

Створення продуцентів нових полікетидних антибіотиків методами генетичної інженерії

Б. О. Осташ, В. О. Федоренко

Львівський національний університет імені Івана Франка
Вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

Зроблено огляд сучасних експериментальних даних в галузі вивчення біосинтезу полікетидів — однієї з найбільших груп природних сполук, що проявляють широкий спектр цінних біологічних властивостей. Розуміння генетичних та біохімічних аспектів полікетидного синтезу дозволяє створити рекомбінантні штами мікроорганізмів, що продукують нові сполуки з передбачуваною структурою. Описано основні методи генетичного «дизайну» нових полікетидних сполук, наведено приклади геноінженерного конструювання продуцентів промислово важливих полікетидних антибіотиків.

Вступ. Полікетиди — це велика група природних сполук, які синтезуються шляхом повторюваної конденсації коротких ацильних залишків (ацетил-КоА, пропіоніл-КоА та ін.) [1]. Полімер, що утворюється, надалі зазнає низки ферментативних модифікацій (кеторедукція, циклізація, гідроксилювання, глікозилювання тощо), набір яких є характерним для біосинтезу тієї чи іншої сполуки [2]. Полікетиди проявляють бактерицидні, фунгіцидні, противірусні, протипухлинні, антигельмінтні, імуносупресорні властивості і використовуються в медицині, сільському господарстві та ветеринарії [3, 4]. Більшість біологічно активних полікетидів синтезується актиноміцетами — грамположитивними бактеріями з розвиненим вторинним метаболізмом.

Розробка хімічних та біологічних методів одержання нових антибіотиків посідає значне місце в роботах, присвячених вивченню вторинного метаболізму в актиноміцетів [3—6]. Сьогодні цей напрям наукового пошуку набув особливої актуальності, що пов'язано, насамперед, з появою клінічних штамів мікроорганізмів, стійких до відомих антибіотиків, пухлин, які проявляють множинну резистентність до протипухлинних засобів [7]. За останні роки показана також перспективність використання природних полікетидів як противірусних і гербіцидних агентів [4, 8].

Полікетидні антибіотики є сполуками, хіміч-

ний синтез чи модифікація яких є надзвичайно складним і економічно не вигідним процесом. Це зумовлює значний інтерес до геноінженерних методів створення нових полікетидів. Маніпуляції з генами вторинного метаболізму в актиноміцетів дозволяють конструювати нові біосинтетичні шляхи і змінювати існуючі. Сучасна методологічна база молекулярної біології розвинута достатньо, щоб отримувати мікроорганізми, які продукуватимуть групи хімічно споріднених сполук («хімічні бібліотеки») із заздалегідь передбачуваною структурою («генетичний дизайн полікетидів») [9].

Однак потенціал методів генетичної інженерії не може бути розкритий повністю без досконалого розуміння генетики і біохімії полікетидного синтезу. Тому особливо важливими є роботи, спрямовані на вивчення біосинтезу полікетидних антибіотиків в актиноміцетів, зокрема, у модельних штамів — продуцентів еритроміцину *Saccharopolyspora erythraea*, тетраценоміцину *Streptomyces glaucescens* і актинородину *Streptomyces coelicolor* A3(2) [10, 11], встановлення принципів та механізмів, які б мали універсальний характер. Метою даного огляду є висвітлення сучасних досягнень і проблем у вивченні полікетидного синтезу та геноінженерного конструювання продуцентів нових полікетидних антибіотиків.

Синтез жирних кислот (СЖК) і синтез полікетидів — подібності і відмінності. Полікетидний синтез в актиноміцетів відбувається за схемою

СЖК в про- та еукаріотів. У складі синтаз жирних кислот (СЖК-комплекси), як і в полікетидсинтазах (ПКС), є кетоацилсинтаза (KS_a), ацилтрансферази (АТ) та ацилпереносний білок (АПБ), що каталізують синтез первинного вуглецевого ланцюга [12]. За аналогією до СЖК-комплексів, ПКС поділяють на два типи. ПКС I типу є мультифункціональними білками. Один поліпептид містить домени, що проявляють усі ферментні активності, необхідні для одного чи кількох циклів β -кетоконденсації—редукції. Кожна нова біосинтетична реакція каталізується іншим доменом і кількість циклів конденсації визначається кількістю доменів-кетосинтаз. Характерними рисами ПКС I типу є конвеєрний принцип синтезу полікетидного ланцюга (на відміну від циклічного у ПКС II типу) і ковалентна асоціація ферментів-доменів. Найдетальніше вивчено ПКС I типу, яка задіяна в синтезі еритроміцину у *Sacch. erythraea* [11].

ПКС II типу є набором окремих ферментів, що об'єднуються у функціональну одиницю, яка каталізує поступову конденсацію ацильних попередників. Така ПКС є нековалентним асоціатом білків. Гени, що кодуєть ці білки, зібрані в хромосомі у кластер. Прикладом такої мультикомпонентної синтази є ПКС, що бере участь в синтезі актинородину в *S. coelicolor* A3(2) [13].

За останні роки виявлено, що актиноміцети здатні продукувати полікетиди, в синтезі яких задіяна принципово інша ферментна система (відсутній АПБ, нема гомології до ПКС I і II типів). Так, із *Streptomyces griseus* клонували ген *rppA*, що кодує білок з 327 амінокислотних залишків і є дуже подібним до халконсинтаз, які беруть участь в синтезі флавоноїдів у вищих рослин. Показано, що гомодимер RppA каталізує синтез пентакетиду, який далі спонтанно циклізується [15].

Є ряд відмінностей між СЖК та синтезом полікетидів. Для СЖК характерним є завершений цикл редукції кетогрупи в метиленову, кінетичний контроль довжини вуглецевого ланцюга (синтезується переважно пальмітат, C_{16}), використання виключно ацетил-КоА для побудови жирної кислоти [2]. Полікетидному синтезу ж притаманні варіативність циклу кеторедукції, використання ширшого кола ацильних попередників, генетичний контроль довжини полікетиду (C_7 — C_{50}), наявність великої групи генів, що контролюють модифікацію первинного полі- β -кетонного ланцюга.

ПКС I типу: синтез еритроміцину А в *Sacch. erythraea*. Еритроміцин А (Er) — промислово важливий полікетидний антибіотик, що належить до класу макролідів. Його макролактон (дезоксеритронолід В; DEB) синтезується з однієї молекули

пропіоніл-КоА і шести — метилмалоніл-КоА. Секвенування кластеру генів біосинтезу Er (*ery*-кластер) зробило можливим ідентифікацію генів, що контролюють синтез DEB (гени *eryA1*, *eryA2*, *eryA3*) і модифікацію лактону. Гени *eryBI-BVII*, *eryCI-CVI* контролюють синтез цукрів дезозаміну і кладинози та відповідно їхнє приєднання до DEB, *eryK*, *eryF* — C12- і C6-гідроксилювання DEB, *eryG* — метилювання кладинози. Ген *ermE* кодує метилтрансферазу 23S рРНК (рис. 1). Таке метилювання надає клітинам *Sacch. erythraea* стійкості до власного антибіотика [14].

