

УДК: 575.224+577.21

## ХІМІЯ ТА БІОЛОГІЯ НОГАЛАМІЦИНІВ

Д. Климишин\*\*\*\*, О. Громико\*, Т. Грень\*\*\*\*, О. Німець\*,  
М. Гончар\*\*, В. Федоренко\*

\*Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

\*\*Інститут біології тварин НААН України

вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна

e-mail: dedima@rambler.ru

У статті наведено опубліковані в літературі експериментальні дані щодо досліджень біосинтезу протипухлинного антибіотика ногаламіцину. Узагальнено дані про основні механізми дії, цитотоксичність і протипухлинні властивості цього антибіотика та низки його похідних. Представлено матеріали власних досліджень авторів, пов'язані з вивченням генетичного контролю біосинтезу ногаламіцину та механізмів його регуляції у *Streptomyces nogalater*. Показано перспективність використання окремих генів біосинтезу ногаламіцину з метою їхньої експресії за гетерологічних умов.

**Ключові слова:** протипухлинні антибіотики, *Streptomyces nogalater*, ногаламіцин, 7(R)-O-метилногарол.

*Streptomyces nogalater* є продуцентом протипухлинного антрациклінового антибіотика ногаламіцину [28]. Ногаламіцин (рис. 1) уперше описаний в літературі у 1957 р. Незважаючи на те, що він є активним щодо широкого спектру грампозитивних бактерій, а також до багатьох ліній пухлинних клітин, включаючи клітини L1210 лейкемії, В-16 меланоми та ін., клінічні випробування цієї сполуки ніколи не ініціювалися через високу токсичність препарату. Як представник антрациклінової родини антибіотиків [33] з неординарною будовою та важливими біологічними властивостями, ногаламіцин переважно досліджувався на предмет біологічного механізму дії [28].

У кінці 1960-х років спробами модифікувати молекулу ногаламіцину вдалося одержати невелику кількість продуктів деградації антибіотика, включаючи ногаларол, ногаларен, O-метилногаларол та інші. Проте ці похідні не мали суттєвих переваг над вихідною молекулою і не зазнали подальшої клінічної еволюції. Інтерес до похідних ногаламіцину знову відновився після клінічного успіху доксорубіцину в середині 1970-х років. Одержано понад 60 похідних ногаламіцину, серед яких було виявлено сполуки (зокрема, 7(R)-метилногарол) із покращеними терапевтичними властивостями порівняно з вихідною сполукою [28].

**Структура і хімічний синтез похідних ногаламіцину.** Ногаламіцин переважно одержують шляхом екстракції з

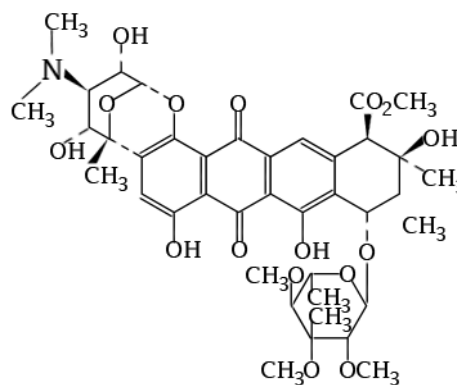


Рис. 1. Структурна формула ногаламіцину.

поживного середовища, на якому росте *S. nogalater* [1, 28, 37], проте також робилися спроби синтезувати цю сполуку хімічним способом [28].

Гідроліз метилового етеру в положенні С–10 ногаламіцину супроводжується окисленням вихідного продукту до дис-ногаламіцинових кислот. При інкубації з N,N-диметилформамідом ця суміш декарбоксілюється, що зумовлює утворення дис-ногаламіцину. Так розрізняють відповідні «ногала»- та «нога»-серії похідних, які відрізняються радикалом у положенні С–10. При дії метанолу (етанолу чи n-пропанолу) на ногаламіцин або дис-ногаламіцин утворюються стереохімічно відмінні пари ізомерів у положенні С–7 [37]. Наприклад, 7-кон-О-метилногарол, у якого метокси-група розташована над площиною ароматичного кільця, має R-конфігурацію, а 7-дис-метилногарол з метокси-групою під площиною ароматичного кільця має S-конфігурацію. Таким чином, усі «дис»-ізомери (похідні ногаламіцину) мають визначати «S»-конфігурацію щодо С–7, а всі «кон»-ізомери – «R»-конфігурацію. Ці ізомери не є рівноцінними і значно відрізняються за біологічною дією та біохімічними властивостями [28, 37, 38].

Сьогодні отримано понад 60 похідних ногаламіцину й описані їхня структура та методи одержання [38]. Однак подальшу біохімічну та біологічну оцінку одержали тільки похідні, що виявили протипухлинну дію.

**Протипухлинна активність окремих похідних ногаламіцину та їхня цитотоксичність.** На основі структурних характеристик і біологічної активності проведено порівняння протипухлинних властивостей окремих похідних ногаламіцину [28, 37]. Порівнюючи ногаламіцин і його найбільш споріднені похідні – ногаламіцинову кислоту та (S)-ногаміцин, – встановили, що ногаламіцинова кислота є менш ефективною щодо L1210 лейкемії, а (S)-ногаміцин ефективніший щодо B16 меланоми, P388 та L1210 лейкемії порівняно з вихідною молекулою. (S)-ногаміцин не набув широкого застосування у медичній практиці, оскільки його важко очистити від (R)-ногаміцину [28].

Серед продуктів деградації ногаламіцину та (S)-ногаміцину найбільш цікавими є 7(S)- та 7(R)-О-метилногаларол і 7(S)- та 7(R)-О-метилногарол. Ці сполуки з «R»-конфігурацією є більш ефективними щодо P388 лейкемії, ніж їхні «S»-ізомери, хоча така відмінність не спостерігалась у протипухлинній дії на клітини лінії B16 меланоми [38]. Серед усіх тестованих похідних ногаламіцину лише 7(R)-О-метилногарол (меногарил) проявив найвищу активність щодо трьох типів клітин пухлинних ліній, тому цей препарат було обрано для подальших досліджень і клінічної оцінки [22, 28].

