

УДК 575.224+577.21

Д.О. КЛИМИШИН^{1,2,3}, О.Я. НИМЕЦЬ¹, О.М. СТЕФАНИШИН², В.О. ФЕДОРЕНКО¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка

² Інститут біології тварин НААН України, Львів

³ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

E-mail: dedima@rambler.ru

ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *IndYR* ТА *wbIA_{gh}* У ПРОДУЦЕНТАХ АНТРАЦИКЛІНОВИХ АНТИБІОТИКІВ *STREPTOMYCES NOGALATER* Lv65, *S. ECHINATUS* DSM40730 ТА *S. PEUCETIUS* SUBSP. *CAESIUS* ATCC27952

Штами актиноміцетів *Streptomyces nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 є продуцентами антрациклінових антибіотиків ногаламіцину, аранціаміцину та доксорубіцину відповідно. У роботі вивчено вплив експресії плейотропних регуляторних генів *IndYR* і *wbIA_{gh}* на вторинний метаболізм та морфогенез цих бактерій. У досліджуваних стрептоміцетах введення регуляторів в складі реплікативних плазмід призводить до зниження синтезу антрациклінів, а експресія *IndYR* у клітинах *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 пригнічує спорудження продуцента доксорубіцину, що свідчить про наявність їхніх гомологів у геномах. Ідентифікація цих генів з метою подальшої спрямованої інактивзації може бути успішним інструментом для одержання штамів з підвищеним рівнем синтезу клінічно важливих сполук, а також дозволить встановити окремі етапи регуляції вторинного метаболізму антрациклінових антибіотиків.

Ключові слова: антрациклінові антибіотики, біосинтез, вторинний метаболізм, регуляторні гени.

Вступ. Вивчення ключових механізмів регуляції синтезу антибіотиків є однією з центральних проблем генетики та біотехнології актиноміцетів. Дані біоінформативного аналізу геномів актиноміцетів свідчать про існування великої кількості генів, що забезпечують регуляцію вторинного метаболізму цих бактерій

[1–3]. Однак детальні функції більшості регуляторних генів не вивчено. Ця проблема особливо актуальна для видів актиноміцетів – продуцентів клінічно важливих антибіотиків, геноми яких ще не секвеновано. Відсутність цієї інформації не дає змоги у повній мірі вивчати регуляторні елементи та відповідні білкові продукти, що ускладнює їхнє застосування для конструювання штамів-надпродуцентів. Експресія добре вивчених регуляторів вторинного метаболізму актиноміцетів за гетерологічних умов може використовуватись для подолання цих ускладнень. Ефективність такого підходу продемонстровано для низки штамів актиноміцетів [1, 4, 5].

Кластери генів біосинтезу антрациклінових антибіотиків ногаламіцину, аранціаміцину та доксорубіцину (рис. 1) клоновано з геномів *S. nogalater*, *S. echinatus* і *S. peucetius* та секвеновано [8, 9, 10–12]. Вивчено окремі аспекти регуляції вторинного метаболізму цих бактерій [4, 12, 13], зокрема клоновано та досліджено роль шлях-специфічних регуляторів: *snorA* у контролі біосинтезу ногаламіцину та *dnrI* – доксорубіцину. Нокаут цих генів пригнічує, а надекспресія – підвищує рівень продукції відповідних антибіотиків, що свідчить про їхню позитивну участь в регуляції [13]. Однак роль плейотропних регуляторних генів та можливість їхнього використання для отримання шта-

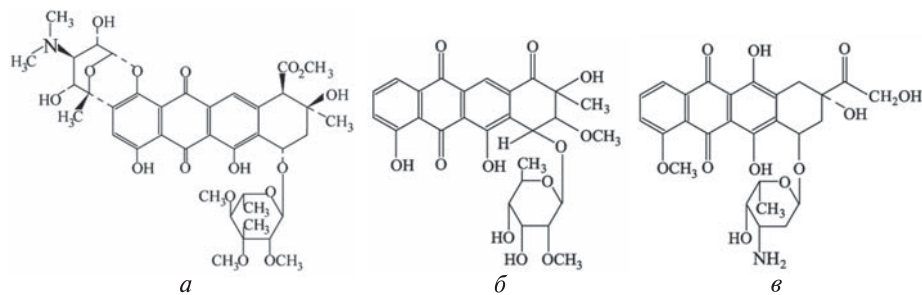


Рис. 1. Структурні формули ногаламіцину (а), аранціаміцину (б) та доксорубіцину (в)

мів з підвищеним рівнем синтезу цих сполук вивчено недостатньо. Особливий інтерес становить гетерологічна експресія генів, що представляють різні родини білкових регуляторів. Результати цих досліджень дають змогу не лише зрозуміти основні закономірності генетичного контролю синтезу антибіотиків, а й отримати штами із зміненим рівнем їхнього біосинтезу.

