

О. ЦИПІК¹, Б. ОСТАШ¹, Ю. РЕБЕЦЬ²,
В. ФЕДОРЕНКО¹

¹ Львівський національний університет ім. Івана Франка

E-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

² Гарвардська медична школа, США

ХАРАКТЕРИСТИКА ДІЛЯНКИ *Ind*-КЛАСТЕРА *STREPTOMYCES* *GLOBISPORUS* 1912, ЩО МІСТИТЬ ГЕНИ *IndY*, *IndYR*, *IndW2* ТА *IndW*



Ділянка кластера генів біосинтезу ландоміцину *E* (*Ind*-кластера) *S. globisporus* 1912, що фланкує структурні гени *IndZ4-Z6*, містить чотири відкриті рамки зчитування – *IndW*, *IndW2*, *IndYR* і *IndY*. Ген *IndY* кодує імовірну *Ser/Thr* протеїнкіназу, котра, як передбачалося, разом з репресором *LndYR* може контролювати продукцію ландоміцинів і морфогенез у *S. globisporus* 1912. Однак результати виконаних експериментів свідчать, що за лабораторних умов ген *IndY* не задіяний у цих процесах. З використанням транскрипційного злиття промотора *LndWp* із репортерним геном катехолдіоксигенази *ху1E* вивчено характер взаємодії промотора *LndWp* з репресором *LndYR* у часі та опрацьовано систему скринінгу лігандів *LndYR* *in vivo*.

© О. ЦИПІК, Б. ОСТАШ, Ю. РЕБЕЦЬ, В. ФЕДОРЕНКО,
2013

Вступ. Штам *S. globisporus* 1912 продукує ангуциклічний антибіотик ландоміцин *E*, який виявляє активність проти низки ракових клітин та пригнічує ріст антрациклін-резистентних пухлин, що є його унікальною властивістю [1]. Ландоміцин *E* активніший проти ракових клітин порівняно з такими відомими хімотерапевтичними агентами, як блеоміцин, цисплатин, мітоміцин *C*, доксорубіцин [2]. Виявлення генетичних механізмів, що регулюють продукцію ландоміцину *E*, є важливим завданням, вирішення якого дасть змогу розробити методи раціонального конструювання надпродуцентів ландоміцинів і антибіотиків загалом.

Біосинтез ландоміцину *E* у *S. globisporus* 1912 контролюється кластером з 32 генів (*Ind*-кластером). У ньому ідентифіковано чотири регуляторних гени – *IndI*, *prx*, *IndY* та *IndYR*. Два перші розміщені на 5'-фланзі *Ind*-кластера. Ген *IndI* кодує шлях-специфічний регулятор родини SARP, а *prx* – ймовірну протеїназу/ендопептидазу [3, 4]. Натомість гени *IndY* і *IndYR* виявлено на 3'-фланзі *Ind*-кластера. Ген *IndY* межує з геном фосфопатетейнтрансферази *IndZ6*. Між ним виявлено ділянку розміром 600 п.н., що містить, імовірно всього, промотор гена *IndY* (рис. 1). Продукт гена *IndY* виявляє гомологію до низки відомих протеїнкіназ *S. coelicolor*. Разом з тим *IndY* межує з геном *IndYR*, що кодує регуляторний білок родини GntR. ДНК-зв'язувальна активність білків цієї родини модулюється при взаємодії з ефекторними молекулами (лігандами) аналогічно до TetR-подібних білків [5]. Наші попередні дослідження показали, що *LndYR* задіяний у процесах біосинтезу ландоміцину *E* і споруляції [6]. З огляду на фізичне зчеплення *IndY* і *IndYR* можна припустити, що їхні продукти утворюють двокомпонентну систему сигнальної трансдукції, де *LndY* фосфорилує *LndYR* і у такий спосіб модулює його активність. Подібні двокомпонентні регулятори виявлено у стрептоміцетів. Типовим прикладом є система AbsA1-AbsA2, яка локалізована у межах кластера генів біосинтезу кальцій-залежного антибіотика *S. coelicolor* [7]. У нашому випадку першим об'єктом регуляторної дії *LndYR* є гени ABC-транспортерів *LndW* і *LndW2*, що розміщені поруч із *IndYR* [6]. Наші попередні дослідження засвідчили участь цих генів у

наданні стійкості до ландоміцину E за умов гетерологічної експресії [8].

