



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
SEDE FACULTAD DE QUÍMICA

03072

23

28j

FALLA DE ORIGEN

Estudios sobre la producción de doxorubicina
en mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ

MEXICO, D. F

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer patente mi gratitud con el Dr. Sergio Sánchez Esquivel por haberme brindado la oportunidad de participar en su grupo de trabajo, por la confianza depositada en mí y por todo el apoyo que recibí de su parte para continuar con mi formación. Agradezco también su ejemplo de dedicación y honestidad.

A la participación del Comité Tutorial integrado por el Dr. Sergio Sánchez Esquivel, el Dr. Luis Servín González y el M. en C. Fernando García Hernández por sus valiosas aportaciones y la ayuda brindada en el desarrollo del trabajo experimental.

A los Dres. Sergio Sánchez Esquivel, Miguel Lara Flores, Guillermo Aguilar Osorio, Luis Servín González, Amelia Farrés González-Saravia, miembros del jurado de esta tesis por sus valiosas observaciones.

A mis compañeros de laboratorio Laura Escalante Dávila, Carla Santana Torres y Raúl Snell Castro por su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A la señora Lourdes Zato Luna por el apoyo brindado para la realización del trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y valiosos comentarios.

Muy especialmente a Katy por su cariño y todo su apoyo.

**A mis padres y mis hermanas
con cariño.**

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
GENERALIDADES DE DOXORRUBICINA.....	5
Biosíntesis de doxorubicina.....	5
Genética de la biosíntesis de doxorubicina.....	8
Mecanismo de acción de la doxorubicina.....	9
Usos de la doxorubicina.....	9
ANTECEDENTES.....	11
Selección de cepas sobreproductoras de antraciclinas.....	11
Algunos aspectos fisiológicos de la producción de antraciclinas.....	13
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	16
Microorganismo.....	16
Medios y condiciones de cultivo.....	16
Mutagénesis.....	17
Selección de mutantes.....	17
- Mutantes resistentes al efecto negativo de fosfato.....	17
- Mutantes resistentes a doxorubicina.....	18
- Mutantes insensibles al efecto negativo de glucosa.....	18
Métodos analíticos.....	19
- Determinación de crecimiento, pH, glucosa residual, fosfato residual y cuantificación de antraciclinas.....	19
- Determinación de la actividad de la glucosa cinasa.....	20
- Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	20
- Determinación del transporte de desoxiglucosa.....	21

Fusión de protoplastos.....	22
- Medios empleados.....	22
- Formación de protoplastos.....	22
- Fusión de protoplastos.....	23
- Regeneración de protoplastos.....	23
- Selección de recombinantes.....	23
RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
Establecimiento de las condiciones de crecimiento y producción.....	24
Mutagénesis.....	26
Selección de mutantes.....	27
- Mutantes resistentes al efecto negativo de fosfato.....	27
- Mutantes resistentes a doxorubicina.....	32
- Mutantes insensibles al efecto negativo de glucosa.....	35
Fusión de protoplastos.....	46
- Cepas GD.....	46
- Cepas GDP.....	47
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	54

RESUMEN

La doxorubicina es un antibiótico del grupo de las antraciclinas comercialmente importante debido a su potente actividad antitumoral. Sin embargo, los costos de producción de este compuesto son elevados debido en parte a los bajos títulos alcanzados en los cultivos de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Se ha reportado que la síntesis de antraciclinas se ve afectada negativamente por glucosa y por fosfato. Adicionalmente se ha demostrado la existencia de fenómenos de regulación coordinada de genes biosintéticos y genes de resistencia al antibiótico producido. Utilizando esta información, se diseñó una estrategia para la selección de mutantes sobreproductoras del compuesto de interés. Así, se obtuvieron 3 tipos de mutantes de este microorganismo con mejores características: mutantes insensibles al efecto ejercido por glucosa, seleccionadas en presencia del análogo 2-desoxiglucosa, mutantes insensibles al efecto de fosfato identificadas por su capacidad de producir antraciclinas en concentraciones altas de este nutriente y mutantes con mayor resistencia al propio antibiótico. La fusión de protoplastos de 3 de estas mutantes permitió la generación de cepas sobreproductoras que reúnen características de los tres tipos de mutantes. Los títulos máximos alcanzados con estas cepas fueron de 570 y 2300 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo del medio de cultivo empleado, lo que representa incrementos de 3.5 a 15 veces, con respecto a la cepa original.

INTRODUCCION

La doxorubicina es un antibiótico policétido del grupo de las antraciclinas, compuestos caracterizados por poseer un grupo cromóforo denominado antraciclina, que en la mayoría de los casos está sustituido con uno o mas azúcares. La primera antraciclina descrita fue la rodomicina, en 1950 (White y Strohane, 1984). Sin embargo, la alta toxicidad de este antibiótico limitó su uso clínico. El interés en este grupo de metabolitos aumentó durante la década de las 60s, pues se descubrió la primera antraciclina que alcanzó uso clínico, la daunorrubicina. Este compuesto fue aislado simultáneamente en 1963 por tres grupos de investigación independientes a partir de cultivos de estreptomicetos de las especies *Streptomyces coeruleorubidus* y *S. peucetius* (Pandey et al., 1979). La daunorrubicina tuvo aplicación como anticancerígeno, principalmente en casos de leucemia aguda y a pesar de presentar cierta cardiotoxicidad. Por esta última característica, se inició la búsqueda de un compuesto con actividad antineoplásica similar pero con una menor toxicidad, lográndose obtener por tratamiento mutagénico de *S. peucetius* una nueva cepa denominada *S. peucetius* variedad *caesius* con capacidad de sintetizar un compuesto con un mejor índice terapéutico que la daunorrubicina. El nuevo anticancerígeno se denominó originalmente adriamicina (Arcamone et al., 1969a) y fue identificado como una 14-hidroxi-daunorrubicina (Arcamone et al., 1969b).

La adriamicina, también conocida como doxorubicina, gracias a un mas amplio espectro de actividad antineoplásica que el de la daunorrubicina, además de poseer una menor cardiotoxicidad, es el agente anticancerígeno mas empleado en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Huk y Blumauerova, 1989). Sin embargo, los costos de producción de este antibiótico son muy elevados debido a los bajos títulos alcanzados y a la formación de una mezcla compleja de antraciclinas en esta bacteria (Otten et al., 1990). Una de las alternativas para lograr una disminución en los costos de producción de este importante compuesto consiste en el mejoramiento genético del microorganismo productor.

GENERALIDADES DE DOXORRUBICINA

A diferencia de la daunorrubicina, que es producida por doce especies del género *Streptomyces* (Huk y Blumauerova, 1989), la doxorubicina es sintetizada únicamente por *S. peucetius* var. *caesius*. También se ha reportado su obtención a partir de modificaciones químicas de la daunorrubicina (White y Stroshane, 1984; Vigevani y Williamson, 1980) o por síntesis química (Smith et al., 1977; Suzuki et al., 1978). La estructura de las 3 antraciclinas que tienen aplicación clínica se ilustra en la figura 1.

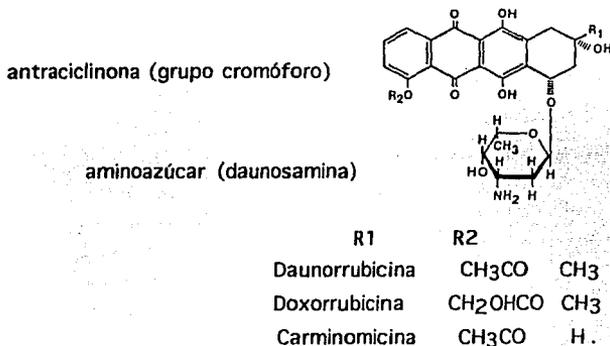


Figura 1.- Estructura de la doxorubicina y otras antraciclinas importantes.

Biosíntesis de doxorubicina:

La ruta biosintética de la doxorubicina y la daunorrubicina se ilustra en la figura 2 (Vanek et al., 1977; Hutchinson, 1981; White y Stroshane, 1984; Grein, 1987; Bartel et al., 1990; Connors et al., 1990a; Connors et al., 1990b; Strohl y Connors, 1992; Wagner et al., 1990). Aun no se ha demostrado la existencia de algunos de los posibles intermediarios, y para algunos de los compuestos identificados, como la rodomicinona, aun existen dudas sobre su papel como intermediarios o bien como productos de vías alternas (Wagner et al., 1990).

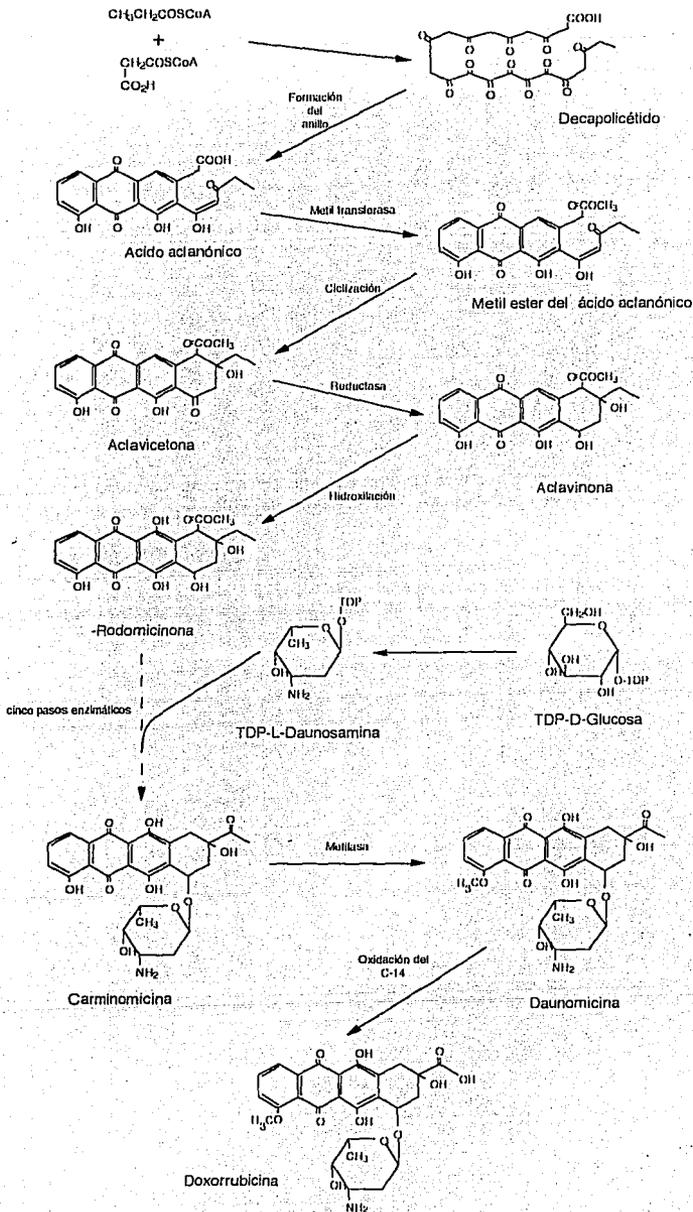


Figura 2.- Ruta biosintética de daunorrubicina y doxorubicina

Se ha determinado que la molécula de antraciclina (dauno o doxorubicina) es sintetizada a partir de la condensación de una molécula inicial de propionil-CoA con nueve de malonil-CoA (White y Stroshane, 1984; Strohl y Connors, 1992) por acción de la poliketido sintetasa (PKS), por un mecanismo similar al de la biosíntesis de ácidos grasos (Strohl y Connors, 1992; Ye et al., 1994). El poliketido formado, posteriormente es modificado por medio de reducciones de grupos ceto, ciclizaciones y otras modificaciones ilustradas en la figura 2.