Синтез DEB каталізують три гігантські (більше 3000 амінокислотних залишків кожен) мультифункціональні білки — DEBS1, DEBS2, DEBS3, що кодуєть відповідно генами *eryA1*, *eryA2*, *eryA3*. Фрагмент DEBS-білка, який проявляє певну каталітичну активність, назвали доменом. У межах поліпептиду окремі домени набувають власної глобулярної структури, яка не залежить від просторової структури сусідніх доменів. Сукупність доменів, необхідних для проходження одного циклу нарощування і кеторедукції полікетидного ланцюга, названа модулем [11] (рис. 1). В ПКС з *ery*-кластеру на один білок припадає два модулі. Загалом є шість модулів, кожен з яких містить кетосинтазні та ацилтрансферазні домени, що дозволяє провести шість конденсацій. На N-кінці DEBS1 є стартовий модуль для введення першого ацильного залишку (пропіонату), який містить АТ- і АПБдомени. Останній, шостий модуль, закінчується тіоестеразним доменом (ТЕ), що каталізує вивільнення з тіоєфірного зв'язку та лактонізацію полікетидного інтермедиату [13]. Така організація ПКС-комплексу дозволяє на кожному етапі конденсації вводити наступний ацильний залишок, відмінний за будовою від попередніх, і досягти великої структурної різноманітності лактонів, що синтезують [16].

Спостерігається колінеарність у розташуванні *eryA*-генів та порядку участі кодованих ними білків у синтезі лактонного кільця. Вищенаведені факти щодо генетичного контролю синтезу DEB свідчать про конвеєрний принцип функціонування ПКС I типу. Правильність такого припущення підтверджується результатами експериментів із спрямованого руйнування окремих доменів [1, 11, 13]. Їхня інактивація спричинювала зміну структури в очікуваній позиції, яку можна передбачити, виходячи з модульної організації ПКС. Важливим є той-факт, що змінений інтермедіат — результат мутації в одному з доменів п'ятого модуля — сприймався як субстрат доменами шостого. Отже, перенесення проміжного продукту з одного модуля на інший є функцією специфічного впорядкування

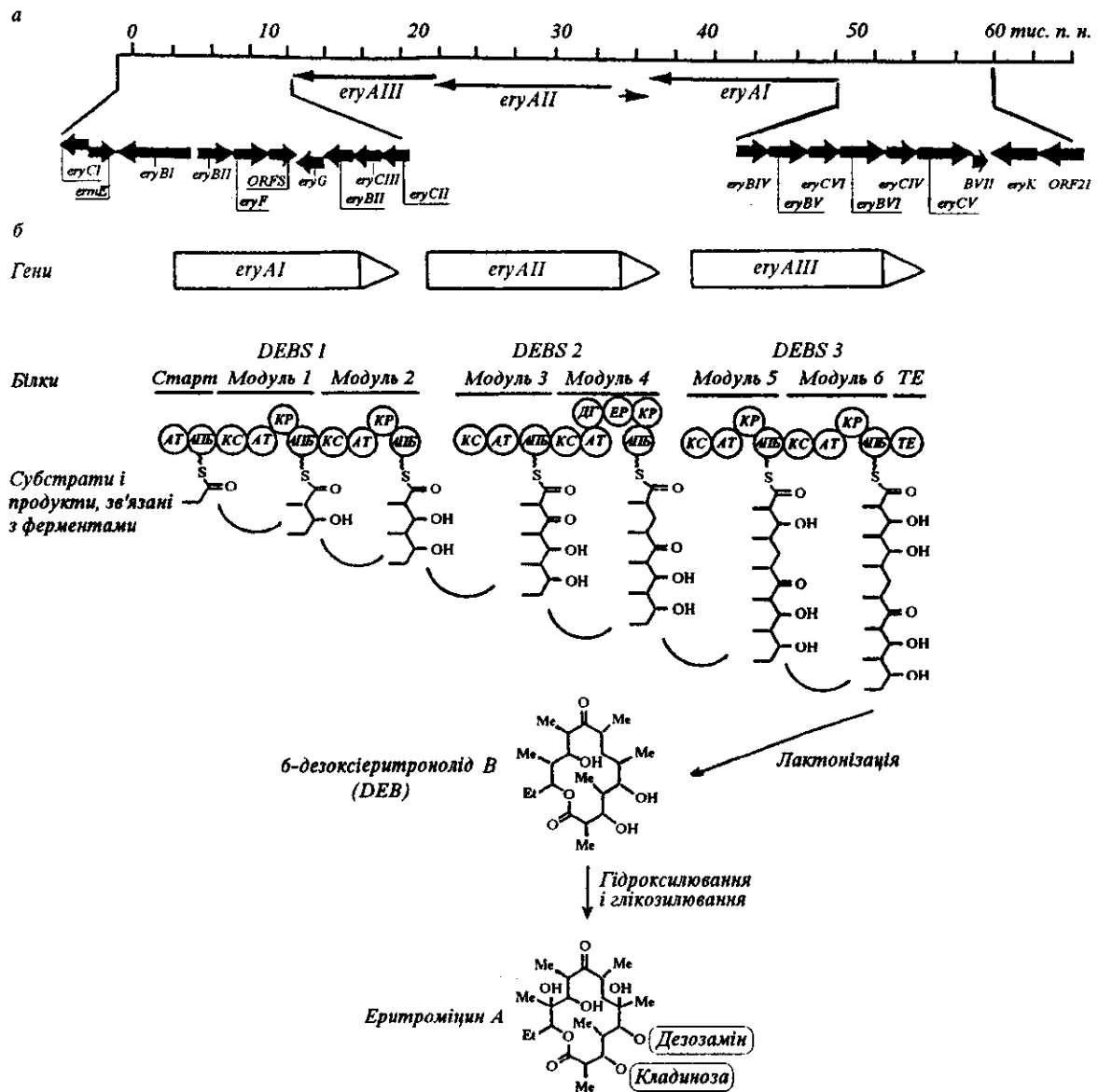


Рис. 1. Синтез еритроміцину [11]: а — організація кластеру генів біосинтезу еритроміцину *Sacch. erythraea* (функції генів — див. текст; напрям стрілок на генетичній карті кластеру позначає напрям транскрипції генів); б — схема синтезу еритроноліду та його модифікація (кільцями в схемі синтезу еритроноліду позначено окремі домени: АТ — ацилтрансфераза; КС — кетосинтаза; КР — кеторедуктаза; АЛБ — ацилпереносний білок; ДГ — дегідратаза; ЕР — енолредуктаза; міжмодульні та міжбілкові лінкери поділовності не представлені)

ПКС-модулів, а не їхньої структурної комплементарності до певних полікетидних ланцюгів [11]. В ході експериментів з геноінженерного конструювання рекомбінантних ПКС I типу, що містили модулі з продуцентів різних макролідних полі-

кетидів (гетерологічні модулі), виявлено, що вирішальну роль при впорядкуванні DEBS-білків відіграють міжбілкові лінкери — 30—40 N-кінцевих амінокислотних залишків, переважно гідрофільних. Лінкери, що з'єднують модулі в межах одного