Таким чином, ділянка *Ind*-кластера, що містить гени *IndY*, *IndYR*, *IndW2* і *IndW*, може бути задіяна у регуляції продукції ландоміцинів, зокрема на етапі їхнього транспортування. Однак роль гена *IndY* і ліганди білка *IndYR* залишались невідомими. Невідомо було й те, як у часі експресуються гени *IndW* і *IndYR*, що має важливе значення, особливо для пошуку імовірних лігандів білка *IndYR*. Тому мета цієї роботи полягала у дослідженні ролі гена *IndY* і вивченні часового характеру експресії генів *IndW* і *IndYR* методом транскрипційного злиття із репортерним геном катехолдиоксигенази *xylE*.

Матеріали та методи. У роботі використано штам-продуцент ландоміцину E дикого типу *S. globisporus* 1912, а також штами *Escherichia coli* – DH5 α та ET12567 (pUB307) [6, 7]. *S. globisporus* 1912 та його похідні вирощували на вісяному середовищі, агарі Чапека, мінімальному середовищі Хопвуда (MC) та в рідких середовищах SG, R5A при температурі 28 °C [4, 7, 9]. Штами *E. coli* вирощували при температурі 37 °C у середовищі LB [7]. Плазмідні вектори, що використані або сконструйовані у цій роботі, наведено у таблиці.

Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК, трансформацію *E. coli* виконували згідно зі стандартними методиками [7].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили, як описано у [2], з використанням ПЛР-робота MiniCycler («MJ Research», США). Міжродову кон'югацію *E. coli* – *S. globisporus* здійснювали за модифікованою методикою Мазодієра [2, 9, 10]. Ландоміцини екстрагували та аналізували згідно з описаними методиками [1, 8]. Активність катехолдиоксигенази на 2–6-й день вирощування в чашках визначали, як описано в [7].

Результати досліджень та їх обговорення. *Надекспресія та спрямоване руйнування гена IndY у S. globisporus 1912.* Імовірний продукт трансляції гена *IndY* (690 амінокислотних залишків) подібний (30–40 %) до кількох відомих протеїніназ *S. coelicolor* M145 – SCO3621, SCO4487 (PkaG) та SCO4507, і містить характерні консервативні N-термінальні мотиви [6]. Щоб з'ясувати, чи задіяний продукт гена *IndY* у регуляції біосинтезу ландоміцину E, його функцію досліджено за допомогою генної надекспресії та заміщення в хромосомі на інактивованій алелі *IndY::aadA*. Для надекспресії створено плазмід рКСОВУ, яка містить *IndY* під контролем конститутивного сильного промотора гена стійкості до еритроміцину *ermEp Saccharopolyspora erythraea* [7]. Фрагмент ДНК розміром 3 т.п.н., що містить алель *IndY* дикого типу, виділено з плазмід рКС35 як *XbaI-EcoRI*-рестрикт та клоновано у вектор експресії рКС1218Е у відповідні сайти, що привело до утворення плазмід рКСОВУ.