La PKS de dauno y doxorubicina es un complejo enzimático de tipo II, compuesto por varias enzimas uni o bifuncionales típicas de la biosíntesis de antibióticos aromáticos como la actinorrodina, las tetraciclinas y otras antraciclinas como la aclacinomicina (Strohl y Connors, 1992), a diferencia de las PKSs de tipo I que están constituidas por un polipéptido grande multifuncional con varios dominios, como en el caso de la biosíntesis de la eritromicina (Donadio et al., 1991). En la ruta propuesta mas aceptada actualmente, las modificaciones del poliketido llevan a la formación de la aclavinona, que posteriormente es convertida a rodomicinona. La adición de la daunosamina se lleva a cabo posteriormente y antes de la O-metilación del grupo hidroxilo del C-4, la cual lleva a la formación de la carminomicina (Connors et al., 1990b). Existe evidencia de que este grupo metoxi del carbono 4 se deriva de la metionina, y de que la molécula de daunosamina se deriva directamente de la glucosa. La carminomicina es posteriormente convertida a daunorubicina y esta en doxorubicina en la mutante *S. peucetius* var. *caesius*.

Se ha propuesto la existencia de una ruta paralela a partir de la molécula de aclavinona en la que se lleva a cabo la adición de mas de una molécula de daunosamina, produciendo un glucósido mas grande (Wagner, 1990). Esta desviación de la ruta principal explicaría la existencia de moléculas de mas alto peso molecular en los caldos de fermentación, además de la daunorubicina libre, las cuales al ser sometidas a hidrólisis ácida producen este antibiótico.

Genética de la biosíntesis de doxorubicina.

Los genes de *S. peuceitius* var. *caesius* que codifican para la ruta biosintética de daunorrubicina y doxorubicina ya han sido clonados utilizando las sondas *actI* y *actIII* de *S. coelicolor*. Estos genes están distribuidos en 5 regiones distintas del genoma, aunque al parecer, la mayoría de los genes biosintéticos se encuentran en la región IV (Stutzman-Engwall y Hutchinson, 1989; Otten et al., 1990).

Asociado a los genes biosintéticos en la región IV, se encuentra el locus de resistencia *drrAB* que codifica para dos proteínas acopladas traduccionalmente. Ambas proteínas son requeridas para conferir resistencia al microorganismo productor. Esta resistencia al parecer está dada por la exportación del antibiótico, ya que la proteína DrrA es similar a una familia de proteínas de transporte y unión a ATP, y la proteína DnrB es muy hidrofóbica y probablemente se localiza en la membrana (Guilfoile y Hutchinson, 1991). Adyacentes a este gen se localizan el que codifica para la aclavinona C-11 hidroxilasa y el gen regulatorio *dnrR2* (Guilfoile y Hutchinson, 1991; Colombo et al., 1992). Además de *drrAB*, se ha identificado un segundo gen en otra región del genoma capaz de conferir el fenotipo de resistencia (Colombo et al., 1992).

Dentro de las regiones que ya han sido caracterizadas se encuentran los fragmentos *dnrR1* y *dnrR2*, los cuales estimulan simultáneamente la producción de estos metabolitos así como la resistencia a los mismos. El fragmento *dnrR1* contiene dos marcos de lectura, *dnrI* y *dnrJ* que presentan una alta similitud con otros genes de *Streptomyces* involucrados en la regulación del metabolismo secundario. La proteína DnrJ además presenta características de algunas protein-quinásas involucradas en los sistemas regulatorios de dos componentes (Stutzman-Engwall et al., 1992).

Un gen biosintético que ya ha sido estudiado y que se encuentra en la misma región es *dnrK*, que codifica para la carminomicina 4-O-metiltransferasa, cuya actividad cataliza la conversión de carminomicina en daunorrubicina (Madduri et al., 1993).

Se ha reportado la clonación de los genes de la policétido sintetasa de otro microorganismo productor de daunorrubicina, *Streptomyces* sp. cepa C5. Siete marcos de lectura están involucrados, 2 en un agrupamiento y 5 en otro divergente. Los dos primeros al parecer codifican para una policétido reductasa y para una proteína bifuncional ciclasa/dehidratasa, los 5 restantes codifican para un homólogo de la oxigenasa de la biosíntesis de tetracenomicina, para un homólogo del Orf 1 de la PKS, para un posible factor de elongación de cadena y para una proteína acarreadora de β -cetoacil-acilo (Ye et al., 1994). Estos genes muestran una fuerte conservación en su organización con respecto a otras PKSs de tipo II.

Mecanismo de acción de la doxorubicina.

Como antibióticos la daunorrubicina y la doxorubicina afectan principalmente a bacterias Gram positivas y sólo en algunos casos a Gram negativas (Vanek et al., 1977).

Se ha demostrado que estos antibióticos llevan a cabo en las células cancerosas interacciones electrostáticas con el DNA de doble cadena. Esta acción como agentes intercalantes es responsable de una inhibición de la síntesis de DNA y RNA (Di Marco et al., 1975). A nivel celular esto se traduce en una inhibición de la mitosis. También se ha reportado la inducción de rompimientos en el DNA (Simpkins et al., 1984; White y Strohane, 1984) y es posible la existencia de un mecanismo adicional ya que este compuesto es citotóxico para las células de leucemia sin necesidad de entrar a éstas (Tritton y Yee, 1982).

Usos de la doxorubicina.

Las antraciclinas son utilizadas por su acción anticancerígena y no por sus capacidades antibióticas. El antecesor de la doxorubicina, la daunorrubicina fue el primer compuesto que permitió una remisión, en ocasiones completa, en algunos casos de leucemia. La doxorubicina tiene un mas amplio espectro de actividad que la daunorrubicina, principalmente frente a algunos tumores sólidos que en el pasado eran relativamente insensibles al tratamiento por quimioterapia (Arcamone, 1981). En casos

de leucemia linfoblástica aguda se han reportado remisiones hasta en un 60% de los casos, en la leucemia mieloblástica aguda de un 35 a 55% y porcentajes aun mas altos han sido obtenidos en tratamientos en combinación con otras drogas. En la tabla 1 se ilustran algunos de los tumores frente a los cuales la doxorubicina presenta actividad.

Padecimientos hematológicos	Tumores sólidos
Leucemia linfocítica aguda	Adenocarcinoma de seno
Leucemia mielocítica aguda	Sarcomas malignos
Linfomas malignos	Carcinoma testicular
	Carcinoma broncogénico
	Neuroblastoma
	Osteosarcomas

Tabla 1.-Espectro de actividad antitumoral de la doxorubicina (Blum y Carter, 1974; Carter, 1975; Arcamone, 1981).

Los efectos tóxicos de la doxorubicina están relacionados con la dosis aplicada. Los principales son: la mielosupresión en un 60-80% de los casos, estomatitis en un 80%, náusea y/o vómito 20-55%, alopecia en casi todos los casos, leucopenia, como el efecto hematológico predominante, además de trombocitopenia y anemia. La cardiotoxicidad es el único efecto dañino que verdaderamente representa un problema en la administración a largo plazo de este compuesto. Esta puede manifestarse como anomalías en el electrocardiograma o como cardiomiopatía definitiva que provoque fallas congestivas del corazón aunque esto se relaciona con la dosis total administrada, y si ésta se mantiene debajo de 450 mg/m² el padecimiento cardiaco no se presenta (Carter 1975; Arcamone, 1981).

Además de la utilización de la doxorubicina como agente anticancerígeno, se ha sugerido su aplicación en el tratamiento contra el SIDA, pues este antibiótico inhibe la infectividad y la replicación del VIH (Nakashima y Yamamoto, 1987) y se han buscado análogos con una eficiente inhibición de la transcriptasa reversa (Ajito y Umezawa, 1989).

ANTECEDENTES

Selección de cepas sobreproductoras de antraciclinas.

El mejoramiento de cepas es una parte esencial en el desarrollo de procesos fermentativos como un medio de reducción de costos, a través de la generación de cepas con productividad incrementada, con capacidad de utilizar materias primas mas baratas o bien con características especiales como la capacidad de generar el producto bajo condiciones particulares (Rowlands, 1984). Aun ante el surgimiento de nuevas técnicas como las de la ingeniería genética, los métodos tradicionales de mejoramiento siguen siendo procedimientos confiables y de bajo costo.

Existe muy poca información publicada sobre las estrategias utilizadas y los resultados obtenidos en el mejoramiento de la producción de antraciclinas. La mayor parte de los datos reportados se refieren a daunorrubicina y en muchas ocasiones no son comparables pues se utilizaron métodos analíticos diferentes (Huk y Blumauerova 1989). Sobre doxorrubicina únicamente existen datos de producción de la mutante original, reportando 12 $\mu\text{g/ml}$ de este antibiótico (Arcamone et al., 1969a).

Una de las estrategias de mejoramiento, reportada por Grein (1987), consistió en la selección de mutantes con morfología colonial y pigmentación alteradas. Estas mutantes acumularon compuestos como la 11-desoxidaunorrubicina, la 11-desoxidoxorrubicina, la aclacinomicina, la 13-dihidrocarminomicina, la 13-desoxicarminomicina, y la 4-O-(β -D-glucuronil)- ϵ -rodomicinona. Algunas de estas cepas, además de producir un espectro de antraciclinas diferente, también presentaron incrementos en los rendimientos alcanzados.