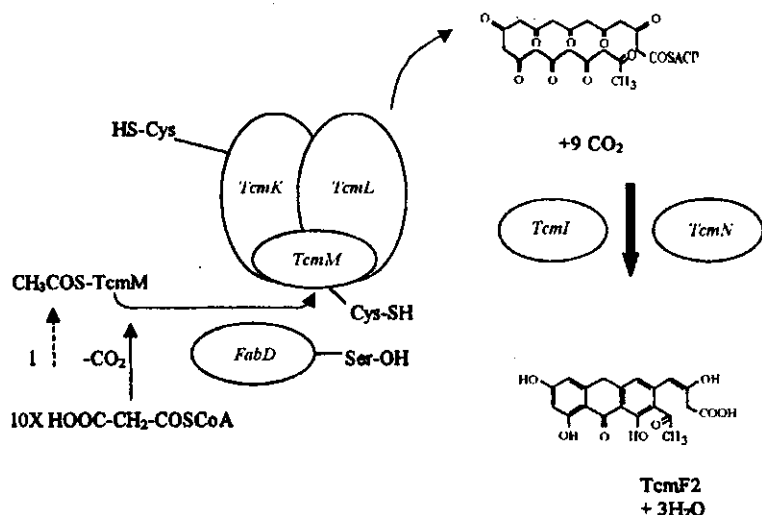


Рис. 2. Схема синтезу попередника тетраце-
номіцину С — тетраценоміцину F2 [27]. Умо-
вні позначення: *TcmK* — кетосинтаза; *TcmL* —
фактор контролю довжини ланцюга; *TcmM* —
ацилпереносний білок; *TcmI* — білок — стабі-
лізатор комплексу мінімальної ПКС; *TcmN* —
циклаза-О-метилтрансфераза; *FabD* — ацил-
трансфераза

поліпептиду (міжмодульні лінкери), є короткими. В них присутній консервативний залишок проліну [17, 18].

Гени *eryA1*, *eryA2*, *eryA3* фланковані двома групами генів [19, 20]. Кодовані ними білки каталізують модифікації первинного лактону (рис. 1, а). Приєднання дезоксицукрів до DEB є важливим з огляду на те, що лише глікозильований еритронолід проявляє антибіотичну активність. Показано, що глікозилтрансферази *EryBV* і *EryCIII* здатні приєднувати цукрові залишки до субстратів, відмінних від DEB. У той же час білки *EryF* і *EryK* (цитохром Р-450 оксигенази) проявляють високу субстратну специфічність [1, 14]. Генетичні детермінанти для компонентів електронтранспортного ланцюга оксигеназ і для ферментів приєднання пантотенової кислоти до АПБ та окремих етапів синтезу дезоксицукрів не входять в *ery*-кластер [11, 14, 20].

На сьогодні виявлено, що ПКС I типу бере участь у синтезі таких важливих макролідних сполук, як рапаміцин, авермектин, ланкаміцин; поліефірів — монензину і нігерицину, макротетролідів, поліенів (ністатину) [1, 13, 21—25]. Генетична та функціональна організація цих ПКС є складнішою за організацію ПКС в *ery*-кластері. Це виражається в неколінеарності розташування генів та порядку участі в синтезі полікетиду кодованих ними білків, наявності спеціальних доменів для введення в склад полікетидного ланцюга амінокислот або інтермедіатів їхнього метаболізму (синтез рапаміцину, авермектинів, ланкаміцинів) [25], «мовчазних» доменів чи відсутності АПБ-доменів (біосинтез авермектинів і макротетролідів відповідно) [22].

ПКС II типу — синтез ароматичних полікетидних антибіотиків. Ароматичні полікетидні антибіотики є структурно простішими за продукти каталітичної активності ПКС I типу, що відображає простішу генетичну організацію ПКС II типу. Це пов'язано з тим, що ароматичні полікетиди синтезуються переважно з ацетил-КоА, бо циклічний механізм функціонування ПКС II типу не дозволяє вводити різні ацильні залишки в процесі синтезу одного полікетидного ланцюга [26]. На сьогодні клоновано більше 20 кластерів генів біосинтезу ароматичних полікетидних антибіотиків [13]. Найдетальніше генетичні та біохімічні аспекти синтезу ароматичних полікетидних антибіотиків вивчено в продуцентів декакетидного (полікетонний ланцюг складається з 20 атомів вуглецю; C₂₀) антибіотика тетраценоміцину С (ТсС) *S. glaucescens* [27] і октакетидного антибіотика актиноридину (Аг; C₂₀) *S. coelicolor* А3(2) [9, 13]. Схема синтезу полікетидного попередника ТсС представлена на рис. 2.

Організація генів їхнього біосинтезу є типовою для кластерів генів біосинтезу ароматичних полікетидних антибіотиків (рис. 3). Центральне місце в них займають три гени, що контролюють циклічний процес β-кетоконденсації [28]. Один з них кодує кетосинтазу КС_α (гени *tcmK* і *actI-ORFI* в *S. glaucescens* та *S. coelicolor* А3(2) відповідно). Другий ген кодує білок КС_β, який забезпечує включення першого ацильного залишку та контролює довжину полікетидного ланцюга (*tcmL* і *actI-ORFII*) [9], а третій — АПБ (*tcmM* і *actI-ORFIII*) [2]. В більшості випадків ці гени формують єдину транскрипційну одиницю. Комплекс білків КС_α, КС_β, АПБ та АТ, що постачається з первинного мета-

болізму [1, 27], каталізує формування первинного полі- β -кетонного ланцюга. Цей комплекс отримав назву «мінімальна ПКС». Решта білків, що кодуються кластерами, модифікують утворений інтермедіат, регулюють його синтез та експорт, надають клітинам продуцента стійкості до власного антибіотика. З мінімальною ПКС взаємодіють полікетидкеторедуктази (КР) та полікетидциклази/ароматази (ПЦ), які каталізують перші реакції модифікації полікетидного ланцюга (інтегральні компоненти) [29]. Інші ферменти (неінтегральні компоненти) діють на частково циклізованій інтермедіат після того, як він відділився від мінімальної ПКС.

На відміну від генів ПКС I типу, секвенування та інактивація генів біосинтезу ароматичних полікетидів не завжди чітко вказували на функцію кодованих ними білків [6, 10]. Тому у з'ясуванні механізму функціонування ПКС II типу важливу роль відіграють експерименти з гетерологічної експресії їхніх генів. Виявлено, що мінімальна ПКС контролює вибір стартового ацильного залишку, яким переважно є ацетил-КоА [30]. У двох випадках — в біосинтезі даунорубіцину в *S. peucetius* та окситетрацикліну в *S. rimosus* — формування полікетидного каркасу розпочинається не з ацетил-КоА, а з пропіоніл- і малонаміл-КоА відповідно. В кластерах генів синтезу цих сполук виявлено спеціальні гени, що контролюють вибір саме цих стартових залишків [2, 31]. Для мінімальної ПКС з *act*-кластеру показано, що KC_{β} володіє декарбоксилазною активністю. В стартових модулях деяких ПКС I типу також виявлено домен, що містить декарбоксилазний активний центр і забезпечує ініціацію полікетидного синтезу. Це вказує на існування спільних рис у генетичному контролі вибору першого ацильного залишку у ПКС I і II типів [9]. В генах для KC_{β} з *tcm*- і *act*-кластерів локалізували послідовність, що кодує 57 амінокислотних залишків. Цей амінокислотний мотив відіграє вирішальну роль у визначенні кількості циклів β -кетоконденсації. Рекombінантна *act*-ПКС, у якій цей мотив замінили на гетерологічний з *tcm*-ПКС, синтезувала декакетидні ланцюги, а не октакетидні [28]. Але вплив на цей процес мають також і інтегральні компоненти ПКС. Так, мінімальна ПКС з кластеру *whi*-генів, що контролюють споровий пігмент полікетидної природи *S. coelicolor* A3(2), здатна синтезувати C_{22} - і C_{24} -ланцюги. Ко-експресія генів *whiE* ORF 1, 2, 3 мінімальної ПКС з геном циклази *whiE*-ORFVI спричинює синтез виключно C_{24} -ланцюгів [13]. Подібні зміни спостерігаються при спільній експресії генів мінімальної ПКС одного біосинтетичного шляху і генів