З метою оцінки цитотоксичності ногаламіцину та його похідних використано два методи досліджень. Лі та співавтори встановили інгібуючий вплив на ріст клітин лейкемії L1210 при інкубуванні культури клітин із досліджуваним препаратом упродовж 3 год при 37°C, а Б'ян і співавтори, аналізуючи колонієутворювальну здатність клітин, виявили летальний вплив препаратів на клітини ліній L1210 лейкемії та B16 меланоми. За допомогою цих підходів встановлено, що серед похідних, які містять ногалозу, (S)-ногаламіцинова кислота є найменш цитотоксичною порівняно з ногаламіцином і (S)-ногаміцином. Послідовність інгібування росту тестованих ліній є такою: ногаламіцин > (S)-ногаміцин >> (S)-ногаламіцинова кислота, що безпосередньо пов'язано з оптимальною дозою для лікування пухлин *in vivo* [28, 37, 38].

Дослідження продуктів деградації ногаламіцину показали, що 7(R)-О-метилногаларол та всі 7(R)-О-алкілногароли є цитотоксичнішими щодо пухлинних ліній, ніж їхні відповідні «S»-ізомери. 7(R)-О-метилногаларол проявляє найбільшу цитотоксичність з-поміж усіх похідних ногаламіцину, які тестували на цих культурах ракових клітин.

Цей препарат виявився найбільш ефективним щодо ліній L1210 та B388 лейкемії *in vivo*. Б'ян і співавтори також виявили, що ногаламіцин, (S)-ногаміцин та 7(R)-О-метилногаларол проявляють більшою мірою цитотоксичний вплив на клітини, які перебувають у експоненціальній фазі росту [28]. Оге та співавтори показали, що меногарол є активним щодо клітин лінії K562 лейкемії людини, стійких до високих концентрацій доксорубіцину [28]. Пухлини молочної залози лінії MCF-7, що також є стійкими до високих концентрацій цього антибіотика, виявилися чутливими до меногарилу [38]. З'ясувалося, що така стійкість не залежить від глікопротеїн-залежних транспортних систем. Зокрема, це підтверджує факт відсутності різниці у проникненні та накопиченні меногарилу в резистентних і чутливих клітинах лінії MCF-7. Однак меногарил зумовлює двократне зниження вільних радикалів кисню в резистентних клітинах порівняно з чутливими. Оскільки стійкі клітини містять у 12 разів вищу активність глутатіонпероксидази, ніж клітини вихідних ліній, детоксикація пероксиду водню може зумовлювати зменшення вільних радикалів, отже, може відігравати важливу роль у стійкості клітин до меногарилу. Сьогодні 7(R)-О-метилногаларол використовується у хіміотерапії ракових захворювань і є одним із найефективніших антрациклінових препаратів, що застосовуються у медицині [28].

У досліджах з урахуванням фаз росту і клітинного циклу [28, 37, 38] показано, що ногаламіцин, (S)-ногаміцин, 7(R)-О-метилногаларол та 7(R)-О-метилногарол проявляють летальну дію на клітини, які перебувають у різних фазах росту, тому ці препарати не є фазоспецифічними. Вплив 7(R)-О-метилногаролу дещо відрізнявся порівняно з іншими препаратами, оскільки цей похідний ногаламіцину є летальнішим для клітин у ранній G<sub>1</sub>, S та G<sub>2</sub> фазах. Клітини, що перебувають у середині чи наприкінці періоду G<sub>1</sub>, виявилися стійкішими до цього препарату [20, 38].

Досліджено взаємозв'язок між цитотоксичністю, внутрішньоклітинним проникненням і локалізацією в клітинах ногаламіцину й окремими його похідними [28]. У роботах Крішана з використанням лазерного цитометра для збудження внутрішньоклітинної флуоресценції у клітинах, оброблених ногаламіцином, показано, що найвища флуоресценція спостерігається після 60 хв інкубації, а 10-кратне зростання концентрації препарату збільшує флуоресценцію вдвічі [37]. Сгоріним і співавторами встановлено, що після обробки клітин ногаламіцином та його похідними відбувається значне накопичення цих препаратів у цитоплазмі [38]. Поглинання 7(R)-О-метилногаролу є пропорційним щодо його позаклітинної концентрації та ця сполука акумулюється в цитоплазмі більшості клітин лінії V16 меланоми. Летальність клітин пропорційна збільшенню внутрішньоклітинної концентрації препарату до 0,04 мкг/10<sup>6</sup> клітин. У подальших дослідженнях виявлено, що клітини в експоненціальній фазі росту не лише акумулюють більше 7(R)-О-метилногаролу, але і є чутливішими щодо його дії [28].

**Механізм дії ногаламіцину та його похідних.** Ногаламіцин інгібує синтез РНК значно активніше, ніж синтез білків і ДНК у різних біологічних системах, включаючи клітини карциноми людини та клітини лейкемії лінії L1210. У цих системах ногаламіцин інгібує синтез нуклеїнових кислот у такій послідовності: р-РНК > т-РНК > м-РНК > ДНК.

Сентенак і співавтори встановили, що ногаламіцин інгібує синтез РНК на стадії елонгації [28]. Цей антибіотик інгібує активність ДНК-залежної РНК-полімерази клітин лейкемії лінії L1210 ефективніше (>5 разів), ніж їхню ДНК-полімеразну активність і однаково пригнічує активність цих ферментів у *Escherichia coli* [28, 37, 38]. Ногаламіцин також інгібує дві з трьох ДНК-залежних РНК-полімераз, виділених із клітин саркоми-180. Зокрема, встановлено, що РНК-полімераза I є чутливішою щодо ногаламіцину, ніж РНК-полімераза III [28, 37, 38].

