазі росту характерними є незначні базальні концентрації (p)ppGpp (від 10 до 30 пмоль/ $A_{450}$ ), що починають зростати протягом кількох секунд після початку строгої відповіді. Цей процес продовжується до 5–15 хв, після чого концентрація малих сигнальних молекул досягає свого максимального значення. Надалі відбувається зниження концентрації молекул (p)ppGpp до нового базального значення, що перевищує вихідне у 10–20 разів. Одночасно із зростанням концентрації малих сигнальних молекул відбувається поступове зменшення кількості ГТФ у клітині. Показано, що молекули rppGpp спочатку синтезуються за рахунок ГТФ і далі перетворюються у ppGpp (хоча можливі і зворотні перетворення, що відбуваються із нижчою частотою) [20].

Вміст rppGpp у клітині залежно від алельного стану генів *spoT* і *gpp* може змінюватися від надлишку rppGpp по відношенню до ppGpp у мутантів *gpp* і до протилежної ситуації у випадку за геном *spoT* [14].

Перетворення rppGpp відбувається у клітинах *E. coli* протягом 10 с завдяки проходженню двох

процесів: гідролізу ppGpp до rppGpp, що переважно каталізується білком Gpp, і гідролізу rppGpp до ГТФ, що каталізується білком SpoT. Перетворення ppGpp до ГТФ здійснюється ферментом SpoT впродовж 20–30 с. За умови додавання інгібіторів синтезу білків чи амінокислот у середовище спостерігаються швидкі темпи деградації молекул (p)ppGpp. Постійне швидке перетворення (p)ppGpp протягом стаціонарної фази є ознакою еквівалентно швидких темпів його синтезу [14, 28].

#### Регуляція процесів транскрипції, трансляції і реплікації молекулами (p)ppGpp

*Регуляція процесів транскрипції.* Малі сигнальні молекули викликають ґрунтовні транскрипційні зміни, включаючи репресію стабільного синтезу рРНК і тРНК молекул, а також індукцію транскрипції генів факторів стресу і генів біосинтезу та транспорту амінокислот. Таке «репрограмування» клітини включає зміну активності кількох сотень генів. Незважаючи на глобальність таких змін, більша частина їх може бути пояснена взаємодіями між РНК-полімеразою, молекулами (p)ppGpp, промоторами генів,  $\sigma$ -факторами і DksA-кофактором (присутність DksA необхідна для виявлення впливу (p)ppGpp на транскрипцію з промоторів генів біосинтезу амінокислот і промоторів рРНК генів *in vivo*) [14, 28].

Протягом тривалого часу було незрозуміло, яким чином визначається регуляція промоторів генів молекулами (p)ppGpp. Порівняння структури промоторів генів рРНК і генів біосинтезу амінокислот дозволило створити послідовну модель такої регуляції. Промотори генів рРНК містять ГЦ-багату послідовність між послідовністю –10 і сайтом початку транскрипції. Ця послідовність здатна до специфічної взаємодії з консервативною ділянкою РНК-полімерази під час ініціації транскрипції. Такі промотори мають здатність до формування надзвичайно нестабільних відкритих комплексів з РНК-полімеразою. (p)ppGpp/DksA зменшує стабільність відкритого комплексу і таким чином інгібує ініціацію транскрипції. Промотори генів біосинтезу амінокислот на відміну від промоторів генів рРНК містять АТ-багату ділянку, послідовність якого забезпечує оптимальне зв'язування з РНК-полімеразою. У цьому випадку також формуються відкриті комплекси, але вони є достатньо стабільними для ініціації процесу транскрипції [16, 28].

Існують також непрямі шляхи впливу молекул (p)ppGpp на процеси транскрипції. Наприклад, малі сигнальні молекули сприяють від'єднанню РНК-полімерази від промоторів генів рРНК. Можливо, що *in vivo* прямий і непрямий шляхи впливу перетинаються та мають здатність діяти на різних рівнях і різних промоторах.