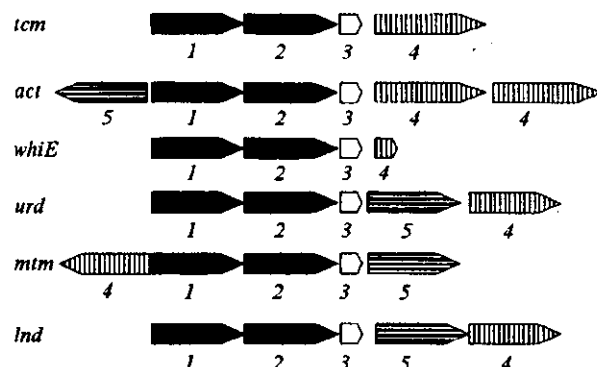


Рис. 3. Генетична організація комплексів полікетидсинтаз з кластерів генів біосинтезу тетраценоміцину *S* (*tcm*), актиноридину (*act*), спорового пігменту Wh(*whiE*), урдаміцинів (*urd*), мітраміцину (*mtm*), ландоміцину *E* (*Ind*) [13, 40]. Цифрами позначено гени, що кодують: 1 — кетоацилсинтазу (KC_{α}); 2 — KC_{β} ; 3 — ацилпереносний білок; 4 — полікетидциклази/ароматази; 5 — полікетидкеторедуктази

модифікації полікетидного ланцюга — іншого [1, 32, 33].

Отже, коекспресія генів гомологічних чи гетерологічних інтегральних компонентів з мінімальною ПКС веде до якісних і кількісних змін у її функціонуванні [29]. Для ПКС II типу не виявлено генів, які б кодували ТЕ. Поки що важко пояснити, як проходить вивільнення полікетиду з ПКС-комплексу для його подальшого процесингу неінтегральними білками. Можливо, цей процес контролюється АТ-мотивом KC_{α} або ж відбувається спонтанно (за аналогією із синтезом β -метилсаліцилової кислоти). Не виключено, що він каталізується відповідними ферментами із СЖК-комплексу [33].

Характерною рисою кластерів генів синтезу ароматичних полікетидів є наявність великої групи генів, що контролюють реакції «дозрівання» лінійного полі- β -кетонного ланцюга. До них насамперед належать кеторедукція, інтрамолекулярні альдольні конденсації/аддукції, формування ненасичених зв'язків у кільцях («ароматизація»), окислення, алкілювання, декарбоксилювання, глікозилювання та ін. Перші модифікаційні реакції — редукція і циклізація визначають характерну структуру даної сполуки.

Кеторедуктаза взаємодіє з мінімальною ПКС і відновлює в полікетидному ланцюзі, що синтезується, карбонільну групу до метиленової. КР з кластеру генів синтезу *Ag S. coelicolor* A3(2) відновлює кетогрупу в положенні С9 і зберігає здатність до С9-кеторедукції на ланцюгах завдовжки

C_{16} — C_{24} [13, 34]. Загалом КР проявляють низьку субстратну специфічність [35]. У деяких кластерах не виявлено генів, які кодують КР (*tcm*-кластер *S. glaucescens*).

Тип першої циклізації первинного полікетидного ланцюга залежить від активності полікетидциклази і сайта кеторедукції, якщо остання характерна для синтезу даного антибіотика. Так, при C_9 -кеторедукції проходить альдольна конденсація між C_7 і C_{12} , при C_7 -кеторедукції — між C_5 і C_{10} [34, 36]. ПЦ також мають відносно низьку субстратну специфічність. Циклаза $TcmN$ функціонує на окта- і декакетидних, $ActIV$ — на C_{16} - і C_{18} -, але не на C_{20} -ланцюгах [13].

Інші реакції модифікації є специфічними для синтезу певного полікетиду. Саме активність оксигеназ, метил- і глікозилтрансфераз, що «оздоблюють» циклізований інтермедіат, визначає унікальність його біологічної дії. В гетерологічних умовах вищезгадані білки демонструють субстратну «гнучкість» — вони здатні вводити відповідні функціональні групи в різні ділянки того ж полікетиду чи сприймати різні полікетидні каркаси як субстрат [2, 4, 28, 37]. Більшість оксигеназ, що беруть участь у синтезі ароматичних полікетидних антибіотиків, не є цитохром $P450$ -залежними. З цим, можливо, і пов'язана їхня низька субстратна специфічність в гетерологічних умовах, тоді як $P-450$ оксигенази є вузькоспецифічними [4, 11, 37].

Хоча окремі ферменти синтезу ароматичних полікетидів можуть каталізувати відповідні реакції з використанням альтернативних субстратів, у природних умовах один кластер генів контролює синтез лише одного антибіотика [14, 38, 39], а інші полікетиди є інтермедіатами чи продуктами шунтових реакцій. Очевидно, що в цих умовах усі білки ПКС-комплексу формують оптимальний ферментний асоціат, у якому окремі ферменти зазнають певних конформаційних змін [1, 33]. Це веде до появи вузької субстратної специфічності в інтегральних компонентах ПКС-комплексу. Відтак неінтегральним білкам біосинтезу ароматичних полікетидних антибіотиків постачається лише один субстрат, який вони певним чином модифікують [29].

Експерименти з конструювання ПКС, субодниці яких є різного походження, інколи спричинюють синтез сполук з непередбачуваною структурою [28]. Це свідчить про потребу глибшого вивчення ПКС II типу.

Принципи конструювання продуцентів нових полікетидів. Інженерія нових полікетидних сполук базується на низькій субстратній специфічності ферментів вторинного метаболізму та їхній здат-

ності функціонувати в гетерологічних умовах. Розроблено три основних підходи до геноінженерного створення продуцентів нових полікетидів. Перший — це міжвидове клонування великих фрагментів кластерів генів біосинтезу полікетидних сполук [13, 38, 40—43]. Такий метод ґрунтується на передбаченні того, що експресія клонованих генів призведе до модифікації антибіотика, який синтезується гетерологічним господарем, або ж ферменти, кодовані генами господаря, діятимуть на полікетид — результат експресії клонованих генів. Другий — це гетерологічна експресія окремих генів з відомими функціями. Цей підхід дозволяє отримувати сполуки із заздалегідь передбачуваною структурою. Третій — це інактивація окремих генів методами спрямованого мутагенезу для отримання проміжних продуктів і продуктів шунтових реакцій, що проявляють важливі біологічні властивості.

Дослідження показали, що є кілька умов, отримання яких підвищує імовірність отримання нових сполук у результаті гетерологічної експресії макрофрагментів ДНК з генами біосинтезу полікетидних сполук чи окремих генів [8, 14]. Перш за все, ферменти, що кодуються як генами клонованого фрагмента, так і генами господаря, повинні каталізувати синтез близьких за структурою сполук (полікетидні ланцюги однакової довжини). Білки, які модифікують полікетидний ланцюг, мають проявляти розширену субстратну специфічність. Важливо, щоб новий полікетид, який утворюється в результаті спільної експресії клонованих генів та генів господаря, не був аутоксичним. Коли механізм захисту вихідного штаму від ендогенного антибіотика є неефективним у випадку «гібридної» сполуки, тоді слід створювати спеціальну систему для її видалення з клітин. Кандидатом на таку роль є широкоспецифічний АТР-залежний транспортер, клонований із штаму *S. rochei*. Експресія цього білка надає стійкості клітинам *S. lividans* до еритроміцину, спіраміцину, доксорубіцину і тетрацикліну [44].