Плазмід рКСОВУ перенесено у *S. globisporus* 1912 за допомогою міжродової кон'югації з

Вектори і плазмідні, використані в роботі

Назва	Характеристика	Посилання
pSET152	<i>int^φC31-attP aac(3)IV (Am^r) lacZ or^pUC19</i>	[7]
pKC1139	<i>or^pSG5 (ts) aac(3)IV (Am^r) lacZ or^pUC19</i>	[7]
pKC1218E	<i>or^pSCP2 aac(3)IV (Am^r) lacZ::ermEp or^pUC19</i>	[7]
pGX1	pUC19, що містить ген <i>xylE</i>	[10]
pKC35	pKC1139, що містить фрагмент <i>Ind</i> -кластера розміром 3,5 т.п.н. з геном <i>IndY</i>	[5]
pКСОВУ	pKC1218E, що містить <i>BamHI-EcoRI</i> фрагмент <i>Ind</i> -кластера розміром 3 т.п.н. з геном <i>IndY</i> під контролем <i>ermEp</i>	Ця робота
pKC35aadA	pKC35, в унікальний <i>XcmI</i> -сайт якої у межах гена <i>IndY</i> клоновано ген стійкості до спектиноміцину <i>aadA</i>	Ця робота
pSETW _{xylE}	pSET152, в яку клоновано транскрипційне злиття <i>IndWp-xylE</i>	Ця робота

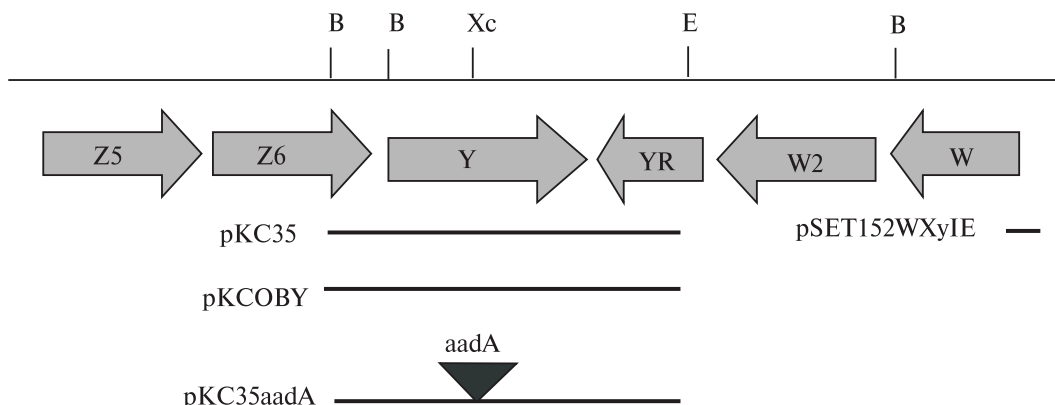


Рис. 1. Фрагмент *Ind*-кластера *S. globisporus* 1912; ген *IndY* – кодує серин/треонінову протеїнкіназу, *IndYR* – транскрипційний регулятор родини GntR, *IndW2* – трансмембранна субодиниця ABC-транспортерів, *IndW* – АТФаза субодиниця ABC-транспортерів; В – BamHI, E – EcoRI, Xc – XcmI

E. coli. Колонії отриманих рКCOBY⁺-транскон'югантів не відрізнялися від штаму *S. globisporus* дикого типу за морфологією та рівнем споруляції. Не змінювалася й динаміка росту рКCOBY⁺-штамів за умов глибинного культивування. Отже, надекспресія *IndY* не впливає на морфологічний розвиток *S. globisporus*. Ми порівняли спектри стійкості *S. globisporus* 1912 та рКCOBY⁺-транскон'югантів до низки антибіотиків – канаміцину, неомицину, стрептоміцину, гігроміцину, цефалотину, пеніциліну, еритроміцину, олеандоміцину, тетрацикліну та рифампіцину, проте відмінностей між ними не виявили. Надекспресія *IndY* не впливала також і на рівень синтезу ландоміцину E в рідкому середовищі SG та на агаризованому вівсяному середовищі.

Спрямоване руйнування *IndY* здійснювали шляхом інсерції в його кодуючу послідовність гена аміноглікозид-аденілілтрансферази *aadA*, що надає стійкості до спектиноміцину [7]. Кодуюча послідовність гена *IndY* містить унікальний сайт впізнавання для ендонуклеази рестрикції XcmI, який використали для інсерції гена *aadA*. У результаті отримали плазмиду рКC35aadA, що містить мутантний алель *IndY::aadA* (рис. 1).

