

Оригинальные работы

УДК 575.224+577.21

Д.О. КЛИМИШИН,
О.М. ГРОМИКО, В.О. ФЕДОРЕНКО
Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського 4, Львів 79005, Україна
E-mail: dedima@rambler.ru

ВИКОРИСТАННЯ МІЖРОДОВОЇ КОН'ЮГАЦІЇ *ESCHERICHIA COLI* – *STREPTOMYCES* ДЛЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК В ШТАМ *S. NOGALATER* IMET43360



Успішне перенесення досліджувальних плазмід в клітини *S. nogalater* IMET43360 за допомогою міжродової кон'югації в системі *E. coli* – *Streptomyces* робить цей метод зручним інструментом для конструювання даного штаму. За допомогою ДНК–ДНК гібридизації визначено характер інтеграції плазмід *pVWB* і *pRT801* та досліджено їхній вплив на біосинтез ногаламіцину. Результати наших досліджень дають змогу більш детально вивчати функціонування генів біосинтезу ногаламіцину у *S. nogalater* IMET43360. Використовування кон'югації для заміщення, руйнування генів та гетерологічної експресії дозволить отримувати нові «гібридні» антибіотики, що зможуть продукуватися цим штамом.

© Д.О. КЛИМИШИН, О.М. ГРОМИКО, В.О. ФЕДОРЕНКО,
2007

Вступ. Актиноміцети є одними з основних продуцентів біологічно активних речовин. Вони синтезуються біля двох третин усіх відомих сполук, що мають антибіотичну та протипухлинну активність [1–4]. Найбільше таких сполук продукують представники роду *Streptomyces*. Серед широкого спектра продуктів вторинного метаболізму цих мікроорганізмів значний інтерес становлять речовини з протипухлинними властивостями [1, 5].

Streptomyces nogalater IMET 43360 є продуцентом промислово важливого антрациклінового антибіотика ногаламіцину. На його основі одержано більше 60 сполук, які характеризуються високою протипухлинною активністю. Серед них є й такі, що ефективно використовуються у медичній практиці [5, 6]. З огляду на те, що у світі постійно зростає потреба в нових протипухлинних препаратах, вивчення їх біосинтезу та розробка генно-інженерних підходів набуває все більшої актуальності.

Для успішного використання сучасних методів генетичної інженерії щодо штамів актиноміцетів необхідно володіти ефективними методами введення рекомбінантних ДНК в їхні клітини, проте існуючі методики трансформації протопластів екзогенною ДНК для цілого ряду штамів актиноміцетів ще недостатньо ефективні.

Одним із таких штамів є *S. nogalater* [5, 7]. Альтернативою до трансформації протопластів актиноміцетів екзогенною ДНК може бути перенесення рекомбінантних плазмід в їхні клітини за допомогою кон'югації з *E. coli* [7–12]. У деяких випадках показана ефективність цієї методики [7–9, 12].

Метою даної роботи було створення ефектної системи перенесення рекомбінантних молекул ДНК в клітини штаму *S. nogalater* за допомогою кон'югаційних схрещувань з *E. coli*.

Матеріали і методи У роботі використано штами *S. nogalater* IMET43360 – продуцент ногаламіцину, *E. coli* DH5 α (F ϕ 80d Δ (lacZ) M15 recA1 endA1 gyrA96 thi11 deoR (lacZYA-argF) U169, *E. coli* ET12567(pUB307) (dam-13::Tn9 (Cm^r) dcm-6 hsdM), що містить плазмиду pUB307. Як тест-культуру для визначення антибіотичної активності *S. nogalater* використовували *Sarcina lutea*. Плазмиди для кон'югаційного перенесення представлені в таблиці. Штами *S. nogalater* IMET43360 вирощували на соєвому, мінімальному та рідкому середовищі TSB [2]

при 28–30 °С, а *E. coli* – на середовищах LB та TA [2, 4].