Маніпуляції з генами, що кодують ПКС I і II типів. Гени, що кодують ПКС I і II типів, широко використовуються в комбінаторному синтезі полікетидів, але рекомбінантні ПКС I типу займають чільне місце в таких експериментах. Це пов'язано з високим потенціалом конструктивних можливостей модульних ПКС. ПКС I типу використовують широкий спектр ацильних залишків і синтезують складні макролідні, поліефірні і поліенові сполуки. Модульна ПКС здатна формувати редукований цикл, що генерує п'ять функціональних груп (кетон-, R- і S-гідрокси-, еноіл- та метиленова групи)

на кожному з n кроків нарощування ланцюга, теоретично даючи $5n$ варіантів синтезу (15625 для *ery*-ПКС), з яких реалізується один. Програмування такого редуктивного циклу є поза функціональними можливостями ПКС II типу [13, 26]. Для ПКС II типу характерне жорстке програмування вибору ацильних залишків, переважно ацетил-КоА. Тому синтезуються відносно прості полікетиди, які набувають структурної різноманітності та певних біологічних властивостей після модифікації.

Прикладом маніпуляцій з ПКС I типу є створення рекомбінантних ПКС на основі DEB-синтази *Sacch. erythraea*. На генному рівні АТ-домени і домени, що каталізують β -кеторедукцію в DEBS, замінили на їхні аналоги з рапаміцин-синтази *S. hygrosopicus*, які кодуєть домени з іншими субстратними специфічностями і ферментними активностями. Рекомбінантні DEBS-білки з одиничними замінами комбінували для отримання пептидів з подвійними і потрійними заміщеннями доменів. Такі білки каталізували продукцію макролактонів з однією, двома чи трьома відповідними модифікаціями [40]. Здатність одночасно змінювати кілька каталітичних центрів ПКС демонструє можливість перетворення таких маніпуляцій в технологічний процес для конструювання бібліотек нових полікетидів.

Іншим підходом є конструювання рекомбінантних ПКС шляхом заміни не окремих доменів, а цілих модулів-синтаз, підбираючи відповідні лінкери для їхньої функціональної сумісності [17]. Таким способом вдалося отримати рекомбінантні DEBS-білки, в яких стартовий домен походив з рапаміцинсинтази і які синтезували похідні дезоксиеритроноліду з включенням піпеколової кислоти як першого ацильного залишку [25, 28]. Нові лактони є субстратами як для хімічної, так і ферментативної модифікації відповідних функціональних груп. Для спрощення геноінженерних маніпуляцій з генами модульних синтаз розроблено метод, що передбачає клонування окремих ПКС-модулів на трьох різних плазмідах, експресія яких є сумісною в *S. coelicolor* CN999 та *S. lividans* (мультиплазмідний підхід). Це перспективно при комбінуванні модулів ПКС, що походять з різних кластерів, і спрощує отримання мутацій в окремих доменах [41]. На основі цього підходу створено систему для глікозилювання нових лактонів з використанням широкоспецифічної глікозилтрансферази з кластеру генів біосинтезу пікроміцину *S. venezulae*. Показано, що глікозилюваним лактонам притаманна антибіотична активність [42].

Експресія мінімальної ПКС II типу в мутант-

них штаммах актиноміцетів, які не утворюють жодних полікетидних антибіотиків [13], спричинювала синтез полікетидних ланцюгів, що, спонтанно циклізуючись, давали суміш сполук. У цій суміші переважала сполука з тим типом циклізації, який є найвигіднішим з термодинамічної точки зору [30]. Продукти каталітичної активності ПКС II типу, які синтезують окта-, нона- і декакетиди, позбавлені антибіотичних властивостей. Перспективною є експресія мінімальних ПКС з кластерів генів біосинтезу сполук, ланцюг яких складається з більше ніж 20 вуглеців. Так, мінімальна ПКС *S. coelicolor* A3(2), що задіяна в синтезі згаданого вище спорового пігменту (C_{24}), в гетерологічних умовах здатна генерувати 30 полікетидів різної довжини і типу циклізації. Серед них виявлено сполуку TW93h з унікальним 2,4-діоксиадамантановим кільцем, що не має аналогів у природі, і речовини з такою структурою досі синтезували лише хімічним шляхом [43].

Експресія фрагментів ДНК, які несуть, крім генів мінімальної ПКС, інші генетичні детермінанти, є найпоширенішим способом отримання «гібридних» антибіотиків. У 1981 р. групою дослідників на чолі з Д. Хопвудом отримано перші «гібридні» сполуки медедроміцин А і В та дигідрогранатиродин як результат клонування генів біосинтезу активородину в штам, що продукує хімічно споріднені сполуки [38].

Іншим прикладом комбінаторного синтезу «гібридного» антибіотика є біосинтез тетраценоміцину М (ТсМ) у *S. glaucescens* (продуцент ТсС), в який клонували фрагмент *mtm*-кластеру генів синтезу протипухлинного антибіотика мітраміцину (Mt) *S. argillaceus*. Цей фрагмент містить гени ПКС, КР, ПЦ та оксигенази. Полікетидний інтермедіат у синтезі тетраценоміцину С — ТсF2 — є також проміжним продуктом і в синтезі Mt. Тому ТсF2 є субстратом і для КР, ПЦ та оксигеназ — продуктів *mtm*-кластеру. Таким чином, ТсМ — це результат спільної експресії генів з *tcm*- (синтез ТсF2) і *mtm*-кластерів (окислення і відновлення ТсF2) [45].

Зі штамму *S. olivaceus*, продуцента протипухлинного антибіотика елораміцину, клонували кластер генів біосинтезу цієї сполуки. Зокрема, отримали косміду 16F4, яка несе фрагмент згаданого кластеру, що контролює синтез попередника елораміцину 8-диметил-ТсС. Трансформація *S. fradiae*, продуцента ангуциклінових антибіотиків урдаміцинів (Ur), або *S. argillaceus* космідою 16F4 призвела до продукції чотирьох нових глікозилюваних сполук. Цікаво, що залишки дезоксицукрів приєднані до 8-диметил-ТсС в інших по-

зиціях, ніж у Mt і Ur [46, 47]. Це свідчить про те, що глікозилтрансферази з *mtm*- і *urd*-кластерів володіють широкою субстратною специфічністю і можуть використовуватись для отримання нових полікетидів.

S. galilaeus продукує аклациноміцини та цінерубіни — антибіотики антрациклінової групи, що проявляють протипухлинні властивості. Експресія генів біосинтезу актинородину в *S. galilaeus* показала, що вони функціонують однаково в *S. coelicolor* A3(2) і в цьому гетерологічному господарі. Експресія ділянки кластеру генів синтезу β -родоміцинів *S. purpurascens* в *S. galilaeus* веде до продукції ряду антрациклінів, що не є характерними для господаря. Ці сполуки несли нові метильні та гідроксильні групи або ж були позбавлені карбоксильної групи [48].