Транскон'юганти *S. globisporus* рКC35aadA⁺ відбирали на середовищі зі спектиноміцином при 30 °С. За цих умов плазмиду реплікується і підтримується у клітинах стрептоміцетів як автономний генетичний елемент. Штам рКC35aadA⁺ для одержання мутантів *S. glo-*

bisporus 1912 зі зруйнованим геном *IndY::aadA* виростили в рідкому середовищі TSB протягом трьох діб за температури 39 °С, при якій термочутливий реплікон рSG5 не функціонує [7]. Після інкубації за цих умов клітини висівали на середовище зі спектиноміцином. У результаті вдалось отримати близько 150 спектиноміцин-стійких клонів, що водночас виявились стійкими і до апраміцину. Це свідчить про проходження первинного кросинговеру, внаслідок якого вся плазмиду інтегрується у хромосому за рахунок гомологічної рекомбінації. Для отримання вторинного кросинговеру один з клонів пересіяли за неселективних умов тричі. Рідку культуру після трьох пасажів посіяли у розведеннях на вівсяне середовище. Після аналізу 300 клонів, що виростили на чашках, виявлено один клон, стійкий до спектиноміцину та чутливий до апраміцину, що імовірно виник внаслідок втрати послідовностей вектора. Факт заміщення гена *IndY* на мутантний алель *IndY::aadA* доведено за допомогою ПЛР з праймерами (*IndY*_{up}: AATTCGTGGCCGTGGCCGTGGC; *IndY*_{rp} TTCCCCTGTGGCCGCGACGCGC) до кінців гена *IndY*. З геному штаму дикого типу 1912 отримали амплікон розміром 2 т.п.н., а з геному *IndY*-мутанта – 4 т.п.н., який є результатом інсерції касети стійкості *aadA* розміром 2 т.п.н. в кодуючу послідовність *IndY*. Використавши такі самі підходи, як і під час аналізу надекспресії *IndY*, встановили, що мутант не відрізняється

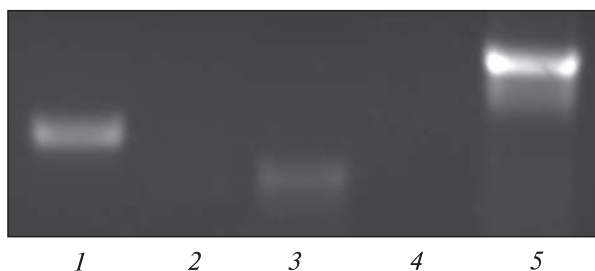


Рис. 2. Результати напівкількісного ЗТ-ПЛР-аналізу експресії вибраних *lnd*-генів в *S. globisporus* 1912: 1 – *lndJ*; 2 – *lndY*; 3 – *lndYR*; 4 – *lndW*; 5 – контроль 16S рРНК (*rrnA*)

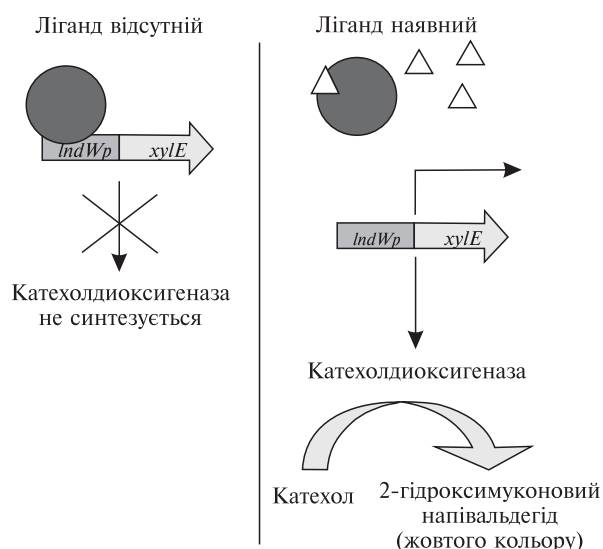


Рис. 3. Схема функціонування *xylE*-репортерної системи: ● – транскрипційний регулятор *LndYR*, △ – ліганд *LndYR*, ◐ – *LndYR*, інактивований лігандом