Для проведення схрещування *E. coli* × *S. nogalater* донорний штам *E. coli* ET12567(pUB307) вирощували до середини логарифмічної фази росту на середовищі LA 16–18 год. Суспензії клітин реципієнта та донора готували в середовищі LB. Концентрація клітин донора становила ~10⁸ кл/мл. Суспензію клітин реципієнта в концентрації ~10⁷ спор/мл піддавали тепловому шоку при 50 °С протягом 10 хв. Кон'югаційну суміш (100 мкл суспензії клітин реципієнта і 200 мкл суспензії спор донора у титрах, вказаних вище) розподіляли на поверхні чашок з вивсяним середовищем [2]. Інкубували протягом 12–18 год при температурі 28 °С і заливали 1 мл водного розчину, що містив апраміцин для селекції стрептоміцетів і налідиксову кислоту в кінцевих концентраціях 50 та 200 мкг/мл відповідно. У контролі визначали частоту утворення спонтанних апраміцин-стійких мутантів *S. nogalater* IMET43360.

Для дослідження динаміки перенесення плазмід в клітини *S. nogalater* спори реципієнтного штаму піддавали термічній обробці при 50 °С (міцелій в таких умовах гине) і змішували з клітинами донора. Переривали проходження схрещування заливаючи чашки Петрі розчинами апраміцину для селекції екскон'юган-

тів та налідиксової кислоти для пригнічення росту донора в кінцевих концентраціях 50 та 200 мкг/мл відповідно.

Для кількісного аналізу продукції ногаламіцину штами *S. nogalater* вирощували на соєвому середовищі протягом 24 год та проводили екстракцію антибіотика сумішшю хлороформ-ацетон (2 : 1). Концентрацію ногаламіцину в спиртових розчинах визначали спектрофотометрично. Спектри резистентності екскон'югантів *S. nogalater* до антибіотиків визначали шляхом дифузії в агар з використанням дисків з антибіотиками. Виділення плазмідної та хромосомної ДНК із штамів *S. nogalater* та *E. coli*, обробку ендонуклеазами рестрикції, ДНК–ДНК гібридизацію, електрофорез в агарозному гелі проводили згідно з рекомендаціями Norwood et al. [2].

Результати досліджень та їх обговорення. Беручи до уваги те, що трансформація протопластів *S. nogalater* IMET43360 плазмідною ДНК відбувається з низькою ефективністю [4, 5], ми вирішили зробити спробу використати методику міжродової кон'югації для перенесення плазмід з *E. coli* в цей штам. Спочатку як донор ми використали штам *E. coli* ET12567(pUB037), що містить кон'югативну плазмиду pSET152. Однією з особливостей цього вектора є те, що він містить *attP*-сайт і ген *int* актинофага φC31,

Характеристика використаних в роботі плазмід

Плазміда	Характеристика	Джерело отримання
pSET152	Кон'югаційна інтегративна плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> , ген <i>int</i> і <i>attP</i> сайт фага φC31, 5,5 тис. п.н.	Проф. П. Лідлей, Кембріджський ун-т, Великобританія
pVWB	Кон'югаційна інтегративна плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> , ген <i>int</i> і <i>attP</i> сайт фага VWB, 9,3 тис. п.н.	[7]
pCHZ101	Кон'югаційна човникова плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> та тіострипону <i>tsr^R</i> , реплікон плазмиди рHZ1351, 7,3 тис. п.н.	Проф. С. Зотчев, Університет м. Тронхейм, Норвегія
pSOK101	Кон'югаційна човникова плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> та тіострипону <i>tsr^R</i> , реплікон плазмиди рIJ101, 7,2 тис. п.н.	Там же
pKC1218	Кон'югаційна човникова плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> та тіострипону <i>tsr^R</i> , 5,8 тис. п.н.	Проф. Ф. Ломбо, Університет м. Ов'єдо, Іспанія
pKC1139	Кон'югаційна човникова плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> та тіострипону <i>tsr^R</i> , реплікон плазмиди рSG5, 6,5 тис. п.н.	[2]
pRT801	Кон'югаційна інтегративна плазміда, що містить ген стійкості до апраміцину <i>apm^R</i> , систему інтеграції фага φBT1, 5,2 тис. п.н.	Проф. Р. Тіл, Нотінгемський ун-т, Великобританія