Серед виявлених в актиноміцетів транскрипційних регуляторів однією із найбільших є GntR-родина. З хромосоми продуцента ландоміцину E *S. globisporus* 1912 клоновано ген *IndYR*, що кодує GntR-подібний регулятор субродини YtrA. Спрямована інактивація цього гена пригнічувала споруляцію та продукцію ландоміцину E у *S. globisporus*. Як показали результати досліджень *in vivo* та *in vitro*, *IndYR* репресує гени, що кодують систему АВС-транспортерів *IndW-IndW2*. Надекспресія *IndYR* у штамів *S. ghanaensis* ATCC14672 і *S. sioyaensis* NRRL-B5408 істотно впливала на вторинний метаболізм та морфологічні характеристики бактерій [6].

Плейотропний регуляторний ген *wblA_{gh}*, що кодує гомолог WhiB-родини, клоновано з геному продуцента моюноміцину *S. ghanaensis*. Спрямована інактивація цього гена блокувала споруляцію та підвищувала синтез антибіотиків, в той час як надекспресія знижувала продукцію моюноміцинів на 50 % [7].

Аналіз секвендованих геномів актиноміцетів свідчить про велику кількість гомологів генів *IndYR* та *wblA_{gh}*. Очевидно, що білкові продукти вказаних генів відіграють важливу роль у вторинному метаболізмі бактерій. Однак роль цих регуляторів у генетичному контролі антрациклінових антибіотиків досі не встановлено. Метою роботи було дослідження впливу гетеро-

логічної експресії генів *IndYR S. globisporus* 1912 та *wblA_{gh} S. ghanaensis* на синтез ногаламіцину у *S. nogalater*, аранціаміцину у *S. echinatus* та доксорубіцину у *S. peucetius*.

Матеріали і методи. Штами бактерій та умови культивування. У роботі використовували штами дикого типу *S. nogalater* Lv65 (продуцент ногаламіцину), *S. echinatus* DSM40730 (продуцент аранціаміцину), *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (продуцент доксорубіцину), а також штами *Escherichia coli*: DH5α (F⁺ϕ80d Δ(*lacZ*)M15 *recA1 endA1gyrA96thi1deoR (lacZYA-argF) U169*), ET12567 (*dam-13::Tn9(Cm^r) dcm-6 hsdM*), що мали кон'югативну плазмиду pUB307 (похідну плазмиди RK2). Усі використані у роботі плазмиди містили ген стійкості до апраміцину (*Apm^r*). Штами стрептоміцетів, а також *E. coli* та *Sarcina lutea* зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка. Культури актиноміцетів вирощували за температури 28 °С, штами *E. coli*, *S. lutea* та *B. subtilis* – за 37 °С. Для продукування антрациклінів штамами *S. nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 і *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 суспензію клітин у титрі (3,5–4,4)·10⁷ інокулювали в 50 мл середовища TSB [14] та інкубували 24 год, потім 24-годинну культуру інокулювали в основне середовище (SG [14]; 4 % від об'єму основної культури) і вирощували 96 год.

Трансформацію *E. coli* проводили згідно зі стандартною «кальцієвою» методикою [15], кон'югацію *E. coli* – *S. nogalater* здійснювали як описано раніше [16].

Визначення резистентності штамів до антибіотиків. Спектр стійкості до антибіотиків визначали методом дифузії в агар із викорис-

танням дисків з антибіотиками. Диски накладали на верхній шар 0,7%-го агару MC та BC із спорами культур. Виміри діаметрів зон пригнічення росту штамів антибіотиком, що дифундував з дисків, проводили на третю та шосту доби інкубації.