від штаму дикого типу за стійкістю до антибіотиків, споруляцією і рівнем біосинтезу ландоміцину E. Отже, протеїнкіназа *LndY* не задіяна в регуляції синтезу ландоміцину E та споруляції *S. globisporus* 1912. Можливо, *lndY* є мовчазним геном і не експресується за лабораторних умов або контролює інші ознаки *S. globisporus* 1912, що не досліджувалися у цій роботі. Щоб перевірити, чи відбувається експресія *lndY* в *S. globisporus*, використали метод ЗТ-ПЛР і праймери, які описано нами раніше [6]. Не виявили транскрипта *lndY* за умов вирощування *S. globisporus* у повноцінному середовищі R5A (рис. 2), на якому

спостерігається високий рівень продукції ландоміцинів [6]. Цей результат узгоджується з припущенням про те, що ген *lndY* не експресується за лабораторних умов вирощування *S. globisporus*. Можна також зробити висновок, що *lndY* не є елементом двоконпонентної системи трансдукції за умов, за яких інші *lnd*-гени активно експресуються [6]. На сьогодні описано відсутність експресії регуляторних генів, що кодують репресори біосинтезу антибіотиків в актиноміцетів, за умов інтенсивного синтезу антибіотика. Це, очевидно, потрібно для того, щоб розпочалась експресія активаторних генів і відтак – структурних генів біосинтезу антибіотика [11], однак нокаут таких генів зазвичай приводить до змін у синтезі антибіотика. У нашому випадку нокаут *lndY* не впливав на синтез ландоміцинів. Залишається незрозумілим, які фактори необхідні для ініціації експресії промотора гена *lndY*. У будь-якому випадку наша робота є свідченням, що рівень експресії регуляторних генів біосинтезу антибіотика у межах генних кластерів може значно відрізнитися.

Транскрипційне злиття промотора гена lndW та репортерного гена xylE. Результати попередніх досліджень свідчать, що *LndYR* пригнічує експресію генів ABC-транспортерів *lndW/W2*, зв'язуючись з промотором гена *lndW* [6], однак характер експресії *lndW* і *lndYR* у часі в клітинах *S. globisporus* не вивчено. Як вже зазначено, регулятори родини *GntR* – це репресори, активність яких модулюється при взаємодії з лігандами [12]. Нині вже описано низку лігандів для деяких *GntR*-подібних білків, більшість з яких – дисахариди або їхні похідні [5]. Ліганд, що взаємодіє з *LndYR* – невідомий. Для вивчення характеру експресії генів *lndW* і *lndYR* у часі та виявлення ліганду *LndYR* сконструювано плазмиду, в якій репортерний ген *xylE* знаходиться під промотором *lndWp* гена *lndW*. Ген *xylE* кодує катехолдіоксигеназу, яка розщеплює безбарвний катехол до забарвленого у жовтий колір 2-гідроксимуконічного напівальдегіду [7]. Ділянку *lnd*-кластера, що містить *lndWp*, ампліфіковано за допомогою праймерів *lndWp*-*HindIII*-up AAAAATTAGACGTTCCGGGTG-*ACTGCC*) та *lndWp*-*XbaI*-rp (AAATCTAGA-

GTGTCTGCCACGCGCCTCAC). Очищений продукт ПЛР клонували у плазмиду рGX1 перед кодуючою послідовністю гена *xylE*, використавши сайти дії ендонуклеаз рестрикції HindIII і XbaI. Далі фрагмент *lndWp-xylE* розміром 1,7 т.п.н. клонували у вектор рSET152, який інтегрується в хромосому стрептоміцетів у *attB*-сайт актинофага фС31 [7]. Будову плазмиди рSET152WXylE підтверджено за допомогою секвенування.