Важливим механізмом, що забезпечує переключення транскрипційної активності, є зміна використання  $\sigma$ -факторів. Молекули (p)ppGpp забезпечують від'єднання РНК-полімерази від  $\sigma^{70}$ -залежних генів і, відповідно, зміну рівноваги на користь генів, що транскрибуються за участі альтернативних  $\sigma$ -факторів. У випадку фактора  $\sigma^s$  (специфічний  $\sigma$ -фактор, який використовується для транскрипції на стаціонарній фазі росту) молекули (p)ppGpp індукують транскрипцію таких  $\sigma^s$ -факторів і збільшують їхню стабільність [5, 12]. Отже, малі сигнальні молекули разом із DksA можуть змінювати ініціацію транскрипції шляхом утилізації альтернативних  $\sigma$ -факторів.

*Регуляція процесів трансляції і реплікації.* Малі сигнальні молекули мають здатність інгібувати трансляцію за рахунок репресії транскрипції генів, які кодують компоненти системи біосинтезу білка. Показано, що (p)ppGpp можуть інгібувати експресію факторів елонгації EF-Tu і EF-G *in vitro*. Останні дослідження демонструють, що молекули (p)ppGpp здатні до зв'язування фактора ініціації трансляції IF2. В результаті цього інгібується утворення ініціаторного комплексу і утворення дипептиду. ГТФ і (p)ppGpp мають здатність зв'язуватися із фактором IF2, в результаті чого негативно заряджений 3'-фосфатний залишок (p)ppGpp змінює структуру IF2 і дестабілізує його. Припускається, що IF2 під час росту клітини знаходиться у ГТФ-зв'язаному активному стані і (p)ppGpp-зв'язаному неактивному стані впродовж строгої відповіді [29].

Реплікація ДНК підлягає складній регуляції під час нестачі поживних речовин в середовищі або за інших стресових умов. У *E. coli* ініціація реплікації може інгібуватися малими сигнальними молекулами аж до відновлення відповідних сприятливих умов. Не встановлено точно, чи контроль реплікації допомагає зберегти цілісність геному, чи полегшує проходження стрес-індукованого мутагенезу, що, як відомо, полегшується молекулами (p)ppGpp [14, 28].

#### Зв'язок між швидкістю росту та біосинтезом антибіотиків у актиноміцетів

Існує зв'язок між швидкістю росту актиноміцетів та біосинтезом ними вторинних метаболітів. Часто затримка росту є сигналом для початку синтезу антибіотиків. Зокрема, в актиноміцетів важливу роль у цих процесах відіграє поліфосфорильований нуклеотид – ppGpp. Так само, як і в *E. coli*, він утворюється з АТФ та ГТФ за участі зв'язаної з рибосомами ppGpp-синтетази RelA [34].

Делеція кодуючої послідовності гена ppGpp синтетази (*relA*) у *S. coelicolor* A3 (2) призводила до інгібування синтезу ppGpp. Блокування продукції і накопичення ppGpp спостерігалось як при переході *S. coelicolor* до стаціонарної фази росту за умов азот-

ного голодування, так і за амінокислотного голодування під час експоненціальної фази росту [30].

Руйнування гена *eshA*, який кодує білок 52 кДа, призводило до повного припинення синтезу актинородину у *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Разом з цим інактивація *eshB*, найближчого гомолога *eshA*, не мала ніякого ефекту на продукцію антибіотика. Мутанти за геном *eshA* накопичували значно нижчі концентрації внутрішньоклітинного ррGpp, ніж штам дикого типу. Синтез актинородину відновлювався за експресії у клітинах *eshA*<sup>-</sup> штамів гена *relA*, при цьому також спостерігалось відновлення концентрації ррGpp до вихідного рівня. Ці результати підтверджували залежність синтезу актинородину від внутрішньоклітинної концентрації ррGpp у *S. coelicolor* A3 (2) [31, 32].