Лі та співавтори провели порівняльний аналіз ногаламіцину й окремих його похідних для вивчення зв'язку між здатністю зв'язувати ДНК, біохімічними властивостями і біологічною активністю [28]. Так, за винятком 7(R)-О-метилногаролу, ногаламіцин і його похідні ефективніше інгібують синтез РНК, ніж ДНК, а синтез білків цими сполуками інгібуються найменше. Серед трьох препаратів, які містять ногалозу, ногаламіцин і (S)-ногаламіцин, проявляють відносно однаковий інгібуючий вплив на ріст клітин лейкемії лінії L1210. Концентрації цих сполук, необхідні для 50% інгібування синтезу РНК, виявилися ідентичними таким, які необхідні для 50% інгібування росту досліджуваних клітин. Вищезазначені результати вказують на те, що сполуки, які містять ногалозу, взаємодіють із ДНК, що призводить до гальмування транскрипції та в результаті інгібування клітинного росту спричиняють загибель клітин.

Менш дослідженими є властивості 7-О-алкіл-похідних ногаламіцину. Хоча S- та R-ізомери відрізняються лише за конфігурацією, проте помітною є відмінність їхньої біологічної активності, біохімічного впливу та фізико-хімічних властивостей. Встановлено, що всі без винятку 7(R)-О-алкіл-похідні активніші щодо росту клітин лейкемії лінії L1210, ніж їхні S-ізомери. Ступінь інгібуючого впливу продуктів деградації ногаламіцину на синтез ДНК і РНК корелює із їхньою здатністю взаємодіяти з цими молекулами. Дослідження показали, що 7(R)-О-метилногарол є найбільш цитотоксичним серед усіх використаних похідних. При концентрації 25 мкг/мл ця сполука інгібуює на 30% синтез як ДНК, так і РНК, а при концентрації 0,1 мкг/мл інгібуює на 90% ріст досліджуваних клітин. Вірзба та співавтори виявили, що 7(R)-О-метилногарол локалізований у цитоплазмі й інгібуює початковий рівень полімеризації тубуліну, що також може сприяти цитотоксичності цього препарату [28, 37].

**Генетичний контроль біосинтезу ногаламіцину в *S. nogalater*.** За допомогою молекулярно-генетичних досліджень ідентифіковано гени, що задіяні у біосинтезі ногаламіцину в *S. nogalater*. Загалом виявлено тридцять три структурних, один регуляторний і один ген резистентності до власного антибіотика та його попередників, що формують кластер розміром понад 38 т.п.н. Функції більшості з досліджених генів встановлено переважно за допомогою біоінформаційного аналізу [7–9, 34–36].

Спочатку гени, задіяні у біосинтезі ногаламіцину, було клоновано за гомологією з геном *actI-ORF1*, що кодує  $\alpha$ -субодиницю кетосинтази у біосинтезі актинородину [36]. Участь цих генів у біосинтезі ногаламіцину доведено за допомогою їхньої експресії за гетерологічних умов. Для цього клоновані фрагменти ДНК секвеновано й охарактеризовано шляхом комплементачії мутантів за генами біосинтезу аклациноміцину А та даунорубіцину в *S. galilaeus* і *S. peucetius*, відповідно. Вибір цих штамів зумовлений подібністю будови антибіотиків, а також шляхів їхнього біосинтезу. Комплементачія цих мутацій допомогла встановити гіпотетичну схему біосинтезу ногаламіцину (рис. 2).

На рис. 3 наведено схему кластера генів, які кодують ферменти, задіяні в біосинтезі ногаламіцину. Як видно з рисунка, з 35 генів біосинтезу ногаламіцину 17 імовірно задіяні у біосинтезі цукрів молекули ногаламіцину, 11 – у біосинтезі аглікону, 1 є регуляторним геном та 1 – геном стійкості. Функція ще 5 генів залишається невідомою [34].

На основі аналізу нуклеотидних послідовностей, що містяться поруч із кластером генів біосинтезу ногаламіцину, було встановлено, що ген *snogM* є лівою, а *snorO* – правою межами кластера. У складі цих ділянок виявлено окремі гени, задіяні в первинному метаболізмі та розташовані за межами кластера. Відкрита рамка зчитування (ORF), розміщена поруч із *snogM*, подібна до гена g-глутамілтрансферази *S. coelicolor* (гомологія