En *S. coeruleurubidus*, la obtención de mutantes seleccionadas por presentar una mayor actividad antibiótica total permitió únicamente pequeños incrementos en la cantidad de daunorrubicina producida, y la mayor actividad detectada probablemente se debió a la mayor síntesis de sus derivados (Huk y Blumauerova, 1989). Utilizando una estrategia similar en *S. peucetius*, McGuire et al. (1979) obtuvieron una mutante

sobreproductora de daunorrubicina. Este mismo grupo ha explorado otra posibilidad para la selección de cepas mediante el aislamiento de mutantes con mayor resistencia al antibiótico producido (McGuire et al., 1979). Esta estrategia de selección no permitió la detección de sobreproductoras de este antibiótico aunque sí se encontraron diferencias en el espectro de antraciclinas producidas.

Dada la similitud entre la biosíntesis de las antraciclinas y otros policétidos con la biosíntesis de ácidos grasos, se ha utilizado la cerulenina, un inhibidor de esta última ruta, en la selección de cepas alteradas en la producción de daunorrubicina (White and Stroshane, 1984). Concentraciones subletales de cerulenina inhiben la formación de antraciclinas. Así, la selección de mutantes capaces de producir estos metabolitos en presencia del inhibidor ha permitido alcanzar producciones de 2 a 3 veces mayores que las obtenidas con la cepa original. Los títulos reportados se encuentran alrededor de $90\mu\text{g/ml}$. La utilización de estas mutantes en una escala de producción (10000 l) permitió aumentar hasta 5 veces la producción original de daunorrubicina, alcanzando los $180\mu\text{g/ml}$ (White and Stroshane, 1984), siendo éste el dato de producción mas alto reportado, pues la mayoría se encuentran entre 20 y $70\mu\text{g/ml}$.

Otro aspecto interesante de la modificación de cepas para su mejoramiento es el referente a la clonación de los genes de biosíntesis de dauno y doxorubicina. Aunque esta posibilidad aun no ha sido explotada con la finalidad de obtener cepas sobreproductoras, se han generado resultados que sugieren la posibilidad de aplicación en este sentido. La introducción en *S. peuceetius* y *S. peuceetius* var. *caesius* de un fragmento de DNA que contiene los genes biosintéticos de la región IV, ha logrado incrementos en la producción de daunorrubicina (Otten et al., 1990). De manera similar, la introducción de los fragmentos *dnrR*₁ y *dnrR*₂ estimuló la producción de estos metabolitos (Stutzman-Engwall et al., 1992). En estos dos trabajos se alcanzaron producciones de daunorrubicina de 35 y $50\mu\text{g/ml}$ respectivamente, aunque es posible que mediante la manipulación de los niveles de expresión de los genes introducidos se logren mayores títulos.

Algunos aspectos fisiológicos de la producción de antraciclinas.

En los cultivos de estreptomicetos productores de antraciclinas algunos de los parámetros más importantes para la obtención de buenos rendimientos son la disponibilidad de oxígeno y la temperatura (Grein, 1987). Además de estos factores medioambientales, la composición del medio de cultivo repercute de manera directa sobre la síntesis de estos metabolitos. En general se han empleado medios complejos con levadura de cerveza autolizada como fuente de nitrógeno, KH_2PO_4 , elementos traza como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y glucosa como fuente de carbono, aunque los requerimientos difieren entre las distintas cepas (Huk y Blumauerova, 1989).

S. peucetius es capaz de crecer y producir antraciclinas utilizando como fuente de carbono glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa o almidón, aunque glucosa es la fuente de carbono más frecuentemente utilizada (Dekleva et al., 1985). Se ha intentado modificar el medio de cultivo empleado para *S. peucetius* por medio de la sustitución de la glucosa por otras fuentes de carbono y los resultados han sido poco efectivos (Mc Guire, 1979). Para la obtención de producciones de antraciclinas adecuadas en este microorganismo son necesarias concentraciones de glucosa altas (12 g/l). Para *S. peucetius* var. *caesius* la concentración de este carbohidrato empleada en el medio de producción es de 60 g/l (Arcamone et al., 1969). Considerando que al utilizar estas concentraciones de glucosa en otros estreptomicetos se presenta el fenómeno de represión catabólica, se ha sugerido que en la síntesis de antraciclinas no se presenta este efecto regulatorio. Sin embargo, el uso de este carbohidrato en las fermentaciones de *S. peucetius* favorece la acidificación y la no producción de antraciclinas en un alto porcentaje de los cultivos. El empleo de otras fuentes de carbono evita este fenómeno, aunque permite menores producciones (Dekleva et al., 1987). Los autores citados han presentado evidencias de que el efecto negativo de glucosa sobre la síntesis de estos metabolitos es debido a la baja del pH generada por la excreción de piruvato, 2-oxoglutarato y citrato, consecuencia de un incremento en actividad glucolítica relativa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Dekleva et al., 1987). Sin embargo, durante el desarrollo

del presente trabajo se obtuvieron resultados que sugieren la existencia de un efecto negativo de glucosa adicional al efecto del pH demostrado anteriormente.

Además del efecto de glucosa, el fosfato es otro componente del medio de cultivo que afecta de manera negativa la síntesis de antraciclinas. En *S. coeruleorubidus*, microorganismo productor de daunorrubicina se ha demostrado que este nutriente ejerce un efecto inhibitorio y en *S. peucetius* este fenómeno también ha sido documentado (Dekleva et al., 1985).

La utilización de estos fenómenos regulatorios para el diseño de estrategias de selección de mutantes puede llevar a incrementar la producción de los compuestos de interés de una manera mas directa que la búsqueda al azar de variantes con mejores características. Otra posibilidad en la selección de mutantes se relaciona con los reportes referentes a la existencia de fenómenos regulatorios que afectan simultáneamente la expresión de genes biosintéticos y genes de resistencia al propio antibiótico (Stutzman-Engwall et al., 1992), pues la selección de mutantes con mayor resistencia a daunorrubicina o doxorubicina puede llevar, en algunos casos, a la identificación de cepas sobreproductoras.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Obtención de cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* sobreproductoras de doxorubicina.

Objetivos particulares:

- Aislamiento de mutantes resistentes al efecto negativo de fosfato sobre la síntesis de antraciclinas.
- Aislamiento de mutantes resistentes al efecto negativo de glucosa sobre la síntesis de antraciclinas.
- Obtención de mutantes con resistencia a doxorubicina incrementada.
- Fusión de protoplastos de las mutantes obtenidas.
- Caracterización de las mejores cepas generadas en términos de su capacidad de producción de antraciclinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo.- La cepa utilizada fue *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952.

Medios y condiciones de cultivo.

Preparación de Inóculos.- Los cultivos en medio líquido, tanto en medio mínimo como en medios de producción, se realizaron a partir de inóculos precrecidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflectores y 5 perlas de vidrio de 5 mm para la obtención de micelio disperso. El medio empleado para el crecimiento de los inóculos fue el YMG, que contenía extracto de levadura 0.4 %, extracto de malta 1 %, glucosa 0.4 %, ajustado a pH 7.2 (Dekleva et al., 1985). Los inóculos se obtuvieron a partir de cajas Petri y se crecieron 48 h a 29°C, con una agitación de 185 rpm. El micelio de 50 ml se lavó con solución salina estéril (NaCl 0.85%) 2 veces y se resuspendió en 10 ml de esta misma solución. Para inocular cada matraz de 250 ml se tomó 1 ml de esta suspensión.

Cultivos.- Todos los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con 50 ml de medio. La composición del medio mínimo (MM) empleado fue la siguiente (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.321, NaCl 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001, CaCO_3 3, K_2HPO_4 0.5, glucosa 18 (esterilizada aparte), pH ajustado a 7.2. Las pruebas de producción se realizaron en matraces con deflectores y el medio de producción empleado (Arcamone et al., 1969) contenía (g/l): levadura de cerveza 25, NaCl 2, K_2HPO_4 1, CaCO_3 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, glucosa 60 (esterilizada aparte), pH ajustado a 7.0. Las fermentaciones se siguieron por 120 a 144 horas dependiendo del tiempo en el que se alcanzó la máxima productividad.

Obtención de esporas.- Para la generación de esporas, el microorganismo fue sembrado en el siguiente medio (g/l): glucosa 10, almidón soluble 20, extracto de levadura 5, hidrolizado pancreático de caseína 5, CaCO_3 1, sacarosa 20 (esterilizada aparte), agar 15. Tras 7 días

de incubación a 29°C las esporas fueron obtenidas por filtración de acuerdo a lo reportado (Hopwood et al., 1985).

Mutagénesis.

En el tratamiento mutagénico se utilizaron esporas. La mutagénesis se llevó a cabo con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) a una concentración de 3 mg/ml en amortiguador Tris-maleatos 0.05 equimolar con un pH de 8.5 y a 30°C (Delic et al., 1970). Se probaron los siguientes tiempos de tratamiento: 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 minutos. Al cumplirse el tiempo de tratamiento las esporas fueron lavadas 3 veces con solución salina estéril, y almacenadas en glicerol al 20 % en solución salina a -20°C. Para la elaboración de las curvas de sobrevivencia y de mutantes idiótropas inducidas, las esporas mutagenizadas se sembraron en cajas Petri con medio YMG y se cuantificaron las unidades formadoras de colonia y las colonias blancas (no productoras) de cada tratamiento.

Selección de mutantes.

Mutantes resistentes al efecto negativo de fosfato (cepas P). Para determinar la concentración de fosfato inhibitoria de la producción de antraciclinas en la cepa original, y utilizarla para la selección en cajas Petri de las mutantes derreguladas, se probaron las siguientes concentraciones de K_2HPO_4 en medio mínimo a pH 7.2: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25 y 50 mM; se cuantificó el número de colonias que presentaron coloración blanca debida a la inhibición de la producción.

Habiendo determinado la concentración de fosfato inhibitoria, se sembraron esporas mutagenizadas y se seleccionaron aquellas colonias que presentaron la coloración roja mas intensa. Posteriormente, estas cepas se resembraron en el mismo medio junto con la cepa original como control y se siguió trabajando con aquellas que presentaron una coloración mas intensa que la del control.

Para evaluar la sensibilidad de las nuevas cepas al efecto de fosfato, se cuantificó la producción especifica de estas mutantes en el medio

mínimo líquido con 0.2 y 1.5 g/l de fosfato dibásico de potasio. Las mutantes que resultaron menos sensibles fueron probadas en el medio de producción con 2 concentraciones de fosfato con la finalidad de evaluar la capacidad de síntesis de antraciclinas de las más interesantes. El medio empleado fue modificado disminuyendo la concentración de glucosa de 60 a 18 g/l, para lograr mejores niveles de producción.

Mutantes resistentes a doxorrubicina (cepas D) En la determinación de la concentración de doxorrubicina inhibitoria del crecimiento del microorganismo productor se probaron distintas concentraciones de este antibiótico en cajas con medio mínimo. Las concentraciones empleadas fueron 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$. Las colonias que se desarrollaron en concentraciones de doxorrubicina inhibitorias del crecimiento de la cepa original fueron aisladas y probadas posteriormente en el medio de producción modificado (18 g/l de glucosa, 0.3 g/l de K_2HPO_4).

