

Конструювання штамів *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 з підвищеною здатністю перетворювати даунорубіцин в доксорубіцин

Л. П. Дубицька, В. О. Федоренко

Львівський державний медичний університет ім. Данила Галицького
Вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна

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

Гени *srx* та *dnrI* (кодують Р-450-вмісний фермент, що гідрокслює даунорубіцин (DNR) з утворенням доксорубіцину (DXR), та позитивний активатор транскрипції) *S. griseus* під сильним промотором гена стійкості до норзіотрицину *nat S. poursei* в складі мультікопійної плазмиди *pJ486* клонувано в штами *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 та *S. lividans* ТК 24. 48-год культури штамів 27952-2 *pJ486dnrIcpx⁺*, ТК 24 *pJ486dnrIcpx⁺* та DNR^r-мутанти штаму 27952-2 (з підвищеним синтезом DXR) утворювали DXR з доданого DNR. У 27952-2 *pJ486dnrIcpx⁺* зростає синтез антрациклінів, DNR та DXR. Проте ефективність перетворення та концентрація Р-450-вмісного ферменту найвищі серед DNR^r-мутантів. Стійкість DNR^r-мутантів до DNR зумовлена не лише функціонуванням генів резистентності, але й ферментативним перетворенням більш токсичної для штаму сполуки DNR в менш токсичну DXR. Це дозволяє отримувати більш дорогий та терапевтично цінніший антибіотик DXR з його попередника (DNR).

Вступ. Даунорубіцин (DNR) та доксорубіцин (DXR) — важливі протипухлинні антибіотики, що продукуються штамми актиноміцетів і широко використовуються в хіміотерапії злоякісних новоутворень людини. Проте DXR менш токсичний для клітин ссавців і знайшов ширше застосування в клініці [1]. Його можна розглядати і як вихідний матеріал для створення нових, ефективних напівсинтетичних протипухлинних антибіотиків [2—4]. Тому існує необхідність у розробці методів конструювання і селекції штамів з підвищеним біосинтезом DXR. Високий рівень продукції антибіотика зумовлений не лише експресією генів його біосинтезу, а й значно залежить від генів резистентності до власного антибіотика [5, 6]. Раніше показано [7], що в мутантів *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 з підвищеною стійкістю до

DNR та DXR зростає біосинтез цих антибіотиків.

Підвищення рівня біосинтезу антрациклінів можна досягти і за рахунок конструювання рекомбінантних штамів. Так, наприклад, у *S. peucetius* ATCC 29050 з нокаутом гена *dnrU*, що кодує TDP-4-кето-6-дезоксиглюкозо-3(5)-епімеразу, зростає синтез DXR [8]. Штами *S. peucetius* ATCC 29050, які несуть у складі багатокопійної плазмиди ген карміноміцин-4-О-метилтрансферази, утворюють DNR із доданого карміноміцину [9]. Відомо, що активність DoxA забезпечує С-14 гідрокслювання DNR з утворенням DXR [20]. *S. lividans* ТК 24 з клонуванням у складі мультікопійної плазмиди геном *doxA* (кодує Р-450-вмісний фермент, що гідрокслює DNR з утворенням DXR) утворюють DXR з доданого DNR [10, 11]. Тим не менше, деякі штами (*S. species* C5, *S. peucetius* ATCC 29050 та ін.) не синтезують DXR, хоча й містять ген *doxA* [11].