Мутанти за геном *relA* не продукували ундецилпродегіозин та актинородин за умов культивування бактерій на середовищах з низькими концентраціями нітрогена, який регулює синтез обох антибіотиків через шлях-специфічні регулятори *redD* та *actII-ORF4*. Інгибування вторинного метаболізму у *relA* мутантів також супроводжувались змінами морфологічної диференціації (розміром, кольором колоній, формуванням повітряного міцелію тощо) *S. coelicolor* [33].

Як і для *E. coli*, для *S. coelicolor* встановлено, що результатом накопичення ррGpp є зміна експресії генів, яка супроводжується зменшенням рівня транскрипції «постійних» генів, що функціонують за звичайних умов, зростанням синтезу альтернативних  $\sigma$ -факторів, які є основними факторами транскрипції генів у стаціонарній фазі, а також активацією транскрипції оперонів деяких амінокислот. Для активації RelA в *S. coelicolor* необхідний білок RelC. У мутантів *relC*, які дефектні за рибосомним білком L11 і не утворюють ррGpp, відсутній синтез вторинних метаболітів [34]. Для перевірки гіпотези про ключову роль ррGpp одержано мутант *relA*, що не утворював ррGpp за умов амінокислотного голодування. Аналіз його росту свідчить про те, що залежно від складу середовища біосинтез актинородину і ундецилпродегіозину відбувається або ні. Проте збільшення утворення *ppGpp* значно пришвидшує початок транскрипції шлях-специфічного регулятора *actII-ORF4* (шлях-специфічного позитивного регулятора біосинтезу антибіотиків у *S. coelicolor*) в штамі *S. coelicolor*, а як наслідок – підвищує рівень продукції актинородину [30].

Індукція синтезу ррGpp пригнічує транскрипцію  $\sigma$ -фактора *hrdB*, а також генів, продукти яких асоціюються із функціями, пов'язаними з активним ростом та морфологічною диференціацією бактерій. В *S. coelicolor* синтез молекул ррGpp викликає різке «перемикання» морфологічної диференціації з транскрипцією генів, що експресуються під час стаціо-

нарної фази росту, в тому числі і генів вторинного метаболізму. Однією із причин цього явища є істотне зниження транскрипції  *$\sigma$ -hrdB* із подальшою індукцією альтернативних  $\sigma$ -факторів, зокрема SCO4005 [34].

В дослідженнях показано, що у *S. coelicolor* на відміну від *E. coli* молекули ррGpp здатні інгібувати активність полінуклеотидфосфорилази [35]. Очевидно, що регуляція транскрипції молекулами ррGpp має ключове значення в генетичному контролі вторинного метаболізму у *S. coelicolor*.

Гомологи гена *relA* також виявлено в штаммах *S. antibioticus* та *S. clavuligerus* [36]. Ген *relA* *S. antibioticus* кодує білок з Mr 93653, який на 91 % ідентичний відповідному білку *S. coelicolor*. Штами *S. antibioticus* із зруйнованим геном *relA* значно повільніше ростуть на повноцінних та мінімальних агаризованих середовищах, а також характеризуються сповільненням синтезу актиноміцину у порівнянні із штамом дикого типу. Штами *relA*<sup>-</sup> не накопичували ррGpp у концентраціях, значно нижчих від тих, які спостерігаються під час нормального процесу росту і синтезу актиноміцину в *S. antibioticus* дикого типу. У цих бактерій знижується експресія актиноміцинсинтетази – ключового фермента у біосинтезі антибіотика. Зміни умов культивування також не відновлювали синтез актиноміцину [36].