Згідно з нашою вихідною гіпотезою репресія транскрипції генів регуляторами GntR триває доти, доки концентрація ліганду LndYR не перевищує певного порогового рівня. Після перевищення цього рівня ліганд ефективно взаємодіє з репресором, пригнічуючи його здатність зв'язувати ДНК [5, 12]. LndYR репресує *lndW* за рахунок взаємодії з промотором *lndW* (*lndWp*). Це можна виявити за відсутністю експресії репортерного гена, тому що зміна забарвлення колоній при додаванні хромогенного субстрату катехолдиоксигенази не відбувається (рис. 3). Перша часова точка, коли з'являється забарвлення навколо колоній репортерного штаму, і буде тією точкою, коли в клітині накопичилась достатня кількість молекул ліганду, щоб ефективно дерепресувати *lndWp*. Тому на першому етапі досліджень ми вирішили визначити час, коли відбувається достатнє накопичення ліганду LndYR. У цих дослідках *S. globisporus* вирощували на середовищах Чапека і МС, оскільки вони забезпечують інтенсивний ріст, не містять вуглеводів, які можуть бути ймовірними лігандами LndYR, та є безколірними. Штами WXylE⁺ та 1912 (контроль) вирощували протягом п'яти діб. Забарвлення навколо колоній не з'являлось раніше четвертої доби. Отже, лише на четверту добу в клітині з'являється певна речовина, що здатна взаємодіяти із LndYR, звільняючи у такий спосіб промотор *lndWp*. Ці дані підтверджують попереднє припущення про те, що LndYR не зв'язується безпосередньо з промоторами структурних *lnd*-генів, оскільки пік експресії *lnd*-генів припадає на третю добу [4, 6], і, очевидно, вони не можуть підлягати репресорній дії LndYR.

Створену репортерну систему можна використати для ідентифікації ліганду LndYR.

Для опрацювання цього підходу ми вирощували штами 1912 та WXylE протягом трьох діб. На цей момент експресія *lndWp-xylE* практично повністю заблокована, і тільки зовнішнє внесення ліганду може активувати репортерний ген. Як тестерні молекули використано найбільш важливі та розповсюджені моно- та дисахариди, а саме глюкозу, N-ацетилглюкозамін, лактозу та мальтозу. Оскільки *S. globisporus* 1912 є продуцентом ландоміцину Е, не виключено, що сама молекула антибіотику може взаємодіяти з регулятором LndYR. Це стосується і деяких інших представників родини регуляторів [5, 12], тому ми дослідили ландоміцин Е як потенційний ліганд LndYR. В усіх випадках ми не спостерігали зміни забарвлення середовища. Це свідчить про те, що жодна з апробованих молекул не виступає ефектором LndYR. Отже ліганд LndYR відрізняється від описаних на сьогодні лігандів для інших білків надродини GntR у бактерій. Далі планується проаналізувати широкі коло сполук як імовірних лігандів LndYR.

Висновки. Встановлено, що ген *lndY* не впливає на споруючість і продукцію ландоміцинів штамом *S. globisporus*, оскільки цей ген не експресується за умов вирощування, які оптимальні для експресії решти *lnd*-генів. Вивчено часовий характер взаємодії промотора *lndWp* з репресором LndYR. За допомогою репортерної системи показано, що лише на четверту добу у клітинах *S. globisporus* накопичується сполука, що взаємодіє з цим репресором.

O. Tsypik, B. Ostash, Y. Rebets, V. Fedorenko

CHARACTERIZATION OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 *lnd*-CLUSTER REGION CONTAINING *lndY*, *lndYR*, *lndW2* AND *lndW* GENES

Streptomyces globisporus 1912 *lnd*-cluster region which flanks structural *lndZ5-lndZ6* genes contains four open reading frames *lndW*, *lndW2*, *lndYR* and *lndY*. The latter one encodes putative proteinase which can regulate landomycin production and morphogenesis like LndYR. However, results of *lndY* overexpression and gene knockout showed that *lndY* did not participate in regulation of landomycin production and morphogenesis of *Streptomyces globisporus* 1912. Using transcriptional fusion of promoter *lndWp* to catechol dioxygenase reporter gene *xylE* the temporal character of interaction of promoter *lndWp* and repressor LndYR was studied.