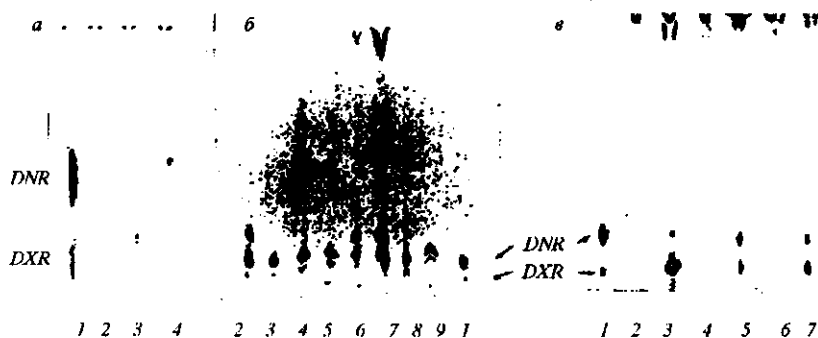


Рис. 1. Хроматографічне розділення антрациклінових сполук вихідного штаму (а), DNR^f - (б) та DXR^f - (в) мутантів без та після додавання DNR до 48-год культур цих штамів (1 — маркери DNR і DXR); а: 2 — штам 27952-2; 3 — штам 27952-2 + DXR; 4 — 27952-2 + DNR; б: 2 — dnr100; 3 — dnr100 + DNR; 4 — dnr2042; 5 — dnr2042 + DNR; 6 — dnr2043; 7 — dnr2043 + DNR; в: 2 — dxr108; 3 — dxr2025; 4 — dxr109; 5 — dxr1010; 6 — dxr303; 7 — dxr503; 8 — dxr5015; 9 — dxr504 (всі з додаванням DNR)

Мета даної роботи полягала в отриманні штамів *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2, здатних до ефективного перетворення DNR у DXR.

Матеріали і методи. В роботі використано штами *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 (отриманий з колекції культур РНЦА (Москва)) та модельний штам *S. lividans* TK 24. Морфологічний варіант штаму 27952-2, який характеризується сірим забарвленням повітряного міцелію та його резистентні мутанти, отримано автором [7].

Для одержання спор штами вирощували на середовищі Чапека або вівсяному середовищі [12], а для визначення вмісту антибіотиків — у кукурудзяному середовищі [12]. Для регенерації протопласти висівали на середовище R2YE [13]. Трансформацію протопластів плазмідною ДНК проводили за методикою, описаною в роботі [13].

Синтезовані антрацикліни з агаризованого середовища екстрагували сумішшю $CHCl_3:CH_3OH$ (9:1), а з рідкого — $CHCl_3:CH_3COOH:C_2H_5OH:H_2O$ (80:20:16:6). Антрациклінові сполуки розділяли методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелевих пластинках Silufol (Чехія) у системі розчинників $CHCl_3:CH_3COOH:C_2H_5OH:H_2O$ (80:20:16:6) [14, 15]. Як стандарт використовували чисті DNR («Бринцалов», Росія), DXR («Ebeva», Австрія) та 13-дигідроаунорубіцин (13-DHD), отриманий від д-ра. Г. Крюгеля (Інститут дослідження природних сполук, Йена, ФРН).

Сумарний вміст антрациклінових сполук, DNR та DXR у міцелії визначали за методом, описаним раніше [7, 14, 15]. Визначення концентрації P-450-вмісного ферменту (С-14 монооксигенази) здійснювали у 48-год культурах штамів за методикою [16]. Вміст білка у міцелії штамів визначали за методом Лоурі [17].

Виділення та розщеплення препаратів сумарної ДНК проводили за методикою, описаною в [12].

Фрагменти ДНК розділяли за допомогою електрофорезу в 0,7 %-му агарозному гелі [18].

Наведені результати отримано щонайменше у двох незалежних експериментах, визначено тричі та представлено середніми величинами.

Результати і обговорення. Результати, отримані нами раніше [7], дозволили припустити, що DNR^f -мутанти набувають підвищеної стійкості до DNR не лише за рахунок функціонування власне генів резистентності до антрациклінів [4, 19], але й внаслідок активації ферментативної конверсії більш токсичної для штаму сполуки (DNR) в менш для нього токсичну (DXR).

Вихідний штам та вісім із дев'яти досліджуваних DXR^f мутантів протягом 96 год інкубації не спричинювали конвертації DNR у DXR (рис. 1). Однак 48-год культури DNR^f -мутантів утворювали 17,3—26,0 мкг/мл DXR з 30 мкг/мл DNR (рис. 1, таблиця). Концентрація DoxA (P-450-вмісний фермент, який каталізує перетворення DNR у DXR [20]) у цих штамів в 5,4—36,0 разів вища, ніж у вихідному штамі. Хоча рівень синтезу DNR та DXR у DXR^f мутантів вищий, ніж у 27952-2 [7], концентрація DoxA зростала в 3,6 разу лише в мутанта dxr1010.