Ген ррGpp синтетази *relA* *S. clavuligerus* був клонований та секвенований, він локалізований у висококонсервативній для видів *Streptomyces* ділянці геному. Мутанти з делеціями в гені *relA* втрачали здатність формувати спори та повітряний міцелій. Фенотип відновлювався за комплементції *relA*<sup>-</sup> нативним геном *relA*. Синтез сигнальних молекул ррGpp та rppGpp не відбувався у досліджуваних мутантів *S. clavuligerus*. За таких умов спостерігалось істотне зростання синтезу клавуланової кислоти та цефаміцину в порівнянні із продукцією антибіотика клітинами штаму дикого типу. Зокрема, синтез клавуланової кислоти збільшився в 3–4 рази, у той час як цефаміцину – в 2,5 рази. У мутантів *relA* спостерігалось зростання транскрипції генів, що беруть участь в біосинтезі клавуланової кислоти (*ceaS2*) та цефаміцину (*cefD*), у порівнянні зі штамом дикого типу. Комплементція мутації знижувала продукцію антибіотиків до рівнів дикого типу *S. clavuligerus*. Ці результати підтверджують взаємозв'язок між процесами морфологічної диференціації та синтезу клавуланової кислоти та цефаміцину *S. clavuligerus*, а також вказують на потенційну можливість застосування даних щодо негативної регуляції процесів антибіотикоутворення молекулами (р)ррGpp для підвищення продукції антибіотиків [37].

Процеси утворення молекул (р)ррGpp досліджувалися за різних умов часу морфологічної і фізіологічної диференціації *S. clavuligerus* [37, 38]. Зок-

рема гени, що кодують RelA and Rsh, були зруйновані інсерціями генів стійкості до гігроміцину та апраміцину відповідно. Синтез ppGpp в *relA*-дефектному штамі повністю пригнічувався за умов амінокислотного голодування. У штамі *rsh*<sup>-</sup> синтез сигнальних молекул зберігався, проте був значно зниженим у порівнянні із продукцією диким типом *S. clavuligerus*. Мутація в *relA* впливала на культурно-морфологічні характеристики *S. clavuligerus*. Бактерії характеризувались повільним ростом у рідких та втрачали здатність до формування повітряного міцелію на твердих середовищах. Мутанти за геном *rsh* не відрізнялися фенотипом від штаму дикого типу. Однак синтез як клавуланової кислоти, так і цефаміцину C був повністю блокований в обох мутантів. Такі результати впливу інактивації гена *relA* пояснювались різними умовами ферментації *S. clavuligerus*, складом поживних середовищ, що могло мати неопосередкований вплив на синтез антибіотиків. В подальшому ці припущення підтвердились і для інших актиноміцетів. Отримані результати вказують на те, що ppGpp може бути задіяним як у позитивній, так і негативній регуляції біосинтезу вторинних метаболітів. Хоча детальні механізми цієї регуляції і досі залишаються нез'ясованими, встановлено, що RelA відповідає за морфологічну і фізіологічну диференціації в *S. clavuligerus*, регулюючи строгу відповідь бактерій на умови голодування за амінокислотами [38].

Досліджено вплив внутрішньоклітинного накопичення ppGpp та координованого зниження пулу GTP для ініціації морфологічної і фізіологічної диференціації *S. griseus* – продуцента стрептоміцину за різних умов культивування бактерій. Виявлено, що додавання у середовище декоїніну, специфічного інгібітора GMP-синтетази, повністю блокувало розвиток повітряного міцелію, а також знижувало продукцію стрептоміцину. Це різке зниження синтезу антибіотика супроводжувалась зменшенням внутрішньоклітинного накопичення молекул ppGpp. Вдалося виділити «розслаблений» (*rel*<sup>-</sup>) мутант серед 25 тіопептин-резистентних спонтанних мутантів. Цей мутант характеризувався зниженою здатністю накопичувати ppGpp під час експоненціальної фази росту та зниженим пулом GTP у порівнянні із *rel*<sup>+</sup> штамом. Виявилось, що *rel*<sup>-</sup> не здатний індукувати ферменти амідинтрансферазу і стрептоміцинкази, які відіграють ключову роль у біосинтезі стрептоміцину у *S. griseus*. Очевидно, що морфологічна диференціація *S. griseus* регулюється зниженням внутрішньоклітинного рівня GTP, у той час як фізіологічна диференціація безпосередньо підпорядковується рівням експресії гена *rel* [39].