О. Цыпик, Б. Остап, Ю. Ребець, В. Федоренко

ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТКА *Ind*-КЛАСТЕРА
STREPTOMYCES GLOBISPORUS 1912,
СОДЕРЖАЩЕГО ГЕНЫ *IndY*, *IndYR*,
IndW2 И *IndW*

Участок кластера генов биосинтеза ландомицина (*Ind*-кластера) *Streptomyces globisporus* 1912, фланкирующий структурные гены *IndZ4-Z6*, содержит четыре открытые рамки считывания – *IndW*, *IndW2*, *IndYR* и *IndY*. Ген *IndY* кодирует вероятную Ser/Thr протеинкиназу, которая, как предполагалось, вместе с репрессором *IndYR* может контролировать продукцию ландомицинов и морфогенез у *S. globisporus* 1912. Однако результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что в лабораторных условиях ген *IndY* не участвует в этих процессах. При помощи транскрипционного слияния промотора *IndWp* гена ABC-транспортера *IndW* с репортерным геном катехолдиоксигеназы *xylE* изучен временной характер взаимодействия этого промотора с *IndYR* и разработана система скрининга лигандов *IndYR in vivo*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Rebets Yu., Ostash B., Fukuhara M., Nakamura T., Fedorenko V.* Expression of the regulatory protein *IndI* for landomycin E production in *S. globisporus* 1912 is controlled by the availability of tRNA for the rare UUA codon // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – **256**. – P. 30–37.
2. *Федоренко В.О., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В.* Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів, 2007. – 279 с.
3. *Dutko L., Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A., Bechtold A., Nakamura T., Fedorenko V.* A putative proteinase gene is involved in regulation of landomycin E biosynthesis in *Streptomyces globisporus* 1912 // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – **255**. – P. 280–285.
4. *Rebets Y., Ostash B., Luzhetskyy A. et al.* DNA-binding activity of *IndI* protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 // Microbiology. – 2005. – **151**. – P. 281–290.
5. *Hoskisson P.A., Rigali S.* Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily // Adv. Appl. Microbiol. – 2009. – **69**. – P. 1–22.
6. *Ostash B., Rebets Y., Myronovskyy M. et al.* Identification and characterization of *Streptomyces globisporus* 1912 regulatory gene *IndYR* that affects sporulation and antibiotic production // Microbiology. – 2011. – **157**, № 4. – P. 1241–1250.
7. *Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A.* Practical Streptomyces genetics. – Norwich : John Innes Found, 2000. – 634 p.
8. *Ostash I., Ostash B., Kobylanskyy A., Myronovskyy M., Nakamura T., Walker S., Fedorenko V.* An ABC transporter encoding gene *IndW* confers resistance to landomycin E // Arch. Microbiol. – 2008. – **190**. – P. 105–109.
9. *Flett F., Mersinias V., Smith C.P.* High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl-DNA-restricting *Streptomyces* // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – **155**. – P. 223–229.
10. *Lushetskyy A., Ostash B., Fedorenko V.* Intergeneric conjugation *Escherichia coli* – *Streptomyces globisporus* 1912 using integrative plasmid *pSET152* and derivatives // Rus. J. Genet. – 2001 – **37**. – P. 1123–1130.
11. *Stratigopoulos G., Cundliffe E.* Expression analysis of the tylosin-biosynthetic gene cluster: pivotal regulatory role of the *tylQ* product // Chem. Biol. – 2002. – **9**, № 1. – P. 71–78.
12. *Rigalli S., Derouaux A., Giannotta F., Dusart J.* Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR and YtrA subfamilies // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**. – P. 12507–12515.

Надійшла 17.12.11