Визначення антибіотичної активності штамів *S. nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952. Експрес-аналіз антибіотичної активності перелічених штамів здійснювали за допомогою визначення індексу продуктивності [13]. Штами актиноміцетів вирощували в середовищі SG і екстрагували антибіотики з культуральної рідини хлороформом (1:1). Екстракти висушували за 37 °С, сухий залишок розчиняли у метанолі та накладали на чашки з 0,7%-м агаром, що містив клітини *Sarcina lutea* (10⁹ к.у.о.). Чашки інкубували за температурою 28 °С впродовж 12 і 72 год.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) ноґаламіцину, аранціаміцину та доксорубіцину. Ноґаламіцин екстрагували з культуральної рідини рівним об'ємом хлороформу, випаровували до сухого стану у вакуумі та розчиняли у метанолі. ТШХ ноґаламіцину проводили у системі розчинників хлороформ : метанол : етанол : дистильована вода (120:25:6:4,5), аранціаміцину – хлороформ : метанол (9:1), доксорубіцину – згідно з [17] (довжина фронту хроматографічних пластинок – 15 см). За наведених умов визначали R_f окремих сполук. Антибіотики виявляли візуально та за допомогою опромінення хроматографічних пластинок ультрафіолетовими променями.

Виділення сумарної та плазмідної ДНК з клітин актиноміцетів здійснювали за методом [15]. Препаративне виділення плазмідної ДНК з актиноміцетів проводили за допомогою лужного лізису [14], а також модифікованим безфенольним методом, в якому ДНК від білків очищували висолуванням ацетатом натрію [14]. Виділення плазмідної ДНК з *E. coli* проводили як вказано у [14].

Ферментативна обробка ДНК. Рестрикційний аналіз сумарної та плазмідної ДНК здійснювали за умов, рекомендованих фірмою – виробником ферментів, лігування ДНК – у стандартному буфері з використанням ДНК-лігази фаґа Т4 описаним методом [15].

Комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей ДНК. Первинний аналіз нуклеотидних послідовностей та визначення сайтів впізнання для ендонуклеаз рестрикції проводили за допомогою програм DNASTAR та VECSTORNTI.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою експресії генів *IndYR* та *wblA_{gh}* у клітинах продуцентів антрациклінових антибіотиків плазмиди pKC1218E*IndY2*-2 [6] і pKC*wblAgh* [7] перенесено у клітини штамів *S. nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 і *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 методом міжродової кон'югації з *E. coli*. Як донора використали штам *E. coli* ET12567 (pUB307), що несе плазмиду pUB307, яка містить *tra*-гени плазмиди RK2. Експресія гена *IndYR*, клонованого у складі pKC1218E*IndY2*-2, відбувається з конститутивного промотора гена резистентності до еритроміцину *ermEp Saccharopolyspora erythraea* [14].

У результаті кон'югаційного перенесення отримали апраміцин-резистентні транскон'юганти *S. nogalater* із частотою $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$, *S. echinatus* із частотою $(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ та *S. peucetius* із частотою $(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$. Наявність плазмід в отриманих рекомбінантних штамів підтверджено за допомогою трансформації клітин *E. coli* DH5a сумарною ДНК, виділеною з клітин отриманих транскон'югантів, і подальшого рестрикційного картування плазмідних ДНК.

Дослідження стабільності успадкування плазмід транскон'югантами показало, що фенотип *Apm^r*, який забезпечується плазмидою, повністю втрачається рекомбінантними штамми після п'яти пересівів за відсутності селективного тиску (без додавання у середовище апраміцину). Проте ці плазмиди стабільно успадковуються за умов вирощування штамів-транскон'югантів у присутності антибіотика в кінцевій концентрації 50 мкг/мл. Для подальшої роботи відібрано по три незалежних транскон'юганти штамів *S. nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952, для яких підтверджено наявність відповідних плазмід. Штами, що містять pKC1218E*IndY2*, названо *S. nogalater* YR1, *S. echinatus* YR2 та *S. peucetius* YR3, а штамми, що містять pKC*wblAgh*, – *S. nogalater* GH1, *S. echinatus* GH2 та *S. peucetius* GH3 відповідно.