Маніпуляції з окремими генами, що контролюють модифікацію полікетидного каркасу. Реакції окислення та глікозилювання циклізованого полікетиду привертають особливу увагу дослідників, бо дозволяють отримати нові сполуки з цінними біологічними властивостями.

Експресія в *S. galilaeus* гена *dnrF*, що кодує аклавінон-11-гідроксилазу в *S. peucetius*, веде до продукції нового антрацикліну — 11-гідроксіяклациноміцину [5] (рис. 4). Названа сполука є більш активною проти лейкемічних і меланомних ракових клітин, ніж вихідний аклациноміцин. Цей приклад демонструє ефективність використання методів генетичної інженерії для отримання сполук з новими біологічними активностями.

На сьогодні відомо ще кілька прикладів гетерологічної експресії оксигеназ. Так, у результаті експресії гена *urdE* (C_{12} -гідроксилаза) з *S. fradiae* в *S. glaucescens* спостерігається синтез нового тетраценоміцину — 6-гідрокситетраценоміцину С [47]. Виявлено дві оксигенази, здатні сприймати як субстрат полікетиди різної довжини. Зокрема, макролідна Р-450-гідроксилаза *PicK* *S. venezulae* здатна здійснювати гідроксилювання C_{12} - і C_{14} -кетолідів — сполук, які активні проти еритроміцин-стійких штамів мікроорганізмів. Це значно полегшує пошук нових терапевтично цінних макролідів [49]. Гідроксилазу *NcpH* з послабленою специфічністю стосовно довжини полікетидного ланцюга виявлено в кластері генів біосинтезу нафтоциклінонів *S. arenae*. Поруч з геном *nspH* розташований ген *nspD*, що кодує циклазу-ароматазу, яка сприймає як субстрати C_{16} - і C_{20} -ланцюги. Коекспресія *nspD* з різними генами мінімальних ПКС веде до продукції ряду нових полікетидів [50]. Це робить даний фермент цінним інструментом для модифікації продуктів активності мінімальних ПКС різ-

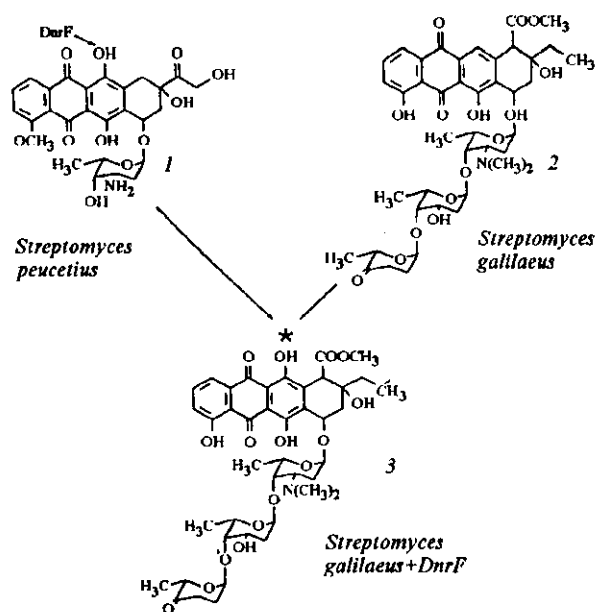


Рис. 4. Комбінаторний синтез 11-гідроксіяклациноміцину (3) в результаті експресії *dnrF* з кластеру генів біосинтезу доксорубіцину (1) *S. peucetius* в штамі — продуценті аклациноміцину (2) *S. galilaeus* [47]. У молекулі доксорубіцину стрілкою позначено гідроксильну групу, вводиться гідроксилазою *DnrF*. У молекулі 11-гідроксіяклациноміцину зірочкою позначено гідроксильну групу, введення якої каталізував *DnrF*

них продуцентів. Розроблено також підхід для виявлення генів, що кодують білки з новими ферментативними активностями, який ґрунтується на поступовому клонуванні генів в один вектор та аналізі полікетидів, що продукуються лише за наявності мінімальної ПКС чи ПКС та інших білків у різних комбінаціях [51].

Увагу дослідників привертають також гени, які контролюють синтез та приєднання цукрів до аглікону, адже саме глікозильний залишок протипухлинних антибіотиків відповідає за їхнє зв'язування з ДНК, прояв антибіотичної активності у макролідів тощо [14]. На сьогодні клоновано гени біосинтезу цукрів з різних кластерів генів біосинтезу полікетидів та вивчено механізми їхнього функціонування [52—54]. Зокрема, здійснено гетерологічну експресію гена *oleG2* олеандрозилтрансферази з кластеру генів біосинтезу олеандоміцину. Ген *oleG2* експресували в подвійному мутанті *Sacch. erythraea* з делетованими генами глікозилтрансферази *eryBV* та *eryCIII*. Рекombінантний штам *Sacch. erythraea* Δ *eryBV*, Δ *eryCIII*, *oleG2* синтезував новий лактон, до якого був приєднаний залишок рамнози в положенні C3 [53].

Цікавою є проблема конструювання біосинтетичних шляхів для продукції нових цукрів — компонентів полікетидів. Це значно збільшить спектр полікетидних сполук, які можна генерувати методами генетичної інженерії. Так, у синтезі аміноцукру даунозаміну, що входить до складу клінічно важливого протипухлинного антибіотика доксорубіцину, бере участь 4-кеторедуктаза DpmV. Вона відновлює кетогрупу цукру в положенні C4 до гідроксогрупи. Ген *dpmV* інактивували методом спрямованого мутагенезу, і в мутантний штам ввели ген *eryBIV* з *ery*-кластеру *Sacch. erythraea*, що кодує 4-кеторедуктазу з протилежною стереоспецифічністю. Рекombінантний штам продукував епірубіцин — сполуку, в якій гідроксильна група в C3-положенні аміноцукру мала протилежну орієнтацію, ніж у доксорубіцині [54].

Показано, що епірубіцин більш ефективний проти лейкемій, ніж доксорубіцин. Ще одним прикладом генетичної інженерії цукрів є гетерологічна експресія трьох генів, які контролюють метилювання L-рамнози — дезоксицукру, що входить до складу молекули елораміцину (E1). E1 є антрациклін-подібним протипухлинним антибіотиком, що продукується *S. olivaceus* Tu2353. Показано, що дані метилази володіють розширеною субстратною специфічністю і здатні функціонувати на інших агліконах [55].

Продукт урдаміцинів *S. fradiae* зі зруйнованим геном *urdGT2* продукує три нові сполуки, серед яких переважаючим є неглікозильований аналог UrA — UrJ. Ця сполука, на відміну від решти урдаміцинів, містить насичений C5—C6 зв'язок в ангулярній області урдаміцинону [4]. Така структурна особливість UrJ може бути наслідком активності певної еноїлредуктази, що не проявляється в клітинах дикого типу. Показано, що UrJ має кращі протипухлинні властивості, ніж UrA-E. Подібні експерименти з інактивації генів, що кодують GT, проведені зі штамом *S. argillaceus*. Отримано нові сполуки, які за своєю активністю не поступаються кінцевому продукту — мітраміцину. Вони структурно подібні до сполук, виділених з *Aspergillus niger*, які пригнічують нейропептид-Υ-рецептори [47].

Висновки. Геноінженерне конструювання продуцентів біологічно активних полікетидних сполук — порівняно нова галузь біотехнології. Вона базується на успіхах у клонуванні генів біосинтезу багатьох полікетидних антибіотиків, з'ясуванні основних принципів генетичного контролю синтезу полікетидів та явищі широкої субстратної специфічності ферментів вторинного метаболізму.