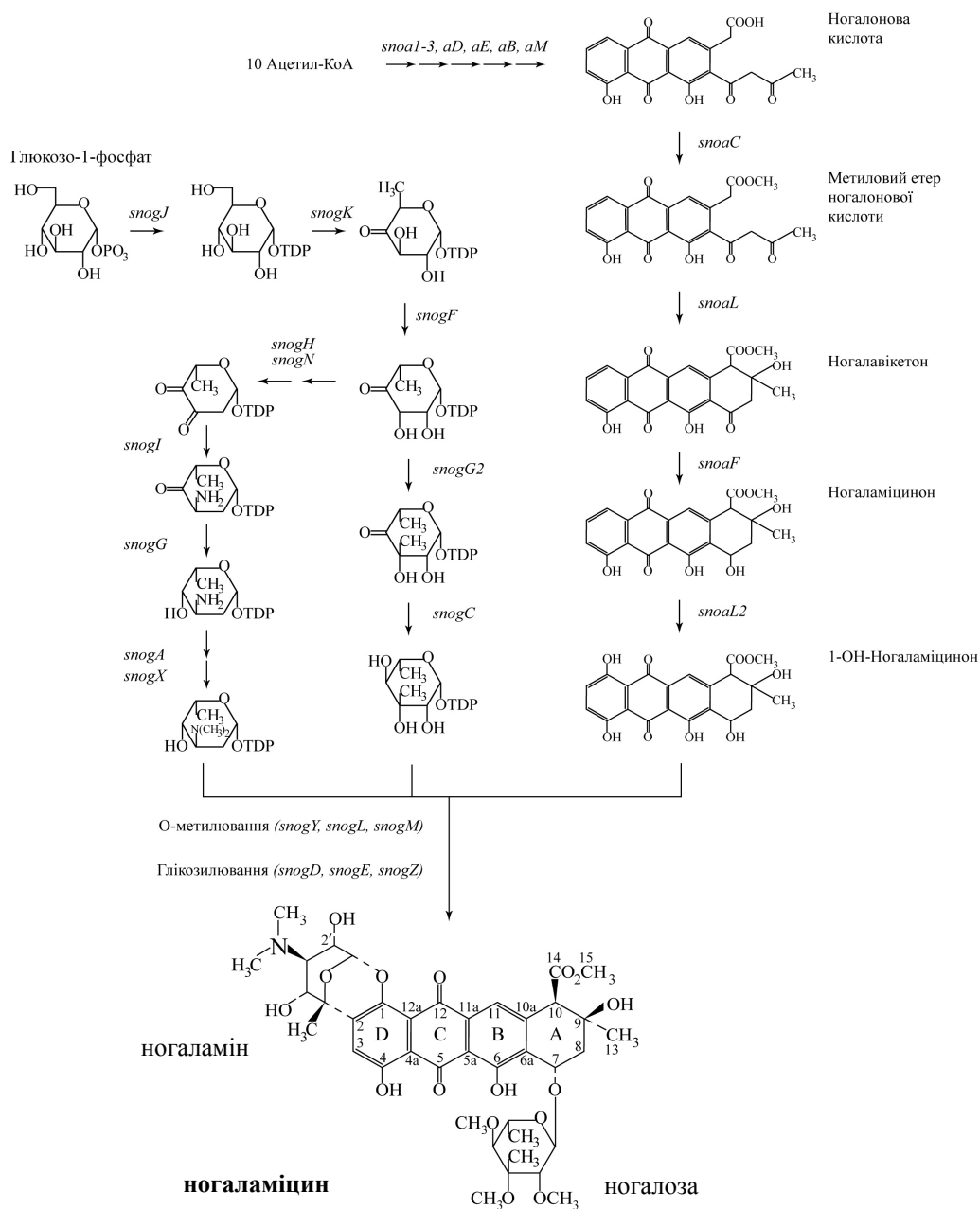
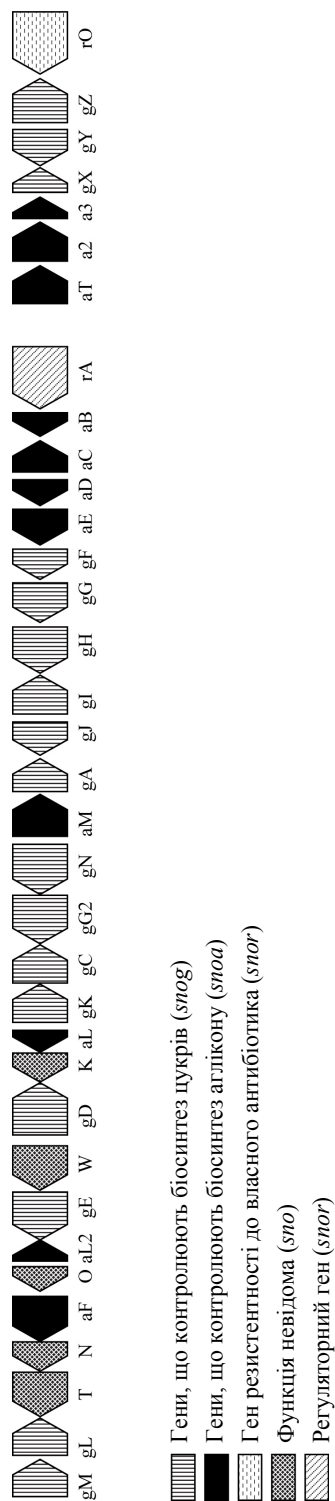


Рис. 2. Гіпотетична схема біосинтезу ноголамцину [34].

нуклеотидних послідовностей становить 82%), а ген, що межує зі *snorO*, подібний до ORF ліпопротеїнілази *S. coelicolor* (гомологія – 92%) [34].

Для синтезу полікетидної частини молекули ноголамцину *S. nogalater* використовується стартова молекула ацетил-S-КоА. У реакції конденсації 10 молекул ацетил-S-



- Гени, що контролюють біосинтез цукрів (*snog*)
- Гени, що контролюють біосинтез аглікону (*soa*)
- Ген резистентності до власного антибіотику (*spo*)
- Функція невідома (*spo*)
- Регуляторний ген (*snor*)

Рис. 3. Організація кластера генів біосинтезу ногаламіцину [34].