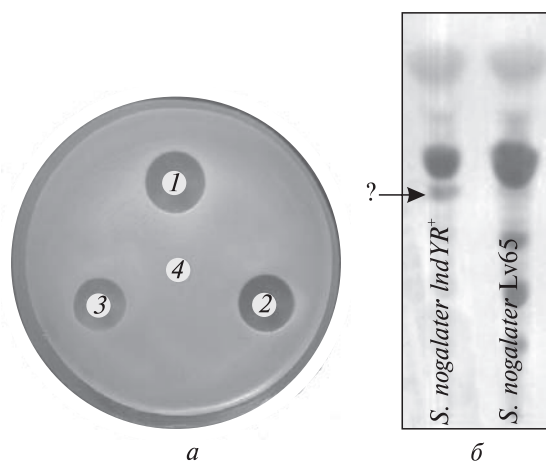


Рис. 2. Зони пригнічення росту тест-культури екстрактами антибіотиків штамів (а): 1 – *S. nogalater* Lv65, 2 – *S. nogalater* YR1, 3 – *S. nogalater* GH1, 4 – негативний контроль (метанол, використаний як розчинник ногамицину), тест-культура – *Sarcina lutea*; б – результати ТШХ екстрактів антибіотиків штамів *S. nogalater* YR1 та Lv65, стрілкою позначено нову сполуку, виявлену за допомогою ТШХ

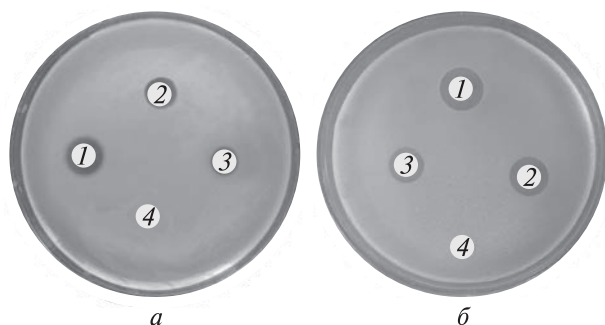


Рис. 3. Зони пригнічення росту тест-культури екстрактами антибіотиків штамів (а): 1 – *S. echinatus* DSM40730, 2 – *S. echinatus* YR2, 3 – *S. echinatus* GH2, 4 – негативний контроль (метанол, використаний як розчинник аранціаміцину); б – зони пригнічення росту тест-культури екстрактами антибіотиків штамів: 1 – *S. peucetius* subsp. *caesius*, 2 – *S. peucetius* YR3, 3 – *S. peucetius* GH3, 4 – негативний контроль (метанол, використаний як розчинник доксорубіцину)

Для дослідження впливу плейотропних регуляторів на синтез ногамицину, доксорубіцину та аранціаміцину визначали антибіотичну активність відповідних штамів з використанням тест-культур, чутливих до антрацикліну. Середні значення індексів продуктивності екстрактів антибіотиків, отриманих із досліджуваних

штамів *S. nogalater*, відрізнялись (рис. 2, а). Так, для екстрактів метаболітів, одержаних із штаму *S. nogalater* Lv65, ці показники становили $2,2 \pm 0,1$, а із штамів *S. nogalater* YR – $1,8 \pm 0,1$ та *S. nogalater* GH1 – $1,6 \pm 0,2$. Таким чином, введення гена *IndYR* під контролем конститутивного промотора *ermEp* та гена *wblA_{gh}* під контролем власного промотора у складі реплікативних кон'югаційних плазмід пригнічує процеси антибіотикоутворення у клітинах *S. nogalater* та може свідчити про наявність гомологів цих генів у геномі продуцента ногамицину.

Результати аналізу екстрактів антибіотиків, виділених із штамів *S. nogalater* Lv65 та YR1 за допомогою тонкошарової хроматографії (рис. 2, б), вказують на пригнічення синтезу не лише ногамицину, а й його попередників. Експресія гена *IndYR* приводить до появи нової сполуки, виявленої за допомогою ТШХ. Очевидно, що *IndYR* активує транскрипцію «мовчазних» генів вторинного метаболізму в хромосомі *S. nogalater*. Подібний ефект спостерігали за експресії окремих плейотропних регуляторів у клітинах актиноміцетів [5], а використання гетерологічної експресії регуляторних генів є ефективним підходом для одержання продуцентів нових антибіотиків. Разом з тим ми не спостерігали появи нових метаболітів в екстрактах GH1.

З метою вивчення впливу регуляторів на рівень біосинтезу інших антрациклінових антибіотиків досліджували антибіотичну активність екстрактів метаболітів із штамів *S. peucetius* YR3 та GH3, а також *S. echinatus* YR2 та GH2. Як тест-культури використовували *Sarcina lutea* для штамів *S. echinatus*, *Bacillus cereus* – для *S. peucetius*. Середні значення індексів продуктивності для екстрактів антибіотиків, отриманих з *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952, становили $1,4 \pm 0,1$, з *S. peucetius* YR3 – $1,2 \pm 0,1$, з GH3 – $1,0 \pm 0,1$, що свідчить про зниження рівня синтезу антибіотиків внаслідок експресії досліджуваних генів у клітинах продуцента доксорубіцину. Схожий результат отримали при дослідженні антибіотичної активності штамів *S. echinatus* DSM40730, *S. echinatus* YR2 та GH2 (рис. 3). Середні значення індексів продуктивності становили $2,0 \pm 0,1$ для екстрактів антибіоти-

ків штаму *S. echinatus* DSM40730, $1,7 \pm 0,1$ – для *S. echinatus* YR2 та $1,5 \pm 0,1$ – для GH2.