Експерименти зі створення штучних шляхів

біосинтезу полікетидних антибіотиків показали, що сучасний рівень розуміння механізмів функціонування ПКС II типу не є вичерпним, оскільки не завжди дозволяє передбачити структуру продуктів експресії цих ПКС. Маніпуляції з генами ПКС I типу дозволяють створювати складні макролідні сполуки з передбачуваною структурою. Рівень продукції «гібридних» макролідів є інколи надто низьким для впровадження штамів-продуцентів у промисловість. Цей факт свідчить про існування певних невивчених особливостей у функціонуванні і взаємодії доменів та модулів в рекombінантних синтазах, регуляції експресії генів рекombінантних ПКС I типу. Тому подальше вивчення біосинтезу полікетидних антибіотиків, як і пошук нових природних полікетидів, надалі залишається актуальним [33, 56].

Разом з тим успіхи в конструюванні продуцентів нових біологічно активних речовин (епірубіцину, 6-гідроксіаклациноміцину, тетраценоміцину M, урдаміцину J тощо) та в створенні «макролідних бібліотек» (рекombінантних *ery*-ПКС), а також можливість отримання принципово нових сполук (TW93h) і розширення субстратної специфічності окремих ферментів вторинного метаболізму за допомогою маніпуляцій з їхніми генами *in vitro* [28] свідчать про перспективність використання методів генетичної інженерії для генерування нових біологічно активних полікетидних сполук.

B. O. Ostash, V. O. Fedorenko

Gene engineering of novel polyketide antibiotics producers

Summary

Current understanding of the polyketide antibiotics synthesis is reviewed. Detailed heuristics in both genetic and biochemical aspects of polyketide synthesis allows to create the recombinant strains — producers of new polyketides with predicted structure. Methods for rational genetic «design» of hybrid compounds are described and examples of engineered synthesis of the industrially important polyketide antibiotics are given.

Б. Е. Осташи, В. А. Федоренко

Создание продуцентов новых поликетидных антибиотиков с помощью методов генетической инженерии

Резюме

Сделан обзор современных экспериментальных данных в области исследования биосинтеза поликетидов — одной из наибольших групп природных соединений, проявляющих ряд ценных биологических свойств. Понимание генетических и биохимических аспектов поликетидного синтеза позволяет создавать рекombинантные штаммы микроорганизмов, продуцирующие соединения с заданной структурой. Описаны основные методы генетического «дизайна» новых поликетидных соединений, приведены примеры геноинженерного конструирования продуцентов промышленно важных поликетидных антибиотиков.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pfeifer B. A., Khosla C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts // *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*—2001.—65.—P. 106—118.
2. Hutchinson C. R., Fujii I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics // *Annu. Rev. Microbiol.*—1995.—49.—P. 201—238.
3. Hagan D. O. Biosynthesis of fatty acid and polyketide metabolites // *Nat. Prod. Rep.*—1995.—10.—P. i—31.
4. Krohn K., Rohr J. Angucyclines: total syntheses, new structures and biosynthetic studies of an emerging new class of antibiotics // *Top. Curr. Chem.*—1997.—188.—P. 127—195.
5. Hwang C. K., Kim H. S., Hong Y.-S., Kim Y.-H., Hong S.-K., Kim S.-J., Lee J. S. Expression of *Streptomyces peucetius* genes for doxorubicin resistance and aklavinone hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC31133 and production of a hybrid aclacinomycin // *Antimicrob. Agents Chemother.*—1995.—39, N 7.—P. 1616—1620.
6. Kramer P. J., Zawada R. J. X., McDaniel R., Hutchinson C. R., Hopwood D. A., Khosla C. Rational design and engineered biosynthesis of a novel 18-carbon aromatic polyketide // *J. Amer. Chem. Soc.*—1997.—119, N 4.—P. 636—639.
7. Lewis K. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme // *TIBS Lett.*—1994.—34.—P. 119—124.
8. Thiericke R., Rohr J. Angucycline group antibiotics // *Nat. Prod. Rep.*—1993.—9.—P. 103—137.
9. Bisang C., Long P. F., Cortes J., Westcott J., Crosby J., Matharu A.-L., Cox R. J., Simpson T. J., Staunton J., Leadlay P. F. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases // *Nature.*—1999.—401.—P. 502—505.
10. Hopwood D. A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* // *Microbiology.*—1999.—145.—P. 2183—2202.
11. Staunton J., Wilkinson B. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin // *Chem. Rev.*—1997.—97.—P. 2611—2629.
12. Rangan V. S., Joshi A. K., Smith S. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation *in vitro* // *Biochemistry.*—2001.—40, N 36.—P. 10792—10799.
13. Hopwood D. A. Genetic contributions to understanding polyketide synthase // *Chem. Rev.*—1997.—97.—P. 2465—2497.
14. Hutchinson C. R., Decker H., Tang L. Genetic control of polyketide synthesis in the genus *Streptomyces* // *Antonie van Leeuwenhoek Lect.*—1993.—64.—P. 165—176.
15. Funa N., Ohnishi Y., Fujii I., Shibuya M., Ebizuka Y., Hourinouchi S. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms // *Nature.*—1999.—400.—P. 897—899.
16. Wu N., Tsuji S. Y., Cane D. E., Khosla C. Assessing the balance between protein-protein interactions and enzyme-substrate interactions in the channeling of intermediates between polyketide synthase modules // *J. Amer. Chem. Soc.*—2001.—123, N 27.—P. 6465—6474.
17. Gokhale R. S., Tsuji S. Y., Cane D. E., Khosla C. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthase // *Science.*—1999.—284.—P. 482—485.
18. Tsuji S. Y., Wu N., Khosla C. Intermodular communication in polyketide synthases: comparing the role of protein-protein interactions to those in other multidomain proteins // *Biochemistry.*—2001.—40, N 8.—P. 2317—2325.
19. Güsser S., Bohm G. A., Cortes J., Leadlay P. F. Analysis of a seven genes from the *eryA1-eryK* region off the erythromycin biosynthetic cluster in *Saccharopolyspora erythraea* // *Mol. and Gen. Genet.*—1997.—256.—P. 239—251.
20. Salah-Bey K., Doumith M., Haydock S., Cortes J., Leadlay P. F., Raynal M. Targeted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea* // *Mol. and Gen. Genet.*—1998.—257.—P. 542—553.
21. Suwa M., Sugino H., Sasaoka A., Mori E., Fujii S., Shinkawa H., Nimi O., Kinashi H. Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid *pSLA2-L* in *Streptomyces rochei* // *Gene.*—2000.—246, N 1—2.—P. 123—131.
22. Kwon H.-J., Smith W. C., Xiang L., Shen B. Cloning and heterologous expression of the macrotetrolide biosynthetic gene cluster revealed a novel polyketide synthase that lacks an acyl carrier protein // *J. Amer. Chem. Soc.*—2001.—123, N 14.—P. 3385—3386.
23. Yu T. W., Shen Y., Doi-Katayama Y., Tang L., Park C., Moore B. S., Hutchinson C. R., Floss H. G. Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively // *Biochemistry.*—1999.—96, N 16.—P. 9051—9056.
24. Brautaset T., Sekurova O., Sletta H., Ellingsen T. N., Stromm A. R., Valla S., Zotchev S. B. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the cluster and deduction of the biosynthesis pathway // *Chem. Biol.*—2000.—7.—P. 395—403.
25. Pfeifer A., Admiraal S. J., Gramajo H., Cane D. E., Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain *Escherichia coli* // *Science.*—2001.—291.—P. 1790—1792.
26. Tsoi C. J., Khosla C. Combinatorial biosynthesis of «unnatural» natural products: the polyketide example // *Chem. and Biol.*—1995.—2.—P. 355—362.
27. Hutchinson C. R. Microbial polyketide synthase: more and more prolific // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1999.—96, N 5.—P. 3336—3338.
28. Khosla C., Gokhale R. S., Jacobsen J. R., Cane D. E. Tolerance and specificity of polyketide synthases // *Ann. Rev. Biochem.*—1999.—68.—P. 219—253.
29. Shen B., Hutchinson C. R. Deciphering the mechanism for the assembly of aromatic polyketides by a bacterial polyketide synthase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1996.—63.—P. 6600—6604.
30. Shen B., Summers R. G., Wendt-Pienkowski E. The *Streptomyces glaucescens* *tcmKL* polyketide synthase and *tcmN* polyketide cyclase genes govern the size and shape of the aromatic antibiotics // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117.—P. 6811—6821.
31. Bao W., Sheldon P. J., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R. The *Streptomyces peucetius* *dpsC* gene determines the choice of starter unit in biosynthesis of daunorubicin polyketide // *J. Bacteriol.*—1999.—181, N 15.—P. 4690—4695.
32. Zawada R. J. X., Khosla C. Domain analysis of the molecular features of aromatic polyketide synthase subunits // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 26.—P. 16184—16188.
33. Dreier J., Khosla C. Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer // *Biochemistry.*—2000.—39, N 8.—P. 2088—2095.
34. McDaniel R., Khosla S.-E., Hopwood D. A., Khosla C. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits // *Nature.*—1995.—375.—P. 549—554.
35. Meurer G., Gerlitz M., Wendt-Pienkowski E., Vining L. C., Rohr J., Hutchinson C. R. Iterative type II polyketide synthases, cyclases and ketoreductases exhibit context-dependent behavior in the biosynthesis linear and angular decapolyketides // *Chem. and Biol.*—1997.—4, N 6.—P. 433—443.
36. McDaniel R. Engineered biosynthesis of novel polyketides:

- analysis of TcmN function in tetracenomycin biosynthesis // J. Amer. Chem. Soc.—1995.—117.—P. 6805—6810.
37. Hutchinson C. R. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomycin // Chem. Rev.—1997.—97.—P. 2525—2535.
 38. Bentley R., Bennett J. W. Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis // Annu. Rev. Microbiol.—1999.—53.—P. 411—446.
 39. Ostash B. O., Pankevych K. O., Luzhetskyy A. M., Basiliya L. I., Gromyko O. M., Kruegel H., Fedorenko V. O. Studying of genes involved in landomycin E biosynthesis by *Streptomyces globisporus* 1912 // 12th Int. Symp. on Biol. of Actinomycete.—Vancouver, 2001.—P. 133.
 40. McDaniel R., Gustafsson C., Fu H., Betlach M., Ashley G. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel «unnatural» natural products // Proc. Nat. Acad. Sci. USA—1999.—96D.—P. 1846—1851.
 41. Hurtweck C. The multiplasmid approach: a new perspective for combinatorial biosynthesis // ChemBiochemistry.—2000.—1.—P. 103—106.
 42. Tang L., McDaniel R. Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity // Chem. and Biol.—2001.—8, N 6.—P. 547—555.
 43. Shen Y., Yoon P., Yu T.-W., Floss H., Hopwood D. A., Moore B. Ectopic expression of the minimal whiE polyketide synthase generates a library of aromatic polyketides of diverse sizes and shapes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA—1999.—96, N 5.—P. 3622—3627.
 44. Fernandez-Moreno M. A., Carbo L., Cuesta T., Vallin C., Malfartida F. A silent ABC-transporter isolated from *Streptomyces rochei* F20 induces multidrug resistance // J. Bacteriol.—1998.—180, N 16.—P. 4017—4023.
 45. Kunzel E., Wohlert S.-E., Beninga C., Haag S., Decker H., Hutchinson C. R., Blanca G., Mendez C., Salas J. A., Rohr J. Tetracenomycin M, a novel genetically engineered tetracenomycin resulting from a combination of mithramycin and tetracenomycin biosynthetic genes // Chem. Eur. J.—1997.—3, N 10.—P. 1675—1678.
 46. Kirsching A., Bechthold A., Rohr J. Chemical and biochemical aspects of deoxysugars and deoxysugar oligosaccharides // Top. Curr. Chem.—1997.—188.—P. 1—84.
 47. Salas J. A., Mendez C. Genetic manipulation of antitumor-agent biosynthesis to produce novel drugs // TIBTECH.—1998.—16, N 16.—P. 475—482.
 48. Niemi J. Hybrid anthracycline antibiotics production of anthracyclines by cloned genes from *S. purpurascens* in *S. galilaeus* // Microbiology.—1994.—140.—P. 1351—1358.
 49. Betlach Mary C., Kealey J. T., Betlach Melanie C., Ashley G. W., McDaniel R. Characterization of the macrolide P-450 hydroxylase from *Streptomyces venezulae* which converts narbomycin to picromycin // Biochemistry.—1998.—37.—P. 14937—14942.
 50. Brukner P., Sterner O., Bailey J. E., Minas W. Production of novel hybrid polyketides by heterologous expression of the naphthocyclinone aromatase and hydroxylase genes from *Streptomyces arenae* // Proc. of the 11th Int. Symp. on Biol. of Actinomycetes (Crete-Greece, October 24—28 1999).—Sissi-Heraklion, 1999.—P. 85.
 51. Kantola J., Kunnari T., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K., Mantsala P. Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. // Microbiology.—2000.—146.—P. 155—163.
 52. Quiros L. M., Carbajo R. J., Brana A. F., Salas J. A. Glycosylation of macrolide antibiotics. Purification and kinetic studies of a macrolide glycosyltransferase from *Streptomyces antibioticus* // J. Biol. Chem.—2000.—275, N 16.—P. 11713—11720.
 53. Gaisser S., Doumith M., Olano C. *In vivo* expression of glycosyltransferases in *Saccharopolyspora erythraea* // Proc. of the 11th Int. Symp. on Biol. of Actinomycetes (Crete-Greece, October 24—28 1999).—Sissi-Heraklion, 1999.—P. 186.
 54. Gaisser S., Leadlay P. F. Sugaring the pill by design // Nat. Biotech.—1998.—16.—P. 1—4.
 55. Patallo E. P., Blanco G., Fischer C., Brana A., Rohr J., Mendez C., Salas J. A. Deoxysugar methylation during biosynthesis of the antitumor polyketide elloramycin by *Streptomyces olivaceus*. Characterization of three methyltransferase genes // J. Biol. Chem.—2001.—276, N 22.—P. 18765—18774.
 56. Федоренко В. О., Басілія Л. І., Панькевич К. О., Дубицька Л. П., Осташ Б. О., Лужецький А. М., Громико О. М., Крюгель Г. Генетичний контроль біосинтезу актиноміцетинами протипракових антибіотиків-полікетидів // Бюл. Ін-ту с.-г. мікробіології.—2000.—8.—С. 27—31.

УДК 576.8.095.382

Надійшла до редакції 09.07.01