Від 100 до 123 клонів кожного з чотирьох DNR^f -мутантів перевірено на стабільність збереження стійкості до DNR. Клоні, чутливі до DNR у концентрації 20 мкг/мл, виникали з частотою $2,2 \cdot 10^{-3}$ — $9,6 \cdot 10^{-4}$. У 14 таких ревертантів досліджено здатність утворювати DXR з DNR і виявлено, що кількість утвореного DXR у них знижується на 24,2—68,3 % порівняно з вихідними мутантами. Зростання концентрації DXR у клітинах міцелію пригнічує активність DoxA і синтез DNR [20]. Тому експорт DXR важливий не лише для забезпечення стійкості, але й для підтримання активності DoxA та продовження синтезу DXR.

Рівень синтезу антрациклінів, даунорубіцину та доксорубіцину, ефективність перетворення даунорубіцину в доксорубіцин та вміст цитохром-Р-450-вмісного ферменту в *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 і *S. lividans* TK 24 та їхніх похідних

Штам	Вміст антибіотика, мкг/мг білка			Перетворення за 48 год DNR у DXR, %	Концентрація Р-450-вмісного ферменту, нмоль/мг білка
	Антрацикліни	DNR	DXR		
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i> 27952-2	11,3±3,4	1,5±1,2	2,4±1,1	0	6,1±1,3
dnr100	15,7±6,3	0	10,0±2,3	93,4±4,2	219,8±8,7
dnr101	12,9±4,6	0	8,1±2,6	86,5±2,3	122,1±6,3
dnr2042	21,8±7,8	5,4±1,95	12,6±3,0	57,7±3,4	33,0±3,4
dnr2043	102,9±10,4	14,2±3,1	45,1±4,9	82,0±1,1	109,4±4,3
dxr1010	62,4±4,9	15,7±6,2	26,1±7,4	36,5±2,7	21,9±4,1
dxr2025	13,6±4,6	15,6±1,3	3,8±0,9	0	7,85±1,7
27952-2 pIJ486 ⁺ -1	17,4±2,5	2,0±0,9	3,4±2,1	0	7,2±2,4
27952-2 pIJ486 ⁺ -2	12,0±4,6	2,0±0,8	4,09±1,2	0	6,5±1,2
27952-2 pIJ486 ⁺ -3	20,0±2,3	3,4±1,4	5,4±4,4	0	8,0±3,7
27952-2 pIJ486dnr1cpx ⁺ -1	44,2±4,2	8,1±0,2	18,3±2,2	36,3±3,6	84,5±4,6
27952-2 pIJ486dnr1cpx ⁺ -2	35,6±2,1	6,8±0,5	15,1±3,3	27,4±2,7	41,2±4,1
27952-2 pIJ486dnr1cpx ⁺ -3	28,7±3,8	7,2±1,3	9,4±1,3	24,0±2,3	39,7±1,8
<i>S. lividans</i> TK 24	0	0	0	0	0
24 pIJ486 ⁺ (vcl)	0	0	0	0	0
24 pIJ486dnr1cpx ⁺ -1	0	0	0	20,2±1,5	18,3±2,4
24 pIJ486dnr1cpx ⁺ -2	0	0	0	20,8±2,3	20,4±1,6
24 pIJ486dnr1cpx ⁺ -3	0	0	0	21,3±1,7	23,8±3,2
24 pIJ486dnr1cpx ⁺ -4	0	0	0	21,8±3,3	27,4±3,7
24 pIJ486dnr1cpx ⁺ -5	0	0	0	22,0±3,5	28,5±5,9

Для вивчення перебудов нуклеотидних послідовностей ДНК проведено електрофоретичний аналіз *Bam*HI фрагментів 23 DNR⁻ та 26 DXR⁻-мутантів штаму 27952-2. ДНК вихідного штаму та DXR⁻ мутантів не відрізняються за картиною розподілу *Bam*HI фрагментів. У той же час в геномі всіх DNR⁻-мутантів виявлено ампліфіковані фрагменти розміром 6 та 7 тис. п. н. У сумарній ДНК штамів, здатних до біотрансформації DNR у DXR, виявлено ампліфікацію розміром 3 тис. п. н. Ці дані, однак, не дозволяють знайти пряму кореляцію між наявністю ідентифікованих перебудов з фенотипом антибіотичної активності та здатністю мутантів перетворювати DNR у DXR.