Порівняння середніх значень індексу продуктивності екстрактів антибіотиків отриманих штамів підтверджує, що наявність нативних векторів рКС1218Е та рКС1139 в клітинах стрептоміцетів не впливає на рівень синтезу досліджуваних антибіотиків.

У штамі *S. peucetius* YR3 експресія плазміди рКС1218Е*IndY2-2* зумовлює зміну його морфології. Так, за вирощування *S. peucetius* YR на повноцінних середовищах (вівсяному та Беннета) спостерігалось зниження здатності бактерій формувати повітряний міцелій та спори, що може вказувати на плейотропний характер експресії досліджуваного гена. Разом з тим ми не виявили впливу експресії гена *IndYR* на морфологічні характеристики штамів *S. nogalater* та *S. echinatus*. Як відомо з попередніх досліджень, регуляторний ген *IndYR* задіяний у біосинтезі антибіотиків та морфогенезі в актиноміцетів [6]. Цей регулятор успішно експресували в інших штамів стрептоміцетів. Зокрема, за експресії гена *IndYR* у клітинах *S. coelicolor* M145 (продуцент актинородину та ундецил-продигіозину) спостерігали його вплив як на синтез відповідних антибіотиків, так і на морфологічні характеристики бактерій [18].

Участь представників WhiB- та GntR-родин білкових регуляторів у генетичному контролі вторинного метаболізму вивчено у модельних штамів актиноміцетів [5, 18]. Порівняння амінокислотних послідовностей цих білків, клонуваних з геномів широкого кола актиноміцетів, підтвердило їхню високу консервативність [5, 6, 18]. Ці регулятори також широко поширені серед актиноміцетів [5]. Пригнічення процесів антибіотикоутворення продуктами генів *IndYR* та *wblA_{gh}* у *S. nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 свідчить про наявність їхніх гомологів у геномах, що виконують подібні функції, а також відкриває можливості вивчення нових ланок регуляції вторинного метаболізму у цих бактерій. Ідентифікація вказаних генів з метою подальшої спрямованої інактивації може бути успішним інструментом для одержання штамів з підвищеним рівнем синтезу клінічно важливих сполук, а також дозволить встановити окремі етапи регуляції вторинно-

го метаболізму антрациклінових антибіотиків. Очевидно, що для повного розуміння процесів генетичної регуляції синтезу антрациклінових антибіотиків необхідно здійснювати одночасну коекспресію різних регуляторних елементів. Генетичні маніпуляції з регуляторними генами разом із оптимізацією умов культивування є важливим механізмом конструювання надпродуцентів антибіотиків та становлять основу для розвитку біотехнологічного виробництва антрациклінів.

Робота частково підтримана Міжнародним грантом WUBMRC (для Д. Климишина) та грантом Бг 98Ф Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України (для В. Федоренка).

*D.O. Klymyshin, O.Ya. Nimets,
O.M. Stefanyshyn, V.O. Fedorenko*

Ivan Franko National University of Lviv
Institute of Animal Biology, Lviv
Danylo Halytskuy Lviv National Medical University
E-mail: dedima@rambler.ru

HETEROLOGEUS EXPRESSION OF *IndYR* AND *wblA_{gh}* GENES IN PRODUCERS OF ANTHRACYCLIN ANTIBIOTICS
STREPTOMYCES NOGALATER Lv65,
S. ECHINATUS DSM40730 AND *S. PEUCETIUS* SUBSP. *CAESIUS* ATCC27952

Strains of actinomycetes *Streptomyces nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730, and *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 are producers of anthracycline antibiotics nogalamycine, aranciamycine and doxorubicin, respectively. Here we have focused on the impact of *IndYR* and *wblA_{gh}* regulatory genes expression on secondary metabolism and morphogenesis of these bacteria. Expression of regulators decreased the synthesis of anthracyclines that may indicate the presence of their homologues in the genomes. In *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 *IndYR* also affect sporulation. Directed inactivation of these genes can be a successful tool for generation of strains with elevated synthesis of clinically important compounds, as well as elucidation of regulatory stages in biosynthesis of anthracycline antibiotics.