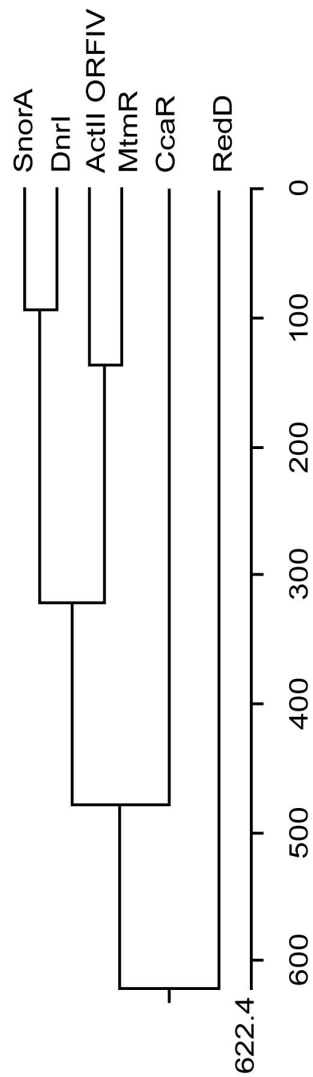


Рис. 4. Філогенетичне дерево, побудоване на основі порівняння SnorA з амінокислотними послідовностями шлях-специфічних регуляторів, задіяних у біосинтезі антибіотиків. DnrI, задіяного у біосинтезі даунорубіцину у *S. peuceitius*, ActII-ORF IV – у біосинтезі актиноорубіцину у *S. coelicolor*, MtmR – у біосинтезі мітраміцину у *S. argillaceus*, CsaR – у біосинтезі клавулонової кислоти у *S. clavuligerus*, RedD – у біосинтезі ундецилпродигітозину у *S. coelicolor* [8].

-КоА утворюється полікетид, коротший від того, що використовується для біосинтезу даунорубіцину [6, 34].

За формування лінійної структури полікетидного ланцюга ногаламіцину відповідають продукти генів *snoa1*, 2 та 3. Продуктом гена *snoa1* є кетосинтаза (430 а.к.з.), що також володіє й ацилтрансферазною активністю, і подібна до кетоацилсинтаз, виявлених у кластерах більшості полікетидних антибіотиків. Довжина полікетидного ланцюга визначається *snoa2*, що кодує білок із 409 а.к.з. Гомологія між *Snoa1* та *Snoa2* становить 50%, що є характерним для полікетидсинтаз II-типу у *Streptomyces*. У кластері генів біосинтезу ногаламіцину поруч з генами *snoa1* та *snoa2*, на відстані 59 п.н., виявлено ген *snoa3*. Продуктом цього гена є ацилпереносний білок (АПБ) [36].

У кластері генів біосинтезу ногаламіцину між генами *snoa1* та *snoaB* ідентифіковано *ORF*, позначену як *snorA*, 1995 п.н. завдовжки, що кодує білок розміром 665 а.к.з [36]. Порівняння ймовірного продукту трансляції *snorA* з амінокислотними послідовностями, наявними в електронних базах даних GenBank [14], вказують на високу подібність (більше 80%) білка *SnorA* до шлях-специфічних регуляторів, що належать до родини SARP (від англ. *Streptomyces antibiotics regulator protein*), ідентифікованих у кластерах генів біосинтезу інших полікетидних антибіотиків [8, 9, 19]. Більшість представників родини SARP належать до класу позитивних регуляторів біосинтезу вторинних метаболітів, тобто активують транскрипцію структурних генів синтезу цих сполук у актиномицетів. Множинне порівняння цих білків вказує на спорідненість продуктів трансляції, що кодуються генами регуляторів біосинтезу антибіотиків – із різних кластерів генів синтезу полікетидів такими як *DnrI* [27], задіяним у біосинтезі даунорубіцину у *S. peucetius*, *ActII-ORF IV* [15] – актинородину у *S. coelicolor*, *MtmR* [29] – мітраміцину у *S. argillaceus*, *CsaR* [18] – клавулонової кислоти у *S. clavuligerus* (рис. 4). У низці досліджень [12, 15–18, 21, 30, 31] доведено, що присутність додаткових копій цих генів у вищеперелічених продуцентів приводить до помітного зростання синтезу антибіотиків порівняно зі штамми дикого типу. Спрямована інактивація генів *dnrI* [27], *actII-orfIV* [15], *mtmR* [29], *redD* [17] та *ccaR* [18], навпаки, була причиною втрати синтезу цих антибіотиків. Такі результати вказують на те, що продукти цих генів задіяні у позитивній регуляції синтезу антибіотиків.

Для встановлення конкретної ролі продукту гена *snorA* у біосинтезі ногаламіцину було проведено спрямовану інактивацію цього гена у хромосомі штаму *S. nogalater* IMET43360, шляхом його заміщення на мутантний алель гена стійкості до спектиномицину і стрептоміцину (*aadA*) [25]. Отриманий “нокаутний” штам не синтезував ногаламіцин і його попередники, що вказувало на ключову роль *snorA* у генетичному контролі біосинтезу ногаламіцину [3, 8, 9].

Ген *snorA* транскрибується у протилежному напрямку до генів мінімальної ПКС і розділений від них АТ-багатою ділянкою. Загальний ГЦ-склад, виявлений у кластері, становить 71%, проте в ділянці між генами *snorA* та *sno1* не перевищує 60%. Базуючись на низькому ГЦ-складі та наявності інвертованих повторів, припускають, що ця ділянка у кластері також може бути задіяна у регуляції біосинтезу антибіотика.

Продукт гена *snoaE* кодує ароматазу. Вважається, що цей білок каталізує утворення насичених зв'язків у першому шестичленному кільці молекули ногаламіцину. Подальшими етапами є С–9 кеторедукція та С–12 оксигенація полікетидного ланцюга, що каталізується продуктами генів *snoaD* і *snoaB*, відповідно. Ген *snoaD* кодує білок із 262 а.к.з., що виявляє гомологію до багатьох кеторедуктаз, ідентифікованих у різних

видів *Streptomyces* [34]. Показано, що мутації в цих генах спричиняють нагромадження 2-ОН антрациклінів [34, 35].

SnoaM є гомологом AknW, задіяного у біосинтезі аклациноміцину, а також DpsY та MtmY, які беруть участь у біосинтезі даунорубіцину і мітраміцину відповідно. Ці білки є полікетидциклазами [13]. Справді, SnoaM кодує полікетидциклазу і каталізує повну циклізацію другого та, можливо, третього кілець інтермедіату, що веде до утворення ногалонної кислоти. Штам *S. peucetius* D2, що містить мутації у генах полікетидциклаз, синтезує серію неправильно циклізованих антрациклінових сполук. Гетерологічна експресія *snoaM* під контролем конститутивного промотора гена стійкості до еритроміцину *ermE* у складі плазміди pSYE66 комплементує відповідну мутацію в цьому штамі, відновлюючи синтез даунорубіцину.