Можливості генно-інженерного конструювання штамів з підвищеним синтезом DXR вивчали за допомогою трансформації штамів *S. lividans* TK 24 та 27952-2 висококопійною рекомбінантною плазмідною pIJ486dnr1cpx⁺, що несе гени *S. griseus* IMET 3339 *dnrI* (позитивний активатор генів біосинтезу антрациклінів і стійкості до них [21]) та *cpx*

(гомолог *doxA*). Гени *dnrI* та *cpx* у складі фрагмента розміром 4,5 тис. п. н. під сильним промотором гена стійкості до норзіотрицину *nat* *S. noursei* вбудовані в сайт *Eco*RI полілінкера мультікопійної плазміди pIJ486 (рис. 2).

У 27952-2 pIJ486 трансформантів зростала кількість антрациклінових сполук (в 1,1—1,8 разу), DNR (в 1,3—2,3 разу) та DXR (в 1,4—2,3 разу) порівняно з синтезом цих сполук у вихідному штамі (таблиця). Зростання синтезу DNR після трансформації штаму *S. peucetius* ATCC 29050 висококопійними плазмідами виявлено також авторами [21]. Подібні ефекти описано і для тилозин-продукуючого штаму *S. fradiae* [22].

У 27952-2 pIJ486dnr1cpx⁺ трансформантів рівні синтезу антрациклінів, DNR та DXR вищі відповідно в 2,5—3,9; 4,5—5,4 та 3,9—7,6 разу, порівняно з синтезом цих сполук штамом 27952-2. А кількість синтезованого DXR у таких штамів в 1,3—2,3 разу перевищує кількість синтезованого DNR.

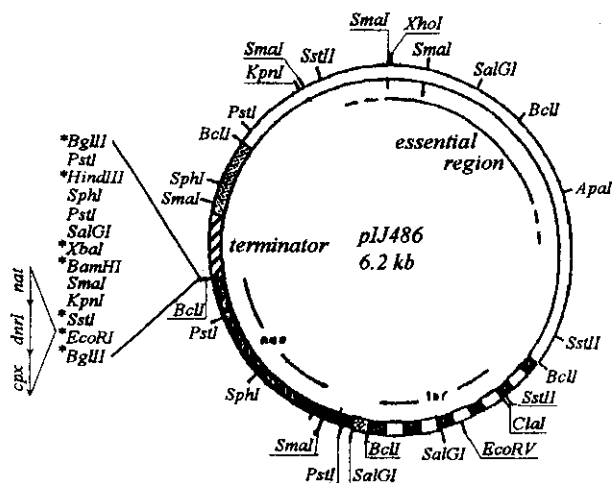


Рис. 2. Рестрикційна карта плазмиди *pIJ486*, у сайт рестрикції *EcoRI* якої введені гени *dnrI* та *cpx* *S. griseus* (MET 3339, а також промотор гена стійкості до норзіотрицину *nat* *S. noursei*

Штами 24 *pIJ486dnrcpx⁺* та 27952-2 *pIJ486-dnrIcpx⁺*, вік яких становить 48 год, на відміну від вихідних штамів та їхніх *pIJ486* трансформантів перетворюють відповідно 20,2—22,0 % та 24,0—36,3 % доданого DNR (10 мкг/мл) у DXR (таблиця). Концентрація Срх у 27952-2 *pIJ486dnrcpx⁺* зростала в 6,5—13,9 рази і суттєво не змінювалася у 27952-2 *pIJ486* порівняно з вихідним штамом. У штаму 24 та його *pIJ486* трансформантів не виявлено даного ферменту, тоді як його кількість у 24 *pIJ486dnrcpx⁺* становила 18,3—28,5 нмоль/мг білка. Раніше описано, що ген *dnrI*, клонований в складі багатокопійного вектора в штам *S. peucetius* ATCC 29050, спричинює зростання рівня синтезу антрациклінів та DNR [21]. Проте зростання синтезу DXR, очевидно, обумовлене функціонуванням генів *dnrI* та *cpx*, а здатність утворювати DXR з DNR — *cpx* [20].