Роль *relA* у біосинтезі антибіотиків вивчалась і на «немоделльних» об'єктах генетики стрептоміцетів: *S. nogalater*, *S. echinatus*, *S. peucetius*, *S. sioyaensis* та ін.

Зокрема досліджено вплив гена *relA* на вторинний метаболізм та морфологічні характеристики продуцентів антрациклінових антибіотиків ногаламіцину, аранціаміцину, доксорубіцину. Ногаламіцин – полікетидний антрацикліновий антибіотик, що володіє протипухлинними властивостями. Похідні ногаламіцину є активнішими проти ракових клітин у порівнянні з такими відомими хіміотерапевтичними агентами, як блеоміцин, цисплатин, мітоміцин C, доксорубіцин, водночас вони є менш токсичними по відношенню до здорових клітин. Незважаючи на клінічний успіх ногаламіцинів, їх широке застосування є обмеженим через високу вартість препаратів, пов'язану з низьким рівнем синтезу антибіотика існуючими штамми-продуцентами. Введення додаткових копій регуляторних генів, в тому числі і *relA*, може бути ефективним способом конструювання продуцентів з підвищеним рівнем синтезу антибіотиків. У тому числі широко застосовується технологія експресії цих генів за гетерологічних умов. Цей підхід є важливим для бактерій з несеквенованими або частково секвенованими геномами, для яких відсутня інформація про механізми власних окремих регуляторних генів чи компонентів регуляторних систем [40–47].

Показано, що введення *relA* в складі плазмиди pIJ8647 підвищує рівень синтезу ногаламіцину у клітинах *S. nogalater*. Очевидно, що це пояснюється взаємозв'язком між швидкістю росту бактерій і біосинтезом їх вторинних метаболітів [47, 48]. Можливо, що результатом накопичення ppGpp і є значна зміна експресії окремих регуляторних генів у *S. nogalater*, що пояснює збільшення рівня синтезу ногаламіцину.

Експресія гена *relA* у складі плазмиди pIJ6085*relA* під контролем *tipAp* промотора не впливала на рівень продукції сіоміцину, доксорубіцину та аранціаміцину штамми *S. sioyaensis*, *S. peucetius*, *S. echinatus* відповідно. Експресія *relA* відбувалася конститутивно під контролем *tipAp* промотора. Цілком можливо, що за таких умов експресія *relA* не відбувається або білок не бере участі у регуляції біосинтезу сіоміцину в цих стрептоміцетах. Подібний ефект, за якого введення додаткових копій регуляторних генів має різний вплив на біосинтез антибіотиків, описаний для багатьох актиноміцетів [48].

Таким чином, строга відповідь належить до складних фізіологічних реакцій клітини і може бути викликана зміною кількості поживних речовин у середовищі. Цей процес ініціюється недостатчею аміноацильованих tРНК молекул, що викликає RelA-залежний синтез молекул (p)ppGpp і, відповідно, зупинку росту та поділу клітини. За рахунок прямого або непрямого впливу малі сигнальні молекули здійснюють регуляцію процесів транскрипції, трансляції і реплікації, що забезпечує можливість «ви-

живання» клітини за стресових умов. Встановлено ключову роль RelA-залежної (p)ppGpp синтетази у регуляції біосинтезу низки антибіотиків актиноміцетами. Одержані результати свідчать про те, що ppGpp може бути задіяний як у позитивній, так і негативній регуляції біосинтезу вторинних метаболітів цими бактеріями. Одержання подальшої інформації щодо ролі молекул ppGpp має практичну спрямованість з огляду на біотехнологічне значення актиноміцетів, а також сприятиме встановленню взаємозв'язків між вторинним метаболізмом та морфогенезом актиноміцетів.