*Д.А. Климишин, О.Я. Нимец,
О.М. Стефанишин, В.А. Федоренко*

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *IndYR* И *wblA_{gh}* В ПРОДУЦЕНТАХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
STREPTOMYCES NOGALATER Lv65,
S. ECHINATUS DSM40730 И *S. PEUCETIUS* SUBSP. *CAESIUS* ATCC27952

Штаммы актиномицетов *Streptomyces nogalater* Lv65, *S. echinatus* DSM40730 и *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 являются продуцентами антрацикли-

новых антибиотиков ногаламицина, аранциамицина и доксорубицина соответственно. В работе изучено влияние экспрессии генов *IndYR* и *wblA_{gh}* на вторичный метаболизм и морфогенез этих бактерий. В исследуемых стрептомицетах введение регуляторов в составе репликативных плазмид приводит к снижению синтеза антрациклинов, а экспрессия *IndYR* в клетках *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 угнетает споруляцию продуцента доксорубицина, что указывает на наличие их гомологов в геномах. Идентификация этих генов с целью дальнейшей направленной инактивации может быть успешным инструментом для получения штаммов с повышенным уровнем синтеза клинически важных соединений, а также позволит установить отдельные этапы регуляции вторичного метаболизма антрациклиновых антибиотиков.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bibb M. J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* // Microbiology. – 2005. – **8**. – P. 208–215.
2. Bignell D., Tahlan K., Colvin K.R. et al. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG* // Antimicrob. Agents Chem. – 2005. – **49**. – P. 1529–1541.
3. Rebets Y., Dutko L., Ostash B. et al. Function of *lanI* in regulation of landomycin A biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136 and cross-complementation studies with *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins encoding genes // Arch. Microbiol. – 2008. – **189**. – P. 111–120.
4. Klymyshin D., Rabyk M., Nimets O. et al. Design of *Streptomyces nogalater* strains – overproducers of nogalamycine // Appl. Biochem. Microbiol. – 2011. – **67**, № 6. – P. 503–509.
5. Wezel G., McDowall K. The regulation of second metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // Nat. Prod. Rep. – 2011. – **28**. – P. 1311–1333.
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. Rabyk M., Ostash B., Rebets Yu. et al. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production // Biotechnol. Lett. – 2011. – **33**, № 12. – P. 2481–2486.
8. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // Pharm. Ther. – 1991. – **51**. – P. 239–255.
9. Luzhetskyy A., Almuth M., Hoffmann J., Pelzer S. Cloning and heterologous expression of the aranciamycin biosynthetic gene cluster revealed a new flexible glycosyltransferase // Chem. Bio. Chem. – 2008. – **8**. – P. 599–602.
10. Torkkell S., Kunnari T., Palmu K. et al. The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of 20-kb DNA region and generation of hybrid structures // Mol. Gen. Genet. – 2001. – **266**. – P. 276–288.
11. Torkkell S., Ylihonko K., Hakala J., Mantsala P. Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis // Mol. Gen. Genet. – 1997. – **256**. – P. 203–209.
12. Ylihonko K., Tuikkanen J., Jussila S. et al. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway // Mol. Gen. Genet. – 1996. – **251**. – P. 113–120.
13. Klymyshin D., Gren T., Fedorenko V. Role of *snorA* gene in *Streptomyces nogalater* Lv65 biosynthesis // Microbiology. – 2011. – **80**, № 4. – P. 496–501.
14. Kieser T., Bibb M., Buttner M. et al. Practical *Streptomyces* genetics. – Norwich : John Innes Found., 2000. – 634 p.
15. Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів, 2007. – 277 с.
16. Klimishin 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 // Cytology and Genetics. – 2007. – **41**, № 5. – P. 263–267.
17. Дубицька Л.П., Федоренко В.О. Конструювання штамів *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952-2 з підвищеною здатністю перетворювати даунорубіцин в доксорубіцин // Biopolym. Cell. – 2002. – **18**, № 2. – P. 91–95.
18. Fowler-Goldsworthy K., Gust B., Mouz S. et al. The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // Microbiology. – 2011. – **157**. – P. 1312–1328.

Надійшла 26.06.12