Наступним етапом біосинтезу ногаламіцину є С-метилування ногалонної кислоти. Цей етап каталізується продуктом гена *snoaC*, який перетворює ногалонну кислоту в метиловий етер ногалонної кислоти [34].

Одним із ключових ферментів у біосинтезі ногаламіцину є SnoaL, що каталізує циклізацію останнього, четвертого, кільця ногаламіцинону і відповідає за 9 S конфігурацію молекули ногаламіцину [34, 36]. У біосинтезі ногаламіцину SnoaL перетворює метиловий етер ногалонної кислоти у ногалавікетон. Було показано, що гетерологічна експресія *snoaL* у штамі *S. galilaeus* M18 дала змогу отримувати похідні аклациноміцину, зокрема, 9-епі-аклавінон, з неординарними властивостями. SnoaL є гомологічним до продуктів генів *dauD* і *rdmA*, задіяних у біосинтезі даунорубіцину та родоміцину, відповідно [34].

У подальшому молекула ногалавікетону зазнає кеторедукції в С-7 положенні з утворенням ногаламіцинону, що робить можливим приєднання цукрових залишків до агліконової частини. Ця реакція каталізується продуктом гена *snoaF*, що є гомологічним до С-7 кеторедуктаз, виявлених у *S. galilaeus* (AknU) та *S. peucetius* (DauE). Функція SnoaF у біосинтезі ногаламіцину була встановлена шляхом гетерологічної комплементування AknU мутації у штамі *S. galilaeus* H036. Перетворення аклавікетону в аклавінон завдяки експресії SnoaF у цьому штамі зумовлює нагромадження аклавінонових глікозидів замість аклавікетону – звичного продукту для *S. galilaeus* H036 [34].

С-1 гідроксилювання є важливим етапом для подальшого глікозилування агліконової частини молекули ногаламіцину. Перетворення ногаламіцинону в С-1 ногаламіцинон каталізується С-1 гідроксилазою – продуктом гена *snoaL2*. Функцію SnoaL2 було встановлено шляхом гетерологічної експресії *snoaL2* у складі плазміди pSYE67 в штамі *S. galilaeus* H063, що в нормі нагромаджує аклавінон. Аналіз сполук, одержаних при експресії досліджуваного гена, виділених з H063, встановив наявність ОН-групи в С-1 положенні аклавінону [34, 36].

До складу молекули ногаламіцину входять два цукри – ногаламін і ногалоза. Ногаламін є аміноцукром, приєднаним у С-1 та С-2 положеннях агліконової частини молекули ногаламіцину через О-глікозидний і С-глікозидний зв'язки, відповідно. У С-7 положенні ногаламіцинону приєднана ногалоза – другий цукор у складі ногаламіцину. Найпоширенішою групою цукрів, що виявлені у складі антрациклінових антибіотиків, є 6-дезоксигексози (6-ДОГ). Нині клоновано гени біосинтезу 6-ДОГ багатьох продуцентів антибіотиків, їхні функції досліджено шляхом спрямованого мутагенезу або гетерологічної експресії [11, 16, 23, 24, 32]. Вони перебувають у межах кластеру разом з іншими генами біосинтезу аглікону, але не формують окремого оперона і часто розкидані в ділянці хромосоми завдовжки 10 т.п.н. Деякі з генів біосинтезу 6-ДОГ можуть бути за межами кластерів (гени дегідратази в *Saccharopolyspora erythraea*) [11].



Нині виявлено всі гени біосинтезу цукрів і гени їхнього приєднання до ногаламіцину. Але точна послідовність реакцій, що ведуть до синтезу ногалози та ногаламіну з глюкозо-1-фосфату, з'ясована не повністю. У складі кластера генів біосинтезу ногаламіцину також ідентифіковано три гени, що, ймовірно, кодують глікозилтрансферази – *snogE*, *D* та *Z*. Ці гени клоновано з хромосоми продуцента ногаламіцину та проведено їхню спрямовану інактивацию у хромосомі *S. nogalater* [34]. Аналіз одержаних штамів дасть змогу встановити точну мішень дії даних глікозилтрансфераз у механізмі біосинтезу ногаламіцину.

У складі *sno*-кластера виявлено шість генів імовірних метилтрансфераз [10, 34]. Аналіз амінокислотних послідовностей продуктів цих генів дає змогу припустити, що SnogG2 каталізує С-3 метилювання під час синтезу ногалози, SnogX і SnogA відповідають за приєднання двох метильних груп до аміногрупи, виявленої у С-3 положенні ногаламіну. Цей факт є унікальним, оскільки для більшості інших антибіотиків процес диметилювання аміногрупи каталізується за участі лише одного ферменту (DesVI – метилювання дезозаміну у біосинтезі метиміцину, TuIM – у біосинтезі тилозину) [7]. У процесі синтезу ногалози виявлено ще три імовірні метилтрансферази – SnogM, SnogL та SnogY. Ці ферменти каталізують реакції О-метилювання ногалози. Найближчі гомологи *SnogM*, та *SnogL* виявлено у кластерах генів біосинтезу авермектину і тилозину [7, 34]. Так, білок SnogM (278 а.к.з.) є подібним до AveM, задіяного у 5-О-метилюванні авермектину, тоді як TuIF – гомолог SnogL, каталізує реакцію 3-О-метилювання тилозину. Продукт гена *snogY* є подібним до О-метилювання макроцину й аранціаміцину [7].