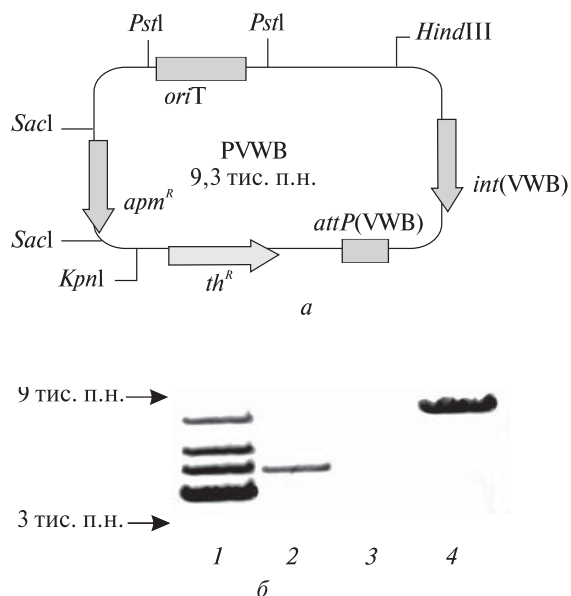


Рис. 1. Будова інтегративної плазмиди pVWB (а) та результати ДНК–ДНК гібридизації (б): *oriT* – ділянка, що відповідає за ініціацію кон'югаційного перенесення; *int* (VWB) – ген фага VWB, який забезпечує інтеграцію плазмиди в хромосому; *apm^R* – ген стійкості до апраміцину; *th^R* – ген стійкості до тіострепону; 1 – ДНК-маркер, 2 – сумарна ДНК *S. nogalater* pVWB+; 3 – сумарна ДНК *S. nogalater*; 4 – плазмиди pVWB, розщеплена ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*

що надає йому здатності до сайт-специфічної інтеграції в хромосому реципієнтних штамів актиноміцетів. Для забезпечення інтеграції необхідна наявність *attB*-сайту в хромосомі реципієнта. Здатність кон'югативних плазмід мобілізуватися в штамів *E. coli* (RP4) визначає фрагмент *oriT*, який є структурним елементом плазмиди. Як селективний маркер використовували ген стійкості до апраміцину (аас (3) IV). Вибір цього інтегративного вектора зумовлений тим, що автономні плазмиди часто нестабільні в клітинах актиноміцетів і значною мірою підлягають структурним перебудовам [7, 10, 13]. У низці експериментів ми не отримали екскон'югантів *S. nogalater* з даною плазмидою. Однією з можливих причин такого результату може бути те, що в хромосомі *S. nogalater* IMET43360 відсутні сайти інтеграції актинофага φC31. Ми припустили, що таке ускладнення можна подолати, використовуючи вектори з системами інтеграції, відмінними від φC31. Встановлено, що помірний фаг VWB інтегрується в хромо-

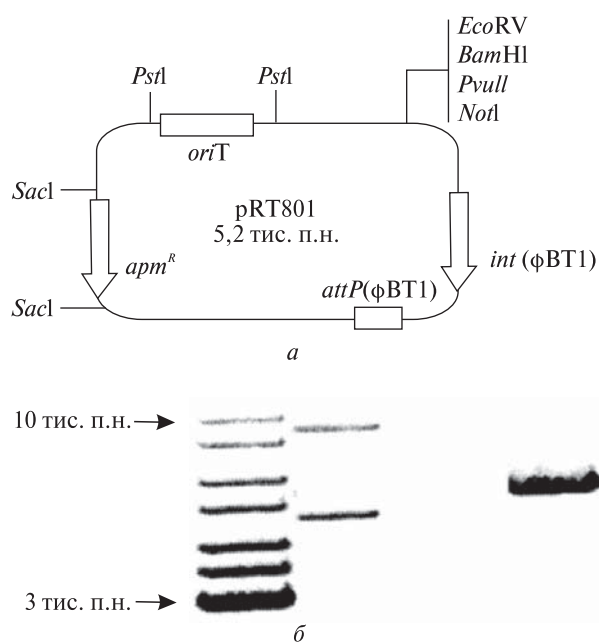


Рис. 2. Будова інтегративної плазмиди pRT801 (а) та результати ДНК–ДНК гібридизації (б): *oriT* – ділянка, що відповідає за ініціацію кон'югаційного перенесення; *int* (φBT1) – ген фага φBT1, який забезпечує інтеграцію плазмиди в хромосому; *apm^R* – ген стійкості до апраміцину; 1 – ДНК-маркер, 2 – сумарна ДНК *S. nogalater* pRT801+, 3 – сумарна ДНК *S. nogalater*; 4 – плазмиди pRT801, розщеплена ендонуклеазою рестрикції *EcoRV*

сому штаму *S. venezuelae* ETN14630 у результаті сайт-специфічної інтеграції.