Mutantes insensibles al efecto negativo de glucosa (cepas G). La selección de las mutantes resistentes al efecto negativo de glucosa se realizó con base en lo reportado para *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1982). Se utilizaron cajas con el medio mínimo suplementado con el análogo de glucosa 2-D-desoxiglucosa (2-DOG) 10 y 25 mM, más una de las siguientes fuentes de carbono en una concentración de 10 mM: lactosa, fructosa, galactosa o glicerol, pues la utilización de estos compuestos se ve interferida por glucosa en *S. coelicolor* (Hodgson, 1982). La producción de antraciclinas de las mutantes aisladas en estas condiciones fue evaluada primero en cajas con el medio de producción utilizando tanto 18 como 90 g/l de glucosa, y posteriormente en el mismo medio líquido con 18 y 60 g/l en aquellas que presentaron la coloración más intensa en las cajas.

Métodos analíticos.

Los parámetros monitoreados en diferentes experimentos fueron crecimiento, antraciclinas intracelulares, pH, glucosa residual y fosfato residual.

La cuantificación del crecimiento se realizó determinando proteína por el método de Lowry, utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina.

Para la determinación de la concentración de antraciclinas intracelulares se tomaron muestras de 1 ml, se centrifugaron a 3500 rpm 10 min. y se realizaron extracciones añadiendo al micelio 1 ml de acetona : H₂SO₄ 0.1 N (4:1), agitando 20 a 30 segundos y centrifugando. Este procedimiento de extracción se repitió hasta que en la acetona acidulada resultante no se detectó color. Los equivalentes de antraciclinas presentes en los extractos fueron cuantificados espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 495 nm y calculando su concentración con la ecuación de Lambert-Beer usando un coeficiente de extinción en metanol de 220 (1%, 1cm) (Dekleva et al., 1985), pues en pruebas que se realizaron con la acetona acidulada se determinó que el coeficiente es el mismo en esta mezcla de extracción.

La separación de doxorrubicina y el resto de las antraciclinas presentes en los extractos se realizó por cromatografía en capa fina en cromatofolios de aluminio con silica gel 60 con espesor de 0.2 mm. Se probaron varios sistemas de solventes, siendo la mejor fase móvil cloruro de metileno:metanol:agua (100:30:2), la cual se obtuvo por modificación de lo reportado por Vigevani y Williamson (1980). Para la realización de las cromatografías, el pH de los extractos se neutralizó, se secaron y resuspendieron en metanol, aplicando esta solución en las placas.

La determinación de pH se realizó con los sobrenadantes de las muestras de los cultivos utilizando un potenciómetro digital Beckman modelo 3500.

Para la cuantificación de glucosa se utilizó un paquete para diagnóstico enzimático de glucosa en suero GOD-PAD (marcas Lakeside y Erlick). El fosfato residual se cuantificó por el método de Summer (1944).

Determinación de la actividad de glucosa cinasa.- La actividad se determinó espectrofotométricamente midiendo la formación de glucosa-6-fosfato (G6P) a través de cuantificar la reducción de NADP a 340 nm por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) acoplada (Angell et al., 1992). Los extractos celulares se prepararon a partir de cultivos crecidos 48 h en el medio mínimo con 18 o con 60 g/l de glucosa y suplementado con 2 g/l de casaminoácidos. El micelio de 2 matraces fue lavado 3 veces con amortiguador Tris HCl 50 mM pH 7, colectado por centrifugación y mantenido en frío. La biomasa resultante fue sometida a sonicación en frío 6 ciclos de 10 segundos con intervalos de 1-2 minutos para evitar el sobrecalentamiento. La suspensión resultante fue centrifugada a 45 000 rpm por 2 horas a 5°C. El sobrenadante fue utilizado para la determinación enzimática, y la concentración de proteína en éste fue determinada por el método de Lowry, previa eliminación del amortiguador Tris por precipitación con TCA y centrifugación. La mezcla de reacción contenía (en 2 ml): Tris HCl 50 mM pH 7, MgCl₂ 25 mM, NADP 0.5 mM, ATP 10 mM, glucosa 200 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC.1.1.1.49, Boehringer Mannheim, grado 1) 1.4 unidades (4 µl). La reacción se inició con la adición de 50 µl del extracto celular. Para cada determinación se corrió un blanco sin glucosa. Una unidad de actividad corresponde a 1 nmol de NADP reducido a 25°C por minuto por mg de proteína del extracto (coeficiente de extinción molar NADPH 6.3 l/mmol cm).

Actividad de β-galactosidasa.- La actividad de la enzima β-galactosidasa en cultivos en medio líquido se determinó espectrofotométricamente usando o-nitrofenil-β-galactopiranosido (ONPG) como sustrato (Eckardt et al., 1987). Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 nmol de ONPG hidrolizado a 29°C por minuto por mg de proteína del cultivo. Para la determinación se emplearon muestras de 1 ml, las cuales se centrifugaron para separar el micelio y el medio de cultivo. El micelio se lavó con 1 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 y se resuspendió en 2 ml de este mismo amortiguador.

Se añadieron 20 μl de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M en β -mercaptoetanol 4.5 M y 40 μl de tolueno. Tras agitar esta mezcla, se incubó a 29°C agitando periódicamente, tomándose muestras de 0.5 ml a distintos tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M al sistema de reacción. El ONPG hidrolizado se cuantificó a 420 nm.

La actividad en medio sólido se determinó agregando 40 μl de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (x-gal) 20 mg/ml en dimetilformamida sobre la superficie de las cajas Petri ya preparadas, sembrando el microorganismo posteriormente (Sambrook et al., 1989).

Determinación del transporte de DOG.- Para la cuantificación del transporte de desoxiglucosa se utilizó micelio crecido 48 h en medio mínimo con 18 g/l de glucosa. En el caso de la mutante G13, la cual no consume glucosa, el medio de cultivo se suplementó con 18 g/l de fructosa. De cada cepa se colectó el micelio por centrifugación y se lavó 3 veces con solución salina estéril. Se resuspendieron 500 mg de micelio de cada cepa (peso húmedo) en 10 ml de medio mínimo sin fuente de carbono con 1 mM de DOG como acarreador. Tras una incubación de 10 minutos a 29°C con agitación, se añadieron 10 μl de 2-desoxi-D-[^{14}C] glucosa (Amersham Corp.) con una actividad específica de 292 mCi/mmol, equivalentes a 2 μCi (6.84×10^{-3} μmoles) y se continuó incubando. Se tomaron muestras de 500 μl al tiempo de la adición y a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Cada muestra se pasó inmediatamente a un tubo con 1 ml de solución 100 mM de DOG para detener la incorporación de la marca. La suspensión resultante se filtró en membranas de 0.45 μm previamente pesadas. El filtrado se lavó 2 veces con 5 ml de agua. Los filtros se secaron a 60°C y se pesaron para determinar la biomasa contenida en cada muestra. La marca incorporada se determinó introduciendo los filtros en viales con 4 ml de una solución de PPO 0.4%, POPOP 0.04% en tolueno, cuantificando las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo.

Formación, fusión y regeneración de protoplastos.

Medios empleados.

Se utilizaron los siguientes medios y soluciones:

- Medio YMG suplementado con 34 % de sacarosa.
- Medio YMG con 34% de sacarosa y con 0.5% de glicina y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM.
- Solución de sacarosa 10.3 %.
- Solución de elementos traza (mg/l): ZnCl_2 40, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10.
- Medio P: Sacarosa 103 g, K_2SO_4 0.25 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.03 g, solución de elementos traza 2 ml, agua destilada 790 ml. Se esterilizó en autoclave, y al momento de utilizar se añadieron 10 ml de KH_2PO_4 0.5%, 100 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.68% y 100 ml de amortiguador Tris HCl 3.03% pH 7.2.
- Solución de polietilenglicol (PEG) 1000 al 50 % en medio P recién preparado.
- Medio R6: sacarosa 200 g, K_2SO_4 0.1 g, elementos traza 1 ml, glucosa 10 g, casaminoácidos 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, agar 22 g, agua destilada 850 ml. Se esterilizó en autoclave y al preparar las cajas se añadieron 35 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20%, 100 ml de amortiguador Tris HCl 3.03% pH 7.2 y 15 ml de L-prolina 20% esterilizada por filtración. Las cajas ya preparadas se dejaron secar hasta perder un 15 % del agua.
- Medio R6 suave: Se preparó con la misma composición de medio R6 sustituyendo el agar por agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 0.5 %.

Formación de protoplastos.- Las distintas cepas se precrecieron en medio YMG suplementado con sacarosa 34 %. A las 96 h, el micelio se disgregó utilizando un homogenizador de pistilo y se usó 1 ml del homogenizado para inocular 1 matraz con 50 ml del mismo medio suplementado con glicina y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tras 48 h de incubación (final de la fase exponencial), el micelio fue lavado 2 veces con sacarosa 10.3 % (Baltz, 1978) y resuspendido en medio P (Okanishi et al., 1974). A la suspensión resultante se le añadió medio P con albúmina sérica bovina (concentración final 0.3 mg/ml), se homogenizó y posteriormente se agregó lisozima para dar una concentración final de 1 mg/ml. El tratamiento con lisozima se llevó a cabo a 30°C con agitación de 50 rpm

por 15 minutos. Transcurrido el tiempo los protoplastos se filtraron en una columna de algodón y se lavaron 3 veces por centrifugación con medio P con 0.3 mg/ml de albúmina y se resuspendieron en la misma solución. El número de protoplastos se determinó por conteo en hemocitómetro.

Fusión de protoplastos.- Se mezclaron aproximadamente 10^7 protoplastos de cada una de las cepas, se centrifugaron a 6000 rpm por 15 minutos y se resuspendieron en 0.1 ml de medio P con albúmina, añadiendo posteriormente 0.9 ml de una solución de PEG 1000 al 50 % en medio P. Los protoplastos se agitaron pipeteando suavemente y se incubaron a 29°C por 5 minutos. Posteriormente se agregó medio P con albúmina y se eliminó el PEG por centrifugación a baja velocidad, diluyendo los protoplastos en el mismo medio.

Regeneración.- Se mezclaron 100 μ l de protoplastos con 4 ml de medio R6 suave fundido a 38°C. Esta suspensión se colocó en la superficie de cajas Petri con medio R6 (Baltz y Matsushima, 1981) y se incubó a 29°C por 5 a 6 días.