THE ROLE OF (p)ppGpp MOLECULES IN FORMATION OF «STRICT RESPONSE» IN BACTERIA AND BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS AND MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION IN ACTINOMYCETES

D. Klymyshyn, O. Stepanyshyn, V. Fedorenko

National Medical University of Lviv, Ukraine,  
Institute of Animal Biology, Lviv, Ukraine,  
Ivan Franko National University of L'viv, Ukraine  
E-mail: klymyshyn.d@gmail.com

Strict response is a pleiotropic physiological response of cells caused by lack of aminoacylated tRNAs. Experimentally, this response occurs due to the lack of amino acids in the environment and the limitation of tRNA aminoacylation even in the presence of the corresponding amino acids in the cell. Many features of this response indicate its dependence on the accumulation of ppGpp molecules. There is a correlation between the growth rate of actinomycetes and biosynthesis of their secondary metabolites. Introduction of additional *relA* gene copies of ppGpp synthetase can affect the production of antibiotics in streptomycetes. The article presents the authors' own experimental data, dedicated to the influence of heterologous *relA* gene expression in *Streptomyces nogalater* cells.

УЧАСТИЕ МОЛЕКУЛ (p)ppGpp В ФОРМИРОВАНИИ «СТРОГОГО ОТВЕТА» У БАКТЕРИЙ, А ТАКЖЕ БИОСИНТЕЗЕ АНТИБИОТИКОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ У АКТИНОМИЦЕТОВ

Д.А. Климишин, О.М. Стефанишин, В.А. Федоренко

Строгий ответ – это плеiotропная физиологическая реакция клетки, вызванная нехваткой аминокислот и, соответственно, остановкой синтеза белка. Экспериментально такой ответ может быть вызван как недостатком аминокислот в среде, так и ограничением способности аминокислотирования молекул тРНК даже при наличии соответствующих аминокислот в клетке. Многие черты такого ответа указывают на ее зависимость от

накопления молекул ppGpp. Существует связь между скоростью роста актиномицетов и биосинтеза ними вторичных метаболитов. В частности показано, что введение дополнительных копий гена ppGpp синтетазы *relA* может влиять на уровень продукции антибиотиков стрептомицетами. В обзоре приведены собственные экспериментальные данные авторов, посвященные исследованию влияния гетерологической экспрессии гена *relA* в клетках *Streptomyces nogalater* – продуцентов ногамицина.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Magnusson, L., Farewell, A., and Nystrom, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*, *Trends Microbiol.*, 2005, vol. 13, pp. 236–242.
2. Hara, A., and Sy, J. Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity, *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, no. 3, pp. 1678–1683.
3. Carneiro, S., Lourenco, A., Ferreira, E., and Rocha, I. Stringent response of *Escherichia coli*: revisiting the bibliome using literature mining, *Microb. Inform. Exp.*, 2011, vol. 1, no. 1, p. 14.
4. Jain, V., Kumar, M., and Chatterji, D. ppGpp: Stringent response and survival, *J. Microbiol.*, 2006, vol. 44, pp. 1–10.
5. Cashel, M., Gentry, D., Hernández, V., and Vinella, D. The stringent response, *Escherichia coli* and *Salmonella*, *Cell. Mol. Biol.*, Ed. F.C. Neidhardt, Washington, 1996, vol. 1, pp. 1458–1496.
6. Spira, B., and Yagil, E., The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 1998, vol. 257, no. 4, pp. 469–477.
7. Metzger, S., Sarubbi, E., Glaser, G., and Cashel, M. Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated, *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, no. 16, pp. 9122–9125.
8. Gentry, D.R., and Cashel, M. Mutational analysis of the *Escherichia coli spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation, *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 19, no. 6, pp. 1373–1384.
9. Mechold, U., Cashel, M., Steiner, K., Gentry, D., and Malke, H. Functional analysis of a *relA/sopT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*, *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, no. 5, pp. 1401–1411.
10. Wehmeier, L., Schafer, A., Burkovski, A., Kramer, R., Mechold, U., Malke, H., Puhler, A., and Kalinowski, J. The role of the *Corynebacterium glutamicum rel* gene in (p)ppGpp metabolism, *Microbiology*, 1998, vol. 144, pp. 1853–1862.
11. Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michels, J. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology, *Trends Microbiol.*, 2006, vol. 14, no. 1, pp. 45–54.