Інтеграція відбувається в *attB*-сайт, який є частиною гена аргінінової тРНК [14], тому для кон'югаційного перенесення в штам *S. nogalater* ми обрали інтегративний вектор pVWB (рис. 1, а), який містить *attP*-сайт і ген *int* фага VWB. Екскон'юганти з інтегративним вектором pVWB з'являлися на 3–4-ту добу. Частота виникнення екскон'югантів в середньому становила $(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$. Слід зазначити, що частота трансформації протопластів даного штаму (близько 10^{-1} при концентрації 1 мкг ДНК) є значно нижчою від частоти кон'югативного перенесення плазмиди pVWB в проведених нами схрещуваннях [5, 8].

Як другий вектор, що може бути здатним до сайт-специфічної інтеграції в хромосому актиноміцетних штамів, нами було обрано pRT801 (рис. 2, а) з *attB*-сайтом та геном *int* фага φBT1.

Частота отримання екскон'югантів з цією плазмідною становила $(4,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$.

Факт інтеграції кон'югативних векторів у хромосому екскон'югантів *S. nogalater* IMET-43360 було підтверджено шляхом ДНК–ДНК гібридизації (рис. 1, б та 2, б). Для цього сумарні ДНК штаму *S. nogalater* та екскон'югантів розщеплювали ендонуклеазами рестрикції EcoRI та EcoRV відповідно. Отримані фрагменти фракціонували за допомогою гель-електрофорезу та переносили на нейлонові фільтри за методом Саузерна [2]. Як зонд нами було використано мічений дігксоксигеніною міткою PstI-фрагмент розміром 800 п.н.

З результатів гібридизації DIG-міченого зонду із фрагментами сумарної ДНК екскон'югантів *S. nogalater* pVWB⁺ (рис. 1, б) видно, що зонд гібридується лише з одним фрагментом сумарної ДНК розміром 4 тис. п.н. При використанні фрагментів сумарної ДНК екскон'югантів *S. nogalater* pRT801⁺ показано, що зонд гібридується з двома фрагментами розмірами 9,5 та 5 тис. п.н. (рис. 2, б), в той час як на контрольних доріжках (з фрагментами сумарної ДНК вихідного штаму) гібридизаційних сигналів не виявлено. Отримані результати дозволяють нам стверджувати про існування в хромосомі *S. nogalater* одного сайту інтеграції плазмиди pVWB та двох сайтів інтеграції плазмиди pRT801.

В роботі також використані вектори, здатні до автономної реплікації в клітинах актиноміцетів – pSOK101, pCHZ101, pKC1139 та pKC1218. Вони мають різні реплікони, що походять з плазмид pIJ101, pHZ1375, pSG5 та SCP2 відповідно (таблиця). Селекцію плазмид здійснювали за стійкістю до апраміцину. Частота появи екскон'югантів *S. nogalater* IMET43360, які містять плазмиду pSOK101, становила в середньому $(3,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$. Екскон'юганти *S. nogalater* pCHZ101⁺ одержували з частотою $(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$, а *S. nogalater* pKC1139⁺ та *S. nogalater* pKC1218⁺ – з частотою $(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ та $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$ відповідно.

Для підтвердження факту наявності реплікативних векторів в клітинах реципієнтного штаму *S. nogalater* IMET43360 було здійснено трансформацію клітин штаму *E. coli* DH5 α сумарною ДНК з клітин екскон'югантів. Трансформанти *E. coli*, які містили кон'югативні

плазмиди pSOK101, pCHZ101, pKC1139 та pKC1218, виникали з приблизно однаковою частотою, яка коливалася в межах від $(5,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$ до $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$.

З огляду на те, що селекцію одержаних в роботі екскон'югантів проводили за стійкістю до апраміцину, було вирішено дослідити, чи не виникають спонтанні апраміцин-резистентні мутанти *S. nogalater*. З цією метою спори *S. nogalater* IMET43360 в титрі $4,7 \cdot 10^8$ висівали на середовище з різними концентраціями апраміцину (25, 50, 75 та 100 мкг/мл). На середовищі з вказаними концентраціями антибіотика резистентних мутантів не виявлено.