Selección de recombinantes.- El micelio resultante de la regeneración en medio R6 fue raspado de las cajas con asa de siembra, resuspendido en NaCl 0.85%, homogenizado y sembrado en cajas con medio mínimo y mezclas de los agentes selectivos, doxorubicina + DOG y doxorubicina + DOG + fosfato 30 mM, seleccionando las colonias que lograron crecer en el primer caso (cepas GD) y las que crecieron y presentaron la coloración mas intensa en el segundo (cepas GDP).

Las posibles recombinantes seleccionadas fueron probadas en el medio de producción modificado y posteriormente en el medio original.

RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento de las condiciones de crecimiento y producción.

Con la finalidad de obtener esporas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* para utilizarlas en la mutagénesis se probaron el medio YMG, el medio de producción (Arcamone, 1969), y el medio de esporulación descrito en material y métodos. En los dos primeros la esporulación fue muy pobre y únicamente el tercero permitió la obtención de esporas, aunque éstas fueron escasas. Además, al hacer comparaciones de viabilidad en cultivos de diferentes edades se observó que el número de unidades formadoras de colonia disminuyó en aquéllos en los que las esporas no fueron cosechadas inmediatamente después de su formación, lo cual ocurrió a los 7 u 8 días de crecimiento.

Para la obtención de los inóculos de los diferentes cultivos, se decidió emplear el medio YMG porque en este medio el microorganismo creció bien y además los componentes del mismo, al ser solubles facilitaron el lavado de las células en los casos en los que fue necesario realizar este paso.

En las primeras pruebas de producción de antraciclinas se utilizó el medio con 60 g/l de glucosa y 1 g/l de K_2HPO_4 (Arcamone et al., 1969). En estos experimentos no se lograron reproducir los niveles de producción reportados, alcanzándose en diversas repeticiones de este experimento concentraciones de antraciclinas de 35 a 140 $\mu g/ml$, sin que se detectara doxorubicina por cromatografía en capa fina de los extractos. Por los reportes existentes sobre el efecto negativo de fosfato y glucosa sobre la síntesis de antraciclinas, (Dekleva y Strohl, 1982; Dekleva et al., 1985) y con la finalidad de mejorar su producción, se decidió disminuir la concentración de glucosa a 18 g/l y la de K_2HPO_4 a 0.3 g/l, pues experimentos preliminares llevados a cabo en el laboratorio sugerían que estos valores eran adecuados para este objetivo. En la figura 3 se ilustran los resultados de este experimento. Cuando la cepa original de *Streptomyces peucetius* fue cultivada en un medio con una concentración de glucosa de 60 g/l, el pH del medio se acidificó y la producción fue mas

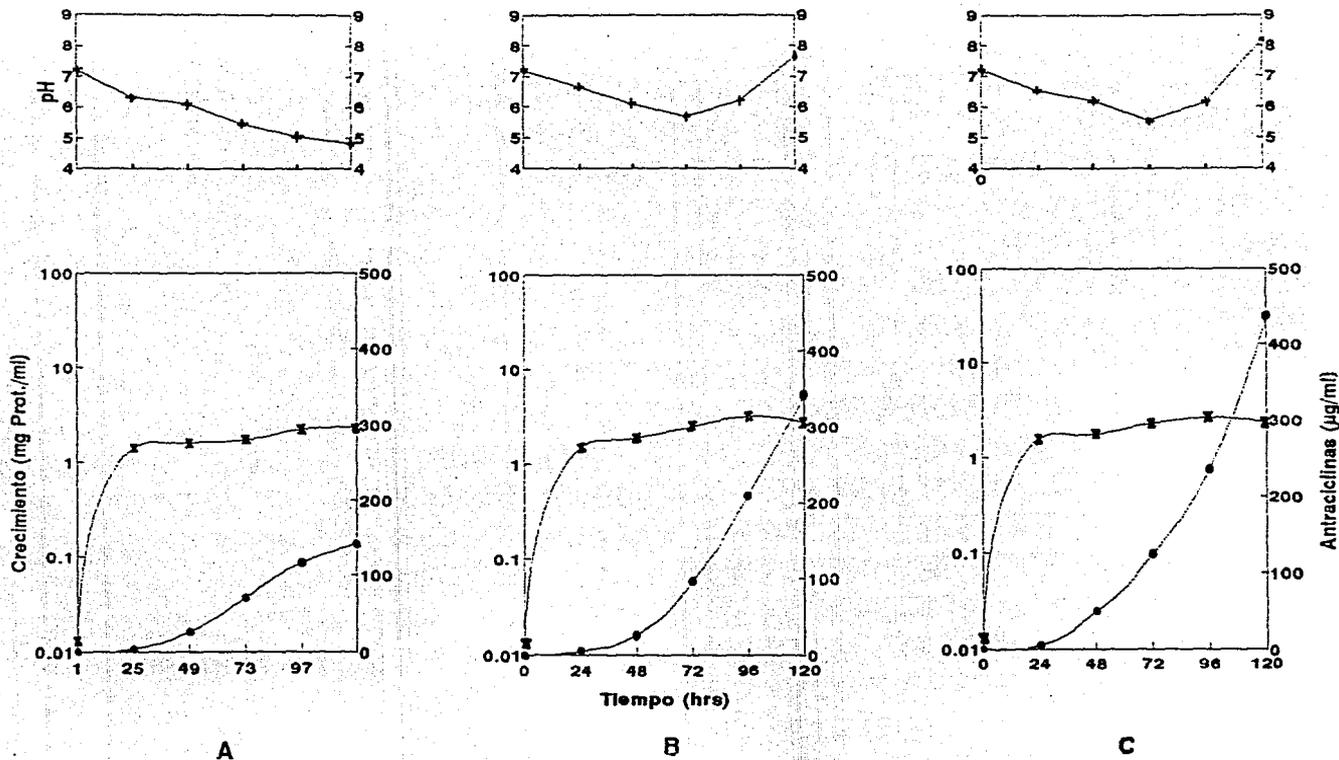


Figura 3.- Cinéticas de crecimiento (■), producción de antraciclinas (●) y pH (▲) en 3 medios de producción. A.- Medio original con 60 g/l de glucosa y 1 g/l de K_2HPO_4 . B.- Medio modificado con 18 g/l de glucosa y 1 g/l de K_2HPO_4 . C.- Medio modificado con 18 g/l de glucosa y 0.3 g/l de K_2HPO_4 .

baja que en los cultivos con glucosa en concentración baja, en los que el pH aumentó al final de la fermentación. Estos resultados concuerdan con lo reportado (Dekleva y Strohl, 1982). La modificación de la concentración de fosfato también tuvo un efecto importante en la producción. La disminución en la concentración de estos 2 componentes del medio de cultivo permitió incrementar la producción de antraciclinas de 140 a 440 $\mu\text{g/ml}$, sin afectar el crecimiento del microorganismo, por lo que se decidió emplear el medio modificado para las pruebas de producción con las mutantes. Resultó interesante que las antraciclinas producidas se encontraron principalmente en el micelio y en este medio de cultivo prácticamente no se observó excreción de estos compuestos, a diferencia de lo que se obtuvo en otros medios de cultivo como el YMG, en el cual las antraciclinas extracelulares resultaron ser de un 15 a un 25 % del total producido, dependiendo de las condiciones empleadas, lo cual también favoreció el empleo de este medio modificado.

Mutagénesis.

Para la determinación del tiempo de tratamiento con el mutágeno adecuado para la obtención de las mutantes, se cuantificó a distintos tiempos la proporción de mutantes incapaces de sintetizar antraciclinas en cajas con medio YMG, en el cual se da una buena producción de estos compuestos, facilitando así la detección de estas colonias blancas no productoras.

En la figura 4 se observan los resultados de la mutagénesis. Alrededor de los 40 minutos se alcanzó la máxima proporción de mutantes idiótropas en la población sobreviviente aunque la mortalidad en esta condición resultó muy alta. Estos resultados permitieron definir tiempos de tratamiento de 35 a 40 minutos como adecuados para la búsqueda de mutantes.

El tratamiento aquí descrito fue llevado a cabo únicamente para la generación de las mutantes P. Las mutantes G y D fueron mutantes espontáneas obtenidas en los medios selectivos.

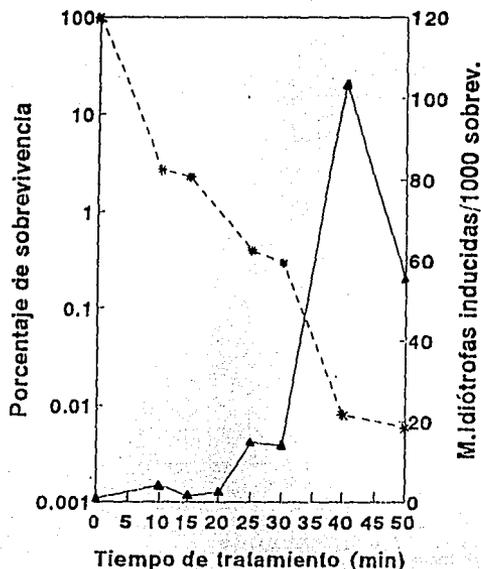


Figura 4.- Curvas de mutagénesis en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* con 3 mg/ml de NTG a pH 8.5. Porcentaje de supervivencia (—*). Idiótrofas inducidas (—▲).

Selección de mutantes.

Mutantes resistentes al efecto negativo de fosfato

Como ya ha sido mencionado, y de acuerdo con lo reportado para la producción de daunorrubicina en *Streptomyces peucetius* (Dekleva et al., 1985), el fosfato ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas en la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Con la finalidad de obtener cepas insensibles a este fenómeno regulatorio y esperando obtener en éstas una sobreproducción de antraciclinas, se decidió determinar las condiciones adecuadas para su selección. En medio mínimo líquido, la concentración que permite la mayor producción es de 0.3 g/l (1.72 mM), al utilizar concentraciones mayores se observa una

disminución de la síntesis de antraciclinas, aunque ésta no se suprime completamente.

En cajas de Petri con el mismo medio mínimo fueron necesarias concentraciones mas altas de fosfatos para lograr afectar la producción de antraciclinas en la cepa original. En la figura 5 se observan los resultados de estas pruebas en las que se cuantificó el porcentaje de las colonias que presentaron una coloración blanca por la inhibición de la producción en relación con la concentración de fosfato. Desde 10 mM la producción se vió afectada y ya en 25 mM se suprimió la síntesis de antraciclinas en la mayoría de las colonias. Con concentraciones altas de fosfato se inhibió también el crecimiento. Sin embargo, se consideró conveniente utilizar 25-30 mM para la selección de las mutantes por la fácil identificación del fenotipo de resistencia al efecto negativo.