Гени *snogM*, *snogL* та *snogY* клоновано з кластера генів біосинтезу ногаламіцину [7, 10, 26]. Ці гени перенесено у штами – продуценти протипухлинних антибіотиків аранціаміцину та доксорубіцину *S. echinatus* DSM40730 і *S. peucetius* subsp. *caesius*. Експресія гена *snogM* у клітинах *S. echinatus* DSM40730 приводила до утворення ним нової сполуки, ймовірно, метилюваного аранціаміцину зі зміненим спектром біологічних активностей [7].

**Селекція штамів *S. nogalater*.** Для продуцента ногаламіцину розроблена система селекції мутантних штамів з підвищеним рівнем синтезу антибіотика [4, 5]. З використанням різних поживних середовищ на основі вівсяної, кукурудзяної та соєвої круп як основних постачальників джерел живлення, досліджено мінливість окремих клонів *S. nogalater* за антибіотичною мінливістю. Оптимальним для росту й оцінки рівня антибіотичної активності цього штаму виявилось соєве середовище [5].

Під час вивчення впливу ультрафіолетового випромінювання (УФ) та N'-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) на виживання *S. nogalater* і антибіотичну активність його похідних виявлено високий рівень стійкості продуцента ногаламіцину до цих мутагенів. Оптимізовані для *S. nogalater* дози УФ і НГ виявились у два-три рази вищими за ті, що використовуються в селекції інших актиноміцетів [4, 5]. Це може бути зумовлене функціонуванням додаткових систем репарації у цьому штамі, як це, наприклад, показано для продукції іншого антрациклінового антибіотика – даунорубіцину *S. peucetius* [6].

Аналіз рівня синтезу ногаламіцину в мутантів, виділених у результаті мутагенної обробки, показав, що рівень синтезу антибіотика в НГ-індукованих похідних *S. nogalater* не відрізнявся від вихідної культури. Натомість близько 80% УФ-індукованих мутантів синтезували ногаламіцин на 30–100% більше, ніж батьківська культура, що вказує на його ефективність у пошуку штамів з підвищеним рівнем синтезу ногаламіцину [5]. Для *S. nogalater* також описано вплив мутацій стійкості до еритроміцину (*Ery<sup>r</sup>*), хлорамфеніколу (*Cml<sup>r</sup>*) та стрептоміцину (*Str<sup>r</sup>*) на рівень синтезу ногаламіцину. Ці анти-

біотики є інгібіторами трансляції та взаємодіють із бактерійними рибосомами. Виділено та вивчено велику кількість мутантів, стійких до перелічених антибіотиків. Серед виділених мутантів виявлено значну частину таких, що перевищують *S. nogalater* за рівнем антибіотичної активності. Показано кореляцію між рівнем стійкості до еритроміцину, хлорамфеніколу, стрептоміцину та рівнем синтезу ногаламіцину в цих мутантів [4, 5].

Таким чином, вивчення біосинтезу ногаламіцину, його механізмів дії на раковій клітині має вагомий практичний і теоретичний інтерес. Це стимулює дослідження усіх аспектів синтезу цього антибіотика та його похідних як *in vivo*, так і *in vitro*. Ця інформація, в першу чергу, становить значний інтерес для генетичного та генно-інженерного конструювання продуцента ногаламіцину. Подальші дослідження механізмів синтезу ногаламіцину дадуть змогу глибше дослідити генетичний контроль його продукції й отримати нові похідні цього антибіотика, що можуть мати важливе клінічне значення.

1. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А. и др. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 248 с.
2. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. М.: Мир, 1988. 538 с.
3. Грень Т., Климишин Д., Федоренко В. Клонування та вивчення гена *snorA* з кластеру генів біосинтезу ногаламіцину у *Streptomyces nogalater* // Биотехнология. Наука. Образование. Практика: IV Міжнар. конф., Дніпропетровськ, 11–13 лист. 2008: тези доп. Дніпропетровськ, 2008. С. 108–109.
4. Громико О., Аравіцька О., Грубський Я., Федоренко В. Отримання та характеристика еритроміцин- і хлорамфенікол-резистентних мутантів продуцента протипухлинного антибіотика ногаламіцину *Streptomyces nogalater* IMET43360 // Наук. вісн. ЛДАВМ ім. С.З. Гжицького. 2005. Т. 7. № 3. С. 18–27.
5. Громико О., Федоренко В. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* IMET43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ногаламіцину // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2005. Вип. 40. С. 16–22.
6. Дубицька Л. П., Федоренко В. О. Конструювання штамів *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952-2 з підвищеною здатністю перетворювати даунорубіцин у доксорубіцин // Біополімери і клітина. 2002. Т. 18. № 2. С. 91–95.
7. Климишин Д., Лужецький А., Громико О. та ін. Клонування та гетерологічна експресія генів О-метилтрансфераз *Streptomyces nogalater* IMET 43360, задіяних у біосинтезі ногаламіцину // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. 2008. Т. 6. № 2. С. 224–232.
8. Климишин Д., Грень Т., Федоренко В. Клонування гена *snorA*, імовірного транскрипційного активатора генів біосинтезу ногаламіцину у *Streptomyces nogalater* // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 50. С. 3–10.
9. Климишин Д., Грень Т., Федоренко В. Конструювання плазмиди рК1139*snorA::aadA* для спрямованої інактивації гена *snorA* у хромосомі *S. nogalater* // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: мат. конф. молодих вчених. Київ, 28–29 трав. 2007: тези доп., 2009. С.18.
10. Мураценко Л., Климишин Д., Лужецький А., Федоренко В. Створення векторів для експресії генів О-метилтрансфераз в гетерологічних умовах // Молодь і поступ біології: IV Міжнар. конф. студентів і аспірантів (Львів, 7-10 квітня 2008 р.). Львів, 2008. С. 140.
11. Остап Б. О., Федоренко В. О. Створення продуцентів нових полікетидних антибіотиків методами генетичної інженерії // Біополімери та клітина. 2002. Т. 18. № 6. С. 467–477.
12. Спосіб отримання штамів *Streptomyces globisporus* з підвищеним рівнем біосинтезу ландоміцинів. Патент UA62200A, МПК7C12N15/00 / Федоренко В.О., Ребець Ю.В., Остап Б.О., Лужецький А.М. Заявл. 24.01.2003; Опубл. 15.12.2003. Бюл. № 12. 10 с.
13. Федоренко В.О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.

14. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acid. Res. 1997. Vol. 25. P. 3389–3402.
15. Arias P., Fernandez-Moreno M. A., Malpartida F. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 6958–6968.
16. Baltz R. H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Trends Microbiol. 1998. Vol. 6. P. 76–83.
17. Bibb M. J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* // Microbiol. 2005. Vol. 8. P. 208–215.
18. 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 Chemother. 2005. Vol. 49. P. 1529–1541.
19. Chater K. F., Bibb M. J. Regulation of bacterial antibiotic production // Biotechnol. 1997. Vol. 7. P. 57–105.
20. Crow R. T., Rosenbaum B., Smith R. et al. A inhibits DNA synthesis and G<sub>1</sub>/S cell cycle progression // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999. Vol. 9. P. 1663–1666.
21. Culebras E., Martinez E., Carnero A., Malpartida F. Cloning and characterization of a regulatory gene of the SARP family and its flanking region from *Streptomyces ambofaciens* // Mol. Gen. Genet. 1999. Vol. 262. P. 730–737.
22. Guilfoile P. G., Hutchinson C. R. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 63. P. 6703–6709.
23. Hopwood D. A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* // Microbiol. 1999. Vol. 145. P. 2183–2202.
24. Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F. et al. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. Norwich: The John Innes Foundation, 1985. 356 p.
25. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Foundation, 2000. 634 p.
26. Klymyshyn D., Makytrynskiy R., Murashchenko L., Fedorenko V. PCR cloning of O-methyltransferase genes involved in nogalamycin biosynthesis in *Streptomyces nogalater* // Modern problems of microbiology and biotechnology: The young scientists' and students' international scientific conference, Odessa, 28–31, May 2007: abstracts. Odessa, 2007. P. 84.
27. Li Tang, Grimm A., Zhang Ying-Xin, Hutchinson C. R. Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius* // Mol. Microbiol. 1996. Vol. 22. P. 801–813.
28. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // Pharm. Ther. 1991. Vol. 51. P. 239–255.
29. Lomby F., Brana A. F., Méndez C., Salas J. A. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 642–647.
30. Pfeifer B. A., Khosla C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts // Mol. Biol. Rev. 2001. Vol. 65. P. 106–118.
31. 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. Vol. 189. P. 111–120.
32. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, N.-Y.: CSH Laboratory Press. 1989. 450 p.
33. Strohl W. R., Dickens M. L., Rajgarhia V. B. et al. Anthracyclines // Biotechnology of industrial antibiotics / Ed. by W.R. Strohl. New York: Marcel-Dekker Inc. 1997. P. 577–657.

34. *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. Vol. 266. P. 276–288.
35. *Torkkell S., Ylihonko K., Hakala J. et al.* Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis // *Mol. Gen. Genet.* 1997. Vol. 256. P. 203–209.
36. *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. Vol. 251. P. 113–120.
37. *Williams L., Egli M., Gao E. et al.* Structure of nogalamycin bound to a DNA hexamer // *Biochem.* 1989. Vol. 87. P. 2225–2229.
38. *Williams L., Colgrave M., Searle M.* Drug recognition of a DNA single strand break // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. P. 1726–1733.

#### CHEMYSTRY AND BIOLOGY OF NOGALAMYCINS

**D. Klymyshin\*\*\*, O. Gromyko\*, T. Gren\*\*\*, O. Nymets\*,  
M. Honchar\*\*, V. Fedorenko\***

*\*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

*\*\*Institute of Animal Biology  
38, Stoos St., Lviv 79034, Ukraine  
e-mail: dedima@rambler.ru*

This article assimilates up-to-date information on the researches of nogalamycin biosynthesis in *S. nogalater*. Cytotoxicity, biological effects and mechanism of nogalamycin and its selective derivatives action are clarified. The authors own materials of the investigation of nogalamycins' regulation in *S. nogalater* are demonstrated in the review. The use of selective nogalamycin biosynthesis genes for heterologous expression experiments is shown.

*Key words: Streptomyces nogalater, nogalamycin, conjugation, antitumor antibiotics, 7(R)-O-methylnogarol.*

#### ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НОГАЛАМИЦИНОВ

**Д. Климишин\*\*\*, А. Громько\*, Т. Грень\*\*\*, О. Нимець\*,  
М. Гончар\*\*, В. Федоренко\***

*\*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

*\*\*Институт биологии животных НААН  
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина  
e-mail: dedima@rambler.ru*

В статье представлены современные экспериментальные данные относительно исследований биосинтеза антибиотика ногаламицина. Обобщены данные об основных механизмах действия, цитотоксичности и противоопухолевых свойствах этого антибиотика и ряда его производных. Представлены материалы собственных исследований авторов, связанные с изучением генетического контроля биосинтеза ногаламицина и механизмов его регуляции у *Streptomyces nogalater*. Показана перспективность использования отдельных генов биосинтеза ногаламицина с целью их экспрессии при гетерологических условиях.

*Ключевые слова: Streptomyces nogalater, ногаламицин, конъюгация, противоопухолевые антибиотики, 7(R)-O-метилногарол.*

Стаття надійшла до редколегії 14.06.10

Надійшла після доопрацювання 01.10.10

Прийнята до друку 05.10.10