Висновки. Отримані дані свідчать про можливість використання методу клонування генів *dnrI* та *cpx* для удосконалення штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 щодо підвищення синтезу DXR. У свою чергу, підвищена резистентність до DNR може бути зумовлена не лише генами резистентності до цього антибіотика, але й за рахунок генів біосинтезу, продукти яких перетворюють більш токсичну сполуку DNR в менш токсичну DXR. Це дозволяє отримувати цінний у терапевтичному відношенні та комерційно дорожчий антибіотик DXR з його попередника DNR. Тому даний метод також дозволяє розширити можливості

використання отриманих рекомбінантних штамів та DNR'-мутантів. Однак кількість синтезованого [7] та утвореного DXR з доданого DNR є найвищими серед DNR'-мутантів. Це свідчить про перспективність використання DNR'-мутантів для селекції штамів з високим рівнем синтезу DXR та здатних до утворення DXR з доданого DNR.

L. P. Dubitska, V. O. Fedorenko

Construction and selection strains *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ACC 27952-2 with elevated DXR production

Summary

Genes *cpx* and *dnrI* (encode P-450 enzyme that hydroxylize daunorubicin (DNR) converting it to doxorubicin (DXR) and transcription activator, respectively) leukaetomycin biosynthesis gene cluster of *S. griseus* were cloned in multicopy *pIJ486* under control of strong promoter *nat* (from noursei resistance gene *noursei*) and introduced into strains *S. peucetius* subsp. *caesius* ACC 27952-2 a TK24. 48-hours old cultures of strains 27952-2 (*pIJ486cpx dnrI*), TK24 (*pIJ486cpx dnrI* DNRr-mutants of strain 27952-2 synthesize DXR from exogenously added DNR. In s 27952-2 *pIJ486cpx dnrI* production of antracyclines, DNR and DXR was increased. Although quantity of converted DNR and concentration of P-450 hydroxylase was highest in DNRr-mutants of strain 27952-2. Thus, resistance of DNRr-mutants to DNR depends not only on functioning of *res* gene but also on conversion of more toxic for given strain compound (DNR) to l (DXR). It allows to obtain more valuable antibiotic from its intermediate.

Л. П. Дубицкая, В. А. Федоренко

Конструирование штаммов *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 с повышенной способностью превращать даунорубицин в доксорубицин

Резюме

Гены *cpx* и *dnrI* (кодируют P-450-содержащий фермент, гидроксилирующий даунорубицин (DNR) с образованием доксорубицина (DXR), и активатор транскрипции) *S. griseus* под сильным промотором гена устойчивости к норзиотрицину *nat* *S. noursei* в составе мультикопийной плазмиды *pIJ 486* клонированы в штаммы *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 и *S. lividans* ТК 24. Штаммы 27952-2 *pIJ486dnrIcpx⁺*, ТК 24 *pIJ486dnrIcpx⁺* и DNR'-мутанты штамма 27952-2 (с повышенной синтезом DXR) образуют DXR из добавленного к 48-ч культурам этих штаммов DNR. У 27952-2 *pIJ486-dnrIcpx⁺* возрастает синтез антрациклинов, DNR и DXR. Однако эффективность превращения DNR в DXR и концентрация P-450-содержащего фермента наивысшие среди DNR'-мутантов. Устойчивость DNR'-мутантов к DNR обусловлена не только функционированием генов резистентности, но и ферментативным превращением более токсичного для штамма соединения DNR в менее токсичное DXR. Это позволяет получать более дорогостоящий и терапевтически ценный антибиотик DXR из его предшественника (DNR).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Булкина З. П. Противоопухолевые препараты.—Киев: Наук. думка, 1991.—304 с.
2. Cabriales S., Bresnahan J., Testa D. Extravasation of liposomal daunorubicin in patient with AIDS-associated Kaposhi's