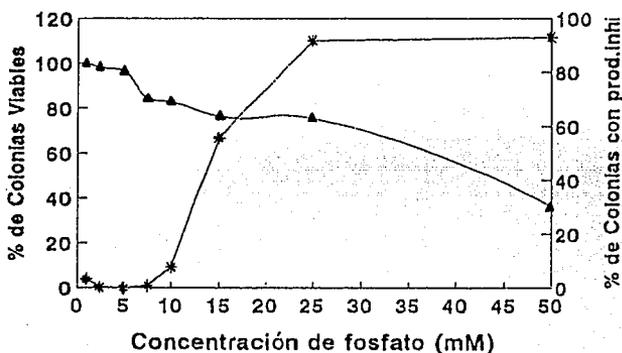


Figura 5.- Efecto de la concentración de fosfatos sobre el crecimiento y sobre la producción de antraciclinas en medio mínimo sólido a los 5 días de incubación. Porcentaje de colonias viables (▲). Porcentaje de colonias con producción inhibida (*-).

Utilizando las condiciones descritas y a partir de esporas mutagenizadas, se obtuvieron 29 mutantes capaces de producir una coloración roja intensa en el medio de selección. Al ser resembradas en cajas con el mismo medio de cultivo y utilizando como referencia a la cepa original, se seleccionaron 21 mutantes que siguieron presentando

resistencia al efecto ejercido por fosfato. Al probar la producción de antraciclinas de estas cepas en el medio mínimo líquido con concentraciones baja y alta de fosfato, se seleccionó inicialmente a 6 que presentaron menor sensibilidad al efecto de fosfato que la cepa original utilizada como control.

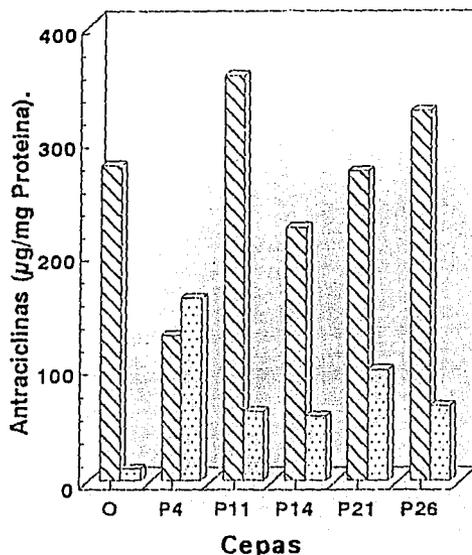
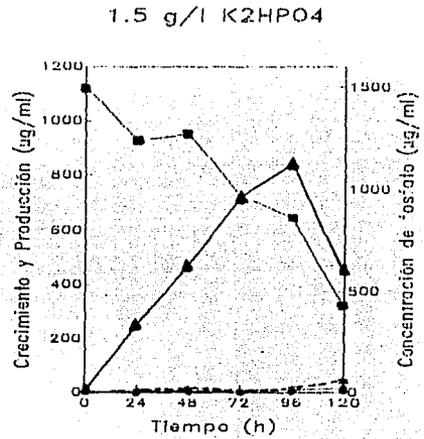
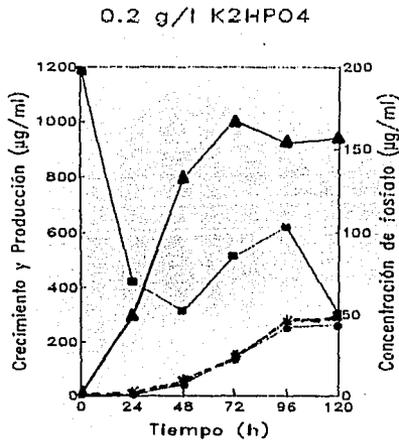


Figura 6.- Producción específica de las mutantes P y la cepa original (O) a las 96 h de fermentación en medio mínimo con 0.2 g/l (▨) y con 1.5 g/l (▩) de K_2HPO_4 .

En la figura 6 se muestran los resultados de producción específica de las 5 mejores mutantes en las dos concentraciones de fosfato probadas. Únicamente la cepa P4 presentó una mayor producción específica de antraciclinas en la concentración de fosfato alta. Este resultado coincide con lo obtenido en cajas con 30 mM de fosfato, donde esta cepa presentó una mayor producción de antraciclinas que el resto de las cepas P. Sin embargo, la producción alcanzada en las dos condiciones probadas fue inferior a la lograda por el resto de las mutantes en 0.2 g/l de fosfato. Si bien las mutantes P11, P14, P21 y P26 presentaron una menor producción específica de antraciclinas en 1.5 g/l que en 0.2 g/l, lo que demuestra que

CEPA ORIGINAL



CEPA P11

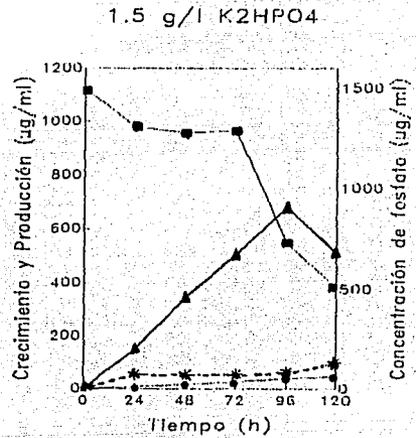
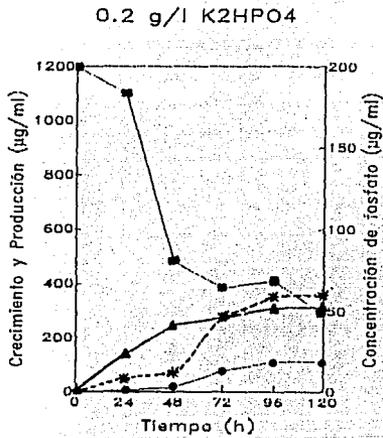
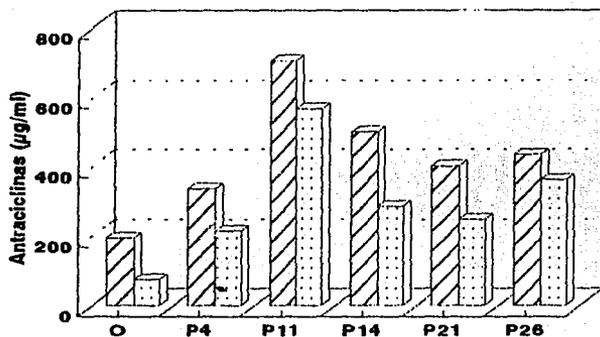
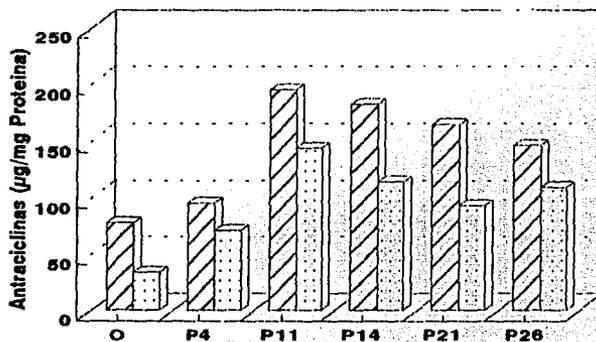


Figura 7.- Cinéticas de crecimiento (▲), consumo de fosfato (■), producción volumétrica (●) y específica (✱) de antraciclinas de la cepa original y la mutante P11. Se utilizó el medio mínimo con 0.2 y 1.5 g/l de K₂HPO₄.

PRODUCCIÓN VOLUMÉTRICA



PRODUCCIÓN ESPECÍFICA



Cepas

Figura 8.- Comparación de las mutantes P en el medio de producción con 0.3 g/l (▨) y con 4.0 g/l (▩) de K₂HPO₄ a las 120 h de fermentación. O = cepa original.

la producción de estas cepas sigue siendo sensible a la concentración de fosfato, éstas se vieron menos afectadas que la cepa original por lo que se decidió continuar con la evaluación de las mutantes en el medio de producción.

En la figura 7 se ilustran las cinéticas de crecimiento, consumo de fosfato, producción volumétrica y específica de las cepas original y la P11 por ser la que presentó la mayor producción en el medio mínimo. Esta mutante, al igual que las demás cepas P, presentó un crecimiento mucho menor que el de la cepa original por lo que la producción volumétrica fue mas baja. Sin embargo, la producción específica en las dos concentraciones de fosfato probadas fue superior a la de la cepa original. Otra diferencia observada entre las cepas P y la original fue que éstas crecieron mejor cuando se utilizó la concentración de fosfato alta.

En las pruebas realizadas en el medio de producción, cuyos resultados se observan en la figura 8, las 5 mutantes seleccionadas sintetizaron una mayor cantidad de antraciclinas que la cepa original. La mutante P11 volvió a presentar niveles de producción específica y volumétrica superiores a los de las demás cepas en las dos concentraciones de fosfato empleadas, siendo la mejor cepa obtenida. Es importante hacer notar que en este medio de cultivo las mutantes P no presentaron los problemas de crecimiento observados en el medio mínimo. Al utilizar una concentración de fosfato alta en este medio, se observó nuevamente que la síntesis de antraciclinas siguió siendo sensible a este compuesto en todas las mutantes, aunque el efecto fué menor que el que se dió en la cepa original. En estas condiciones no se observó la resistencia al efecto de fosfato obtenida con la cepa P4 en el medio mínimo. Con base en los resultados de producción obtenidos en esta y otras pruebas con la cepa P11, se decidió utilizarla en la fusión de protoplastos.

Mutantes resistentes a doxorrubicina.

Como regla general, en el género *Streptomyces*, productor de la mayoría de los antibióticos conocidos, se ha observado que los genes que codifican para enzimas de las rutas biosintéticas de antibióticos se

encuentran agrupados, con uno o mas genes que confieren resistencia al compuesto producido (Esser y Dohmen, 1987). Estos arreglos pueden tener implicaciones de regulación coordinada que permitan al microorganismo productor sintetizar el antibiótico simultáneamente con las proteínas capaces de conferirle resistencia. En el caso de *S. peucetius*, existe un gen de resistencia ligado al menos a un gen biosintético y se ha demostrado que este gen de resistencia se expresa únicamente durante la síntesis de antraciclinas (Guilfoile y Hutchinson, 1992; Colombo et al., 1991). Adicionalmente se ha reportado la existencia de genes regulatorios (*dnrR1* y *dnrR2*) cuyos productos afectan positiva y simultáneamente la síntesis de antraciclinas y el nivel de resistencia al producto (Stutzman-Engwall et al., 1992). La selección de mutantes de *S. peucetius* resistentes a daunorrubicina ya ha sido aplicada para el mejoramiento de la producción de antraciclinas (Grein, 1981), por lo que se decidió utilizar esta estrategia para la identificación de un segundo tipo de mutantes sobreproductoras.