При перевірці екскон'югантів *S. nogalater* IMET43360, які містять плазмиди pVWB та pRT801, виявлено, що присутність цих плазмид не впливала на культурально-морфологічні характеристики (динаміку росту, розмір колоній, споруючість і пігментацію міцелію) екскон'югантів досліджувального штаму.

Дослідження стабільності успадкування кон'югативних плазмид екскон'югантами показало, що фенотип *apm^R*, який забезпечується плазмидами pRT801 та pVWB, успадковувався зі 100 %-ною частотою у всіх досліджувальних клонів екскон'югантів *S. nogalater* pVWB⁺ та *S. nogalater* pRT801 після п'яти пересівів цього штаму у рідкому середовищі TSB без апраміцину. Рівень успадкування плазмид pKC1139, pKC1218, pCHZ101 та pSOK101 в екскон'югантів *S. nogalater* ми дослідили після трьох пересівів у рідкому середовищі TSB без додавання антибіотика. За даних умов серед 117 pKC1139⁺ екскон'югантів 89 % втрачали плазмиду. Всі досліджені екскон'юганти *S. nogalater* pKC1218⁺ (131 клон), pCHZ101⁺ (107 клонів) та pSOK101⁺ (120 клонів) втрачали плазмиду, проте всі автономні плазмиди стабільно успадковувалися за умови вирощування штамів екскон'югантів в присутності апраміцину в кінцевій концентрації 50 мкг/мл, стійкість до якого забезпечується зазначеними плазмидами.

Відомо, що присутність екзогенних плазмідних ДНК у клітинах реципієнтних штамів (особливо це стосується інтегративних векторів) може впливати на продукцію антибіотиків екскон'югантами та стійкість до антибіотиків [7]. Нами показано, що рівень продукції антибіотика у екскон'югантів з автономними

плазмідами та плазмідом рRT801 істотно не відрізняється від рівня біосинтезу ноґаламіцину у *S. nogalater* (95–98 % в порівнянні з вихідним штамом). Екскон'югантам *S. nogalater* рVWB⁺ властиве зниження синтезу на 50 % від рівня біосинтезу у вихідного штаму *S. nogalater* IMET43360. Слід зазначити, що інгібувальний ефект інтеграції плазмиди рVWB в хромосому реципієнтного штаму *S. nogalater* рVWB⁺ створює певні труднощі у використанні цієї плазмиди як вектора.

Показано, що екскон'юганти, які містять інтеґративні вектори рVWB та рRT801, є стійкішими до гентаміцину та канаміцину порівняно з вихідним штамом *S. nogalater*. Така підвищена резистентність до канаміцину і гентаміцину може виникати в результаті експресії гена стійкості до апраміцину, що міститься у цих плазмідах [15].

З огляду на той факт, що частота перенесення різних векторів в клітини актиноміцетів є неоднаковою [3, 7–9], було досліджено динаміку міжродового кон'югаційного процесу в системі *E. coli* – *S. nogalater* IMET43360. Екскон'юганти виникали вже на 12-ту годину після початку схрещування, а із збільшенням часу схрещування кількість екскон'югантів зростала експоненціально. Максимальна частота отримання екскон'югантів, що містять реплікативні плазмиди, зафіксована на 14-ту годину від початку схрещування. Максимальну частоту отримання екскон'югантів *S. nogalater* рVWB⁺ та рRT801⁺ спостерігали на 15-ту годину від початку схрещування.

Одержані результати свідчать про те, що методика кон'югаційного перенесення в системі *E. coli* – *S. nogalater* IMET43360 є ефективною для введення екзогенних молекул ДНК в штам *S. nogalater* IMET43360, що відкриває широкі можливості для генно-інженерного конструювання цього штаму, а також вивчення генетичного контролю біосинтезу ноґаламіцину. На користь цього свідчить також те, що перенесення плазмідних ДНК в штам *S. nogalater* IMET43360 шляхом кон'югації проходить ефективніше порівняно з трансформацією протопластів. Цей метод є дешевшим і простішим у застосуванні, оскільки не вимагає отримання протопластів актиноміцетних штамів. Він дозволяє використати широкий

спектр як реплікативних, так і інтеґративних плазмід для отримання рекомбінантних штамів [7, 11, 16, 17]. Можливість такого ефективного перенесення рекомбінантних плазмід в клітини *S. nogalater* дозволяє отримувати продуценти нових антибіотиків.