12. Yang, X., and Ishiguro, E. Involvement of the N terminus of ribosomal protein L11 in regulation of the RelA protein of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 22, pp. 6532–6537.
13. Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., and Glaser, G. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain, *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 2, pp. 570–579.
14. Durfee, T., Hansen, A., Zhi, H., Blattner, F., and Jin, D. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia*, *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 3, pp. 1084–1096.
15. Barker, M.M., Gaal, T., Josaitis, C.A., and Gourse, R.L. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. 1. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro, *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 305, no. 4, pp. 673–688.
16. Chang, D.E., Smalley, D.J., and Conway, T. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model, *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 45, no. 2, pp. 289–306.
17. Lagosky, P.A., and Chang, F.N. Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate basal-level synthesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 144, no. 2, pp. 499–508.
18. Rao, N.N., Liu, S., and Kornberg, A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent, *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 5, pp. 2186–2193.
19. Battesti, A., and Bouveret, E. Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the Acyl Carrier Protein-SpoT interaction, *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 2, pp. 616–624.
20. Lee, S.R. Construction of *Escherichia coli* K-12 strain deficient in *relA* and *spoT* using the  $\lambda$  red site-specific recombinase system, *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, 2012, vol. 16, pp. 90–95.
21. Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Diderichsen, B., and Karlström, O.H. Sequence of the *relB* transcription unit from *Escherichia coli* and identification of the *relB* gene, *EMBO J.*, 1985, vol. 4, no. 4, pp. 1059–1066.
22. Diderichsen, B., and Desmarez, L. Variations in phenotype of *relB* mutants of *Escherichia coli* and the effect of *pus* and *sup* mutations, *Mol. Gen. Genet.*, 1980, vol. 180, no. 2, pp. 429–437.
23. Fiil, N.P., Willumsen, B.M., Friesen, J.D., and von Meyenburg, K. Interaction of alleles of the *relA*, *relC* and *spoT* genes in *Escherichia coli*: Analysis of the interconversion of GTP, ppGpp and pppGpp, *Mol. Gen. Genet.*, 1977, vol. 150, no. 1, pp. 87–101.
24. Parker, J., Watson, R.J., Friesen, J.D., and Fiil, N.P. A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11, *Mol. Gen. Genet.*, 1976, vol. 144, pp. 111–114.
25. Gallant, J. Stringent control in *E. coli*, *Ann. Rev. Genet.*, 1979, vol. 13, pp. 393–415.
26. Gong, L., Takayama, K., and Kjelleberg, S. Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria, *Microbiology*, 2002, vol. 148, pp. 559–570.
27. Srivatsan, A., and Wang, J.D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2008, vol. 11, no. 2, pp. 100–105.
28. Chatterji, D., Ogawa, Y., Shimada, T., and Ishihama, A. The role of the omegasubunit of RNA polymerase in expression of the *relA* gene in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, vol. 267, no. 1, pp. 51–55.
29. Roberts, J.W. Promoter-specific control of *E. coli* RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor, *Genes Dev.*, 2009, vol. 23, no. 2, pp. 143–146.
30. Sun, J., Hesketh, A., and Bibb, M. Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 11, pp. 3488–3498.
31. Saito, N., Xu, J., Hosaka, T., Okamoto, S., Aoki, H., Bibb, M., and Ochi, K. EshA accentuates ppGpp Accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 13, pp. 4952–4961.
32. Chakraborty, R., White, J., Takano, E., and Bibb, M. Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 19, no. 2, pp. 357–368.
33. Chakraborty, R., and 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, vol. 179, no. 18, pp. 5854–5861.
34. Hesketh, A., Chen, J.W., Ryding, J., Chang, S., and Bibb, M. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Genome Biol.*, 2007, vol. 8, no. 8, R161.
35. Gatewood, M.L., and 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, vol. 192, no. 17, pp. 4275–4280.
36. Hoyt, S., and Jones, G.H. *relA* is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*, *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, no. 12, pp. 3824–3829.
37. Gomez-Escribano, J.P., Martin, J.F., Hesketh, A., Bibb, M.J., and Liras, P. *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary me-