Las esporas de *Streptomyces peucetius* var *caesius* fueron sensibles a concentraciones de doxorrubicina de 12 a 15 $\mu\text{g/ml}$ en el medio mínimo (figura 9). Como resultado de estas pruebas de determinación de la concentración de doxorrubicina inhibitoria del crecimiento, se aislaron 12 mutantes resistentes espontáneas. La frecuencia de aparición de estas mutantes fue de 10^{-6} a 10^{-7} Tres de ellas al ser probadas en el medio de producción modificado, presentaron niveles de producción superiores a los de la cepa original utilizada como control, por lo que no fue necesario realizar un tratamiento mutagénico para la obtención de este tipo de mutantes. En la figura 10 se grafican los resultados de producción de estas cepas. Los análisis por cromatografía en capa fina de las antraciclinas sintetizadas permitieron seleccionar a la mutante D8 como la mas adecuada para continuar con la parte referente a fusión de protoplastos, ya que además de su mejor producción de antraciclinas totales, los extractos contenían una mayor cantidad de doxorrubicina que las mutantes D4 y D9, aunque esta estimación fue cualitativa. El resto de las cepas D, a pesar de presentar una resistencia al antibiótico incluso mayor que la de las cepas D4, D8 y D9, produjeron concentraciones de antraciclinas similares o inferiores a las alcanzadas por la cepa original. Esto pudo deberse a que

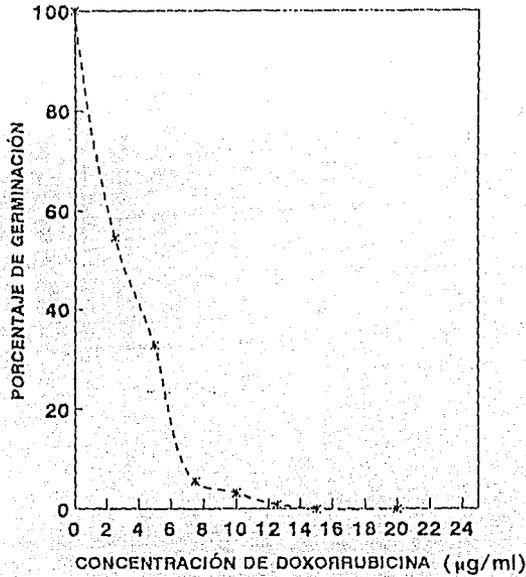


Figura 9.- Determinación de la concentración mínima de doxorubicina inhibitoria del crecimiento en cajas con medio mínimo.

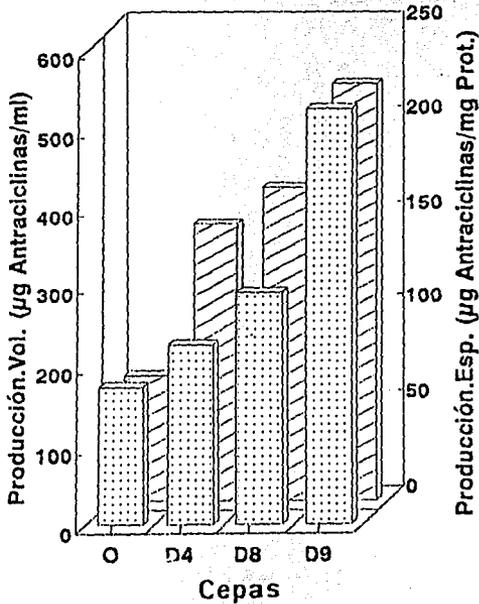


Figura 10.- Comparación de los niveles de producción alcanzados por las mutantes D y por la cepa original O a las 120 h de cultivo en el medio de producción modificado.

Producción volumétrica (■).
 Producción específica (▨).

las mutaciones que permitieron el incremento en resistencia son diferentes en las distintas cepas y solo algunas de ellas afectan también la producción de los compuestos de interés. Un ejemplo de mutaciones de este tipo serían aquéllas que modificaran la expresión de genes regulatorios que afectan las dos características (resistencia y producción) como *dnrR1* o *dnrR2*.

Mutantes insensibles al efecto negativo de glucosa.

Como ya se ha mencionado, la glucosa ejerció un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas al ser empleada a una concentración de 6 % en el medio de producción original (figura 3). Se decidió utilizar este fenómeno regulatorio para obtener mutantes derreguladas sobreproductoras de antraciclinas. Este carbohidrato, además de afectar la producción del antibiótico ejerce algún mecanismo de control sobre la asimilación de lactosa, pues cultivando al microorganismo en lactosa y en presencia de glucosa o de su análogo no metabolizable 2-DOG se suprime la actividad de β -galactosidasa (tabla 3). Adicionalmente, es probable que también la utilización de glicerol, galactosa y fructosa presente el fenómeno de represión por glucosa, ya que aun cuando no se cuantificó alguna de las actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de estas fuentes de carbono creciendo al microorganismo en presencia de glucosa, éste fue incapaz de crecer con estas fuentes de carbono en presencia del análogo 2-DOG, si bien es posible que la inhibición del crecimiento sea debida un efecto de toxicidad del análogo o sus productos. Durante las pruebas del efecto de 2-DOG se aislaron 27 mutantes espontaneas capaces de utilizar las fuentes de carbono probadas en presencia del análogo. En la tabla número 2 se ilustran las condiciones en las que se seleccionó a algunas de estas mutantes. Las cepas obtenidas presentaron una pérdida de la represión por glucosa sobre la utilización de estas fuentes de carbono, pues las mutantes seleccionadas con 2-DOG en glicerol también fueron resistentes al análogo en medios con lactosa, galactosa y fructosa. En la tabla no. 3 se ilustran los resultados de una prueba en la que se analizó la actividad de la β -galactosidasa (como ejemplo de una enzima implicada en la asimilación de una de las fuentes de carbono probadas) de la cepa original y de la mutante G21 (seleccionada en

glicerol+2-DOG) en cajas con medio mínimo con lactosa + X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido), en presencia y ausencia de glucosa o el análogo.

FUENTE DE CARBONO EMPLEADA	CONCENTRACION DE DESOXIGLUCOSA EMPLEADA	
	10 mM	25mM
FRUCTOSA	G1, G2, G3	G13
LACTOSA	G4, G5	
GALACTOSA	G7	G16, G17, G18, G19
GLICEROL	G9	G21, G22, G23, G27

Tabla No. 2.- Condiciones de selección de las mutantes G. Se empleó el medio mínimo con la fuente de carbono indicada a una concentración de 10 mM. Únicamente se incluyen aquellas cepas, de las 27 aisladas originalmente, que presentaron un buen crecimiento y mayor producción de antraciclinas que la cepa original en cajas con medio de producción con 90 g/l de glucosa.

CONDICION	RESULTADO		
		CEPA ORIGINAL	CEPA G21
LACTOSA	A	N. D.	N. D.
	C	+	+
LACTOSA + X GAL	A	+	+
	C	+	+
LACTOSA + DOG	A	N. D.	N. D.
	C	-	+
LACTOSA + X GAL + DOG	A	N. D.	+
	C	-	+
LACTOSA + X GAL + GLUCOSA	A	-	+
	C	+	+

Tabla No. 3.- Efecto de la glucosa y la desoxiglucosa sobre la actividad de la β -galactosidasa en la cepa original y en la mutante G21 a los 5 días de crecimiento en cajas con medio mínimo con lactosa y X-gal. A = ACTIVIDAD DETECTADA; C = CRECIMIENTO; N.D. NO DETERMINADO.

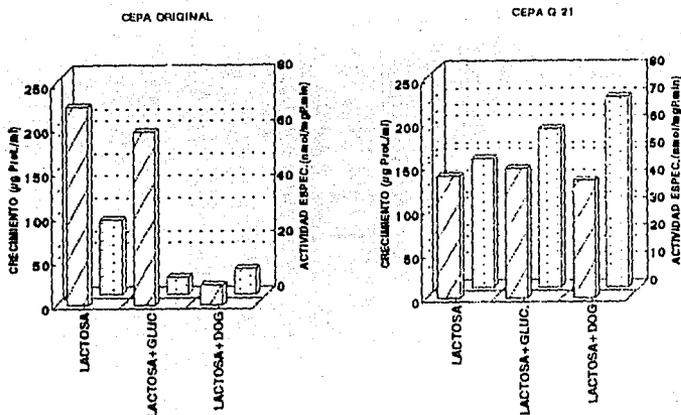
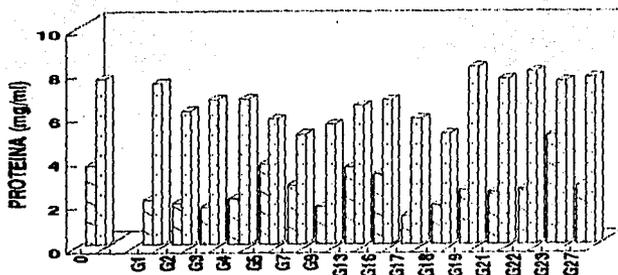


Figura 11.- Efecto de la glucosa y su análogo desoxiglucosa sobre la actividad de la β -galactosidasa (□) y sobre el crecimiento (▨) en la cepa original y en la mutante G21. Los cultivos se realizaron en medio mínimo líquido.

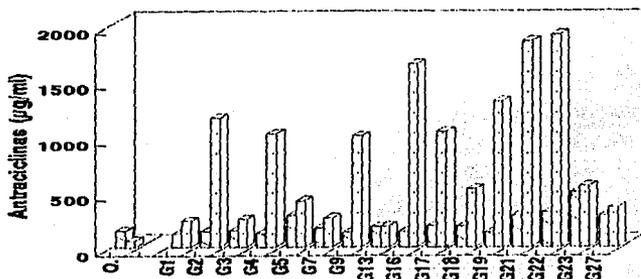
La actividad enzimática y, como consecuencia, el crecimiento de la mutante, no se vieron afectados por glucosa ni por el análogo contrariamente a lo que se observó en la cepa original. Así, la utilización de lactosa dejó de ser regulada por glucosa en esta cepa, seleccionada por presentar una derregulación de la utilización de glicerol. En un experimento similar realizado con la finalidad de cuantificar el crecimiento y la actividad de la β -galactosidasa en medio líquido en esta misma mutante, se obtuvieron resultados similares (figura 11).

En cuanto a la producción de antraciclinas, de las 27 mutantes obtenidas 16 presentaron una coloración muy intensa al cultivarlas en cajas con el medio de producción con 90 g/l de glucosa, a diferencia de lo observado en la cepa original que no presenta producción de antraciclinas en esta condición. Estas 16 cepas fueron probadas posteriormente en un experimento en matraces con medio de producción modificado en el que se comparó su comportamiento en concentraciones baja (18 g/l) y alta (60 g/l) del carbohidrato. En la figura 12 se resumen los resultados obtenidos.