- sarcoma: a report of four cases // *Oncology*.—N 1.—P. 67—70.
3. Cassinelli G., Arlandini E., Ballabio M., Bordoni T., Geroni C., Giuliani F., Grein A., Merli S., Ribola G. New biosynthetic antracyclines related to barminomycin incorporating barbiturates in their moiety // *J. Antibiot.*—1990.—43, N 1.—P. 19—28.
 4. Hutchinson C. R. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomycin C // *Chem. Rev.*—1997.—97.—P. 2525—2535.
 5. Cramer R., Davies S. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes // *J. Antibiot.*—1986.—39, N 1.—P. 128—135.
 6. Retzlaff L., Mayer G., Beyer S., Ahlert J., Verseck S., Distler J., Piepersbery W. Industrial microorganisms: Basic and applied molecular genetics / Eds R. H. Baltz, G. D. Hegeman, P. L. Skatrud.—Washington: Amer. Soc. Microbiol. Publ., 1993.—P. 183—194.
 7. Дубицька Л. П., Федоренко В. О. Характеристика мутантів *Streptomyces peucetius* subsp. caesius ATCC 27952, стійких до антрациклінових антибіотиків // *Мікробіол. журн.*—2001.—63, № 4.—С. 53—61.
 8. Pat. USA 5955319. Process for preparing doxorubicin / L. Fonstein., S. Otten., C. Hutchinson // Publ. 1999.
 9. Pat. USA 5364781. Process for preparing daunorubicin / C. R. Hutchinson., K. M. Madduri., F. Torti., A. L. Colombo // Publ. 1994.
 10. Pat. USA 592293. Methods of producing doxorubicin / W. R. Strohl., M. L. Dickens., C. R. Desanti // Publ. 1999.
 11. Dickens M. L., Strohl W. R. Isolation and characterization of a gene from *Streptomyces* sp. strain C5 that confers the ability to convert daunorubicin to doxorubicin on *Streptomyces lividans* TK24 // *J. Bacteriol.*—1996.—178, N 11.—P. 3389—3395.
 12. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свеишнікова М. А., Терехова М. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов.—М.: Наука, 1983.—244 с.
 13. Hopwood D. A., Bibb H. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lidiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Schrempf H. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual.—Norwich: The John Innes Fund., 1985.—365 p.
 14. Segura D., Sahtana C., Cosh R., Escalante L., Sanches S. Antracyclines: isolation of overproducing strains by the selection and genetic recombination of putative regulatory mutants of *Streptomyces peucetius* var. caesius // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*—1997.—48.—P. 615—620.
 15. Dornberger K., Stengel C., Miosga N. Thin-layer chromatographic analysis of adriamicinone in fermentation broths // *J. Chromatogr.*—1988.—328.—P. 432—435.
 16. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature // *J. Biol. Chem.*—1964.—239.—P. 2370—2378.
 17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Rendall R. J. Determine total concentration of the protein method of Lowry // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—P. 265—275.
 18. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: методы генетической инженерии.—М.: Мир, 1984.—479 с.
 19. Kaur P. Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peucetius* in *Escherichia coli*: DrrA in on ATP binding protein // *J. Bacteriol.*—1997.—179, N 3.—P. 569—575.
 20. Walczak R. J., Dickens M. L., Priesley N., Strohl W. R. Purification, properties, and characterization of recombinant *Streptomyces* sp. Strain C5 DoxA, a cytochrome P-450 multiple stepin doxorubicin biosynthesis // *J. Bacteriol.*—1999.—181, N 1.—P. 298—304.
 21. Kim J., Otten S., Hutchinson C. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius* // *J. Bacteriol.*—1992.—174, N 1.—P. 144—154.
 22. Seno E. T., Cox K. L. Maintenance of cloned tylosin biosynthetic genes in *S. fradiae* on freely-replicating and integrative plasmid vectors // *J. Cell. Biochem.*—1990.—14A.—P. 93.

УДК 615.33:579.837.71
Надійшла до редакції 12.11.01