- tabolism by (p)ppGpp, *Microbiology*, 2008, vol. 154, pp. 744–755.
38. Jin, W., Ryu, Y., Kang, S., Kim, S., Saito, N., Ochi, K., Lee, S., and Lee, K. Two *relA/spoT* homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, 2004, vol. 150, pp. 1485–1493.
  39. Ochi K. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: Significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to a factor, *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, no. 8, pp. 3608–3616.
  40. Klymyshyn, D., Gren, T., and Fedorenko, V. Role of *snorA* gene in *Streptomyces nogalater* Lv65 biosynthesis, *Microbiology*, 2011, vol. 80, no. 4, pp. 496–501.
  41. Klymyshyn, D., Nimets, O., Stefanyshyn, O., and Fedorenko V. Heterologous expression of the *IndYR* and *wblA<sub>gh</sub>* genes in *Streptomyces nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730, and *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (producers of anthracycline antibiotics), *Cytol. Genet.*, 2013, vol. 47, no. 4, pp. 197–201.
  42. Klimishin, D., Rabyk, M., Gren, T., Nimets, O., and Fedorenko V. Construction of *Streptomyces nogalater* Lv65 strains with enhanced nogalamycin biosynthesis using regulatory genes, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2011, vol. 47, no. 6, pp. 594–598.
  43. Klimishin, D., Rabyk, M., and Fedorenko, V. Methylation of nogalose during nogalomycin biosynthesis by *Streptomyces nogalater* Lv65, *Microbiology*, 2013, vol. 82, no. 2, pp. 162–168.
  44. Klymyshyn, D.O., Gromyko, O.M., Fedorenko, V.O. Application of intergeneric conjugation of *Escherichia coli* — *Streptomyces* for transfer of recombinant DNA into the strain *S. nogalater* IMET43360, *Cytol. Genet.*, 2007, vol. 41, no. 5, pp. 263–267.
  45. Klymyshin, D., Stefanyshyn, O., and Fedorenko, V. Role of genes *snoaM*, *snoaL*, and *snoaE* in the biosynthesis of nogalamycin in *Streptomyces nogalater* Lv65, *Cytol. Genet.*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 152–157.
  46. Klymyshyn, D., Gren, T., Fedorenko, V. Cloning and investigation of *snorA* gene, a putative positive regulator of nogalamycin biosynthesis in *Streptomyces nogalater*, *Visn. Lviv. univ. Ser. biol.*, 2009, vol. 50, pp. 3–10.
  47. Klymyshin, D., Gromyko, O., Gren, T., Nymets, O., Honchar, M., Fedorenko, V. Chemistry and biology of nogalamycins, *Visn. Lviv univ. Ser. biol.*, 2010, vol. 54., pp. 15–26
  48. Gren, T., Ostash, B., Hrubskyy, Y., Lopatniuk, M., and Fedorenko, V. Influence of pleiotropic regulatory genes *absB*, *relA*, *afsS* on siomycin production by *Stroptomyces siوياensis* Lv81, *Visn. Lviv univ. Ser. biol.*, 2011, vol. 57, pp. 30–37.

Надійшла 13.11.14