SUMMARY. Successful transfer of the studied plasmids into *S. nogalater* IMET43360 cells using bacterial conjugation in the system *E. coli* – *Streptomyces* is an appropriate method for constructing this strain. Using DNA–DNA hybridization the character of integration of рVWB and рRT801 plasmids has been studied. The influence of these plasmids on nogalamycin biosynthesis has been investigated as well. The obtained results enable detailed study of nogalamycin gene functioning in *S. nogalater* IMET43360. The use of conjugation for substitution, destruction of genes, and heterologous expression allows to get new «hybrid» antibiotics produced by this strain.

РЕЗЮМЕ. Успешное перенесение исследуемых плазмид в клетки *S. nogalater* IMET43360 с помощью межродовой конъюгации в системе *E. coli* – *Streptomyces* делает этот метод удобным инструментом для конструирования указанного штамма. Использование ДНК–ДНК гибридизации позволило определить характер интеграции плазмид рVWB и рRT801, а также исследовать их влияние на биосинтез ноґаламицина. Результаты наших исследований позволяют более детально изучать функционирование генов биосинтеза ноґаламицина у *S. nogalater* IMET43360, а использование конъюгации для замещения, разрушения генов и гетерологической экспрессии позволит получить новые «гибридные» антибиотики, которые могут продуцироваться этим штаммом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Baltz R.H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Trends Microbiol. – 1998. – 6. – P. 76–83.
2. Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Shrempf H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. – Norwich : John Innes Found., 1985. – 356 p.
3. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. – Norwich : John Innes Found., 2000. – 634 p.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual // CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor. – New York, 1989. – 450 p.
5. Ylisonko K., Hakala J., Kunmary T. et al. Production of hybrid anthracycline antibiotics by heterologous expres-

- sion of *Streptomyces nogalater* nogalamycin biosynthesis genes // *Microbiology*. – 1996. – P. 1965–1972.
6. Li H., Krueger W. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // *Pharm. Therap.* – **51**. – P. 239–255.
 7. Лужецький А., Мазена А., Мар'їна О. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для введення генетичної інформації в штами *Streptomyces globisporus* 1912 and *Streptomyces kanamyceticus* // Вісн. Львів. у-ту. Сер. біол. – 2000. – № 25. – С. 74–80.
 8. Воейкова Т.А. Конъюгативный перенос плазмид из *Escherichia coli* в различные штаммы порядка Actinomycetales // *Генетика*. – 1999. – **35**, № 12. – С. 1626–1633.
 9. Лужецький А.Н., Остап Б.Е., Федоренко В.А. Межродовая конъюгация *Escherichia coli* – *Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 и ее производных // *Генетика*. – 2001. – **37**, № 10. – С. 1340–1347.
 10. Bates S., Cashmore A., Wilkins B.M. IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the tra2 mating system // *J. Bacteriol.* – 1998. – **180**. – P. 6538–6543.
 11. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Hoffmeister D., Bechtold A., Fedorenko V. A gene cloning system for *Streptomyces cyanogenus* S136 // Вісн. Львів. у-ту. Сер. біол. – 2002. – № 29. – P. 62–68
 12. Mazodier Ph., Peffer R., Thompson Ch. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species // *J. Bacteriol.* – 1989. – **171**. – P. 3583.
 13. 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.
 14. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., Schoner B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *E. coli* to *Streptomyces* spp. // *Gene*. – 1992. – **116**. – P. 43–49.
 15. Гловер Д. Клонирование ДНК : Методы. – М.: Мир, 1988. – 538 с.
 16. Giebelhaus L., Frost L., Lanka E., Gormley E.P., Davies J.E., Leskiw B. The Tra2 core of the IncP (alpha) plasmid RP4 is required for intergeneric mating between *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* // *J. Bacteriol.* – 1996. – **178**. – P. 6378–6381.
 17. Ylihonko K., Tuikkanen J., Jussila S. et al. A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *S. nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the antracycline pathway // *Mol. Gen. Genet.* – 1996. – **251**. – P. 113–120.

Надійшла 31.07.06