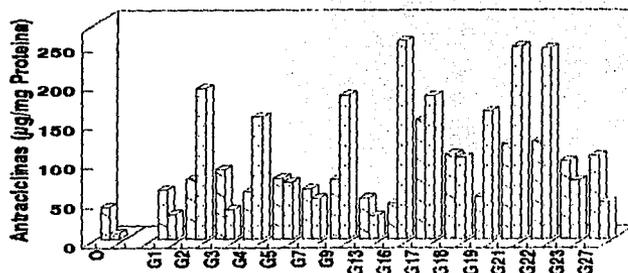
CRECIMIENTO



PRODUCCION VOLUMÉTRICA



PRODUCCION ESPECIFICA



Cepas

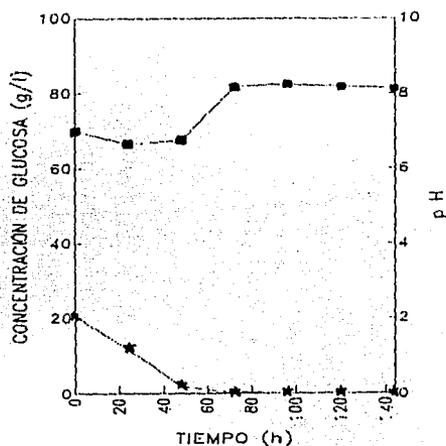
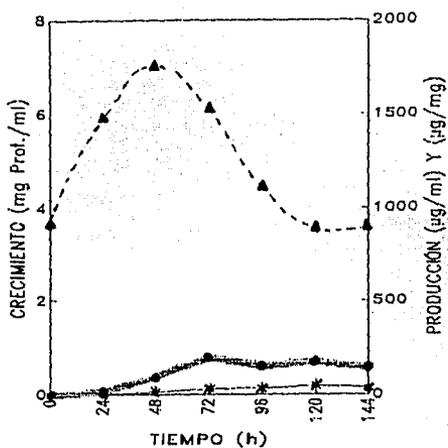
Figura 12.- Comparación de las mutantes G y la cepa original O a las 144 h de fermentación en el medio de producción con 1.8% (□) y con 6% (▨) de glucosa.

El crecimiento de las mutantes en general fue menor que el de la cepa original. Esto probablemente fue debido al consumo de glucosa mas lento que presentaron las cepas G. Es importante hacer notar que a pesar de esto las mutantes siguieron siendo capaces de utilizar el carbohidrato, a diferencia de lo observado con la mayoría de las mutantes de *S. coelicolor* reportadas. Unicamente la mutante G13 presentó un consumo casi nulo de la glucosa del medio. Con todas las cepas probadas al utilizar la concentración alta se obtuvo un mayor crecimiento que en 18 g/l . La cepa original en esta condición presentó una marcada disminución en la cantidad de antraciclinas sintetizada, mientras que las mutantes G lograron títulos mas altos. Sin embargo, dentro de estas mutantes se pueden distinguir dos grupos. En el caso de las mutantes G1, G3, G5, G7, G13, G18, G23 y G27 la mejor producción en 60 g/l se debió al mayor crecimiento que se logró con esta concentración de glucosa (mayor cantidad de células produciendo el compuesto de interés) aunado a una menor sensibilidad al efecto negativo ejercido por glucosa, aunque estas mutantes no presentaron una derregulación completa como lo demuestra la producción específica (μg de producto/mg de proteína) de éstas. En el segundo grupo, formado por las mutantes G2, G4, G9, G16, G17, G19, G21, G22, se presentó no solamente una insensibilidad al efecto de glucosa sino incluso una estimulación de la producción en esta condición, lo que permitió a estas cepas alcanzar los niveles de producción mas altos.

En la figura 13 se presentan las cinéticas de crecimiento, producción volumétrica, producción específica, pH y glucosa residual de la cepa original (13a) y de la mutante G21 (13b), seleccionada por haber presentado los mejores niveles de producción en este y otros experimentos realizados y por ser representativa del comportamiento mostrado por las demás mutantes G del segundo grupo descrito. Cuando se usó la concentración de glucosa de 18 g/l el máximo crecimiento se alcanzó alrededor de las 48 h dándose posteriormente una disminución de la biomasa, coincidiendo esto con la falta de glucosa en el cultivo. Simultáneamente se dió una suspensión de la síntesis de antraciclinas probablemente debida a la falta de fuente de carbono. Cuando se utilizaron 60 g/l de glucosa, el crecimiento continuó en todas las cepas hasta las 144 horas gracias a la disponibilidad de fuente de carbono a lo largo de la

GLUCOSA 18 g/l

CEPA ORIGINAL



GLUCOSA 60 g/l

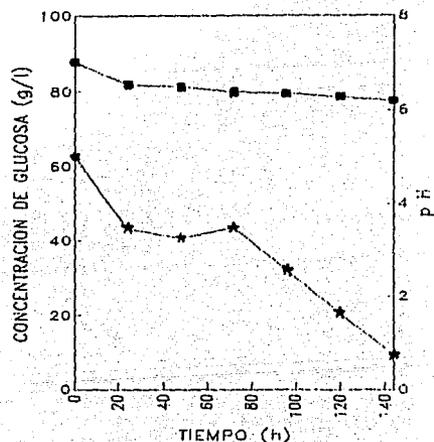
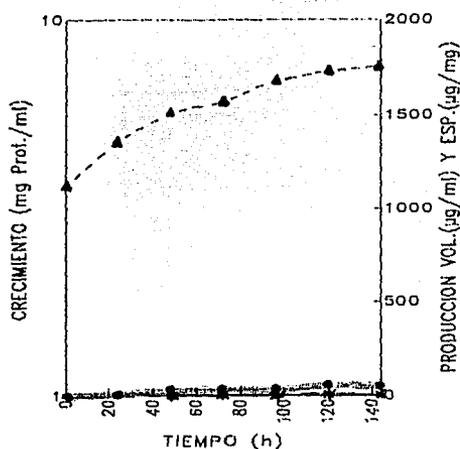
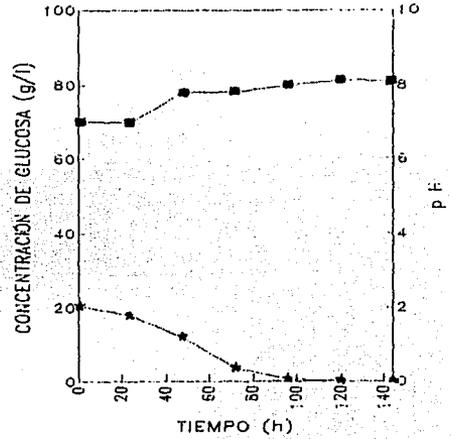
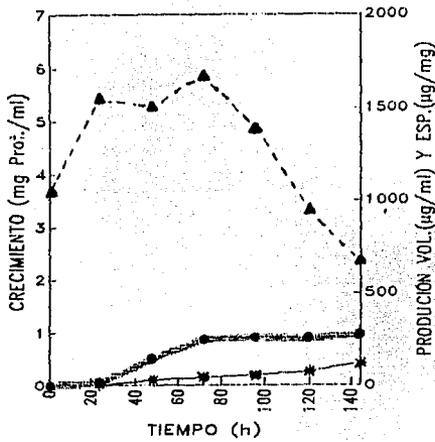


Figura 13 a.- Cinéticas de crecimiento (▲), producción volumétrica (●), producción específica (*), glucosa residual (◆) y pH (■) de la cepa original crecida en el medio de producción con 2 concentraciones de glucosa.

GLUCOSA 18 g/l



GLUCOSA 60 g/l

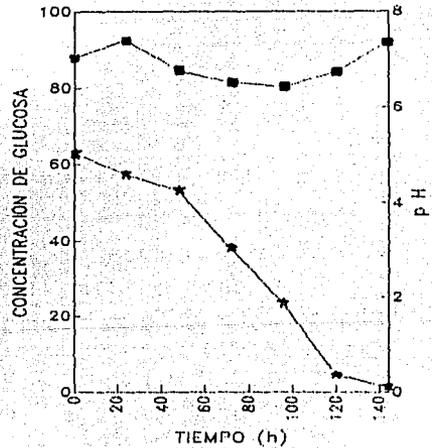
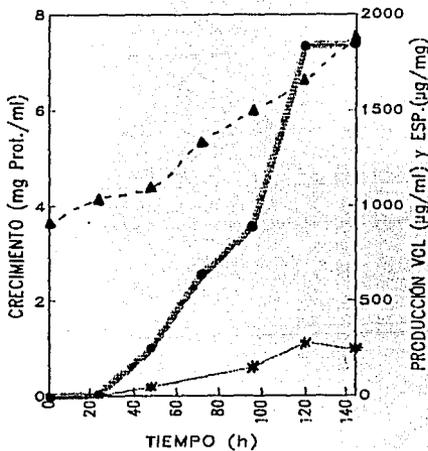


Figura 13 b.- Cinéticas de crecimiento (---), producción volumétrica (●), producción específica (*), glucosa residual (▲) y pH (■) de la cepa G21 crecida en el medio de producción con 2 concentraciones de glucosa.

fermentación. Sin embargo, en la cepa original esto no permitió una mayor producción de antraciclinas por el efecto negativo mencionado. En contraste, en la mutante G21 se canalizó una parte de la glucosa hacia la producción de antraciclinas, lográndose producir de manera continua hasta el momento en que la glucosa está por terminarse. En la cepa original la glucosa se canaliza de manera diferente, como también lo demuestra la disminución en el pH observada en 60 g/l, pues se ha reportado que en cultivos de *S. peucetius* crecidos en glucosa se da esta acidificación por la excreción de piruvato y 2-oxoglutarato (Dekleva y Strohl, 1982). La mutante G21 presentó un comportamiento del pH diferente, sobre todo al utilizar la concentración de glucosa alta. Si bien en esta condición se presentó mayor acidificación que con 18 g/l, ésta no alcanzó los valores de acidez de la cepa original y además el pH aumentó al final de la fermentación.

Dekleva y Strohl (1982), presentaron evidencia de que la inhibición de la producción de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* era en realidad efecto de pH y no una verdadera represión catabólica. En experimentos realizados en el medio de producción modificado, al incrementar la concentración de CaCO_3 se logró un mayor control del pH y una mejor producción. Este resultado apoya este reporte. Sin embargo, al adicionar el análogo de glucosa 2-DOG en un cultivo en el medio mínimo a las 36 horas (final de fase logarítmica), se obtuvo en la cepa silvestre una disminución en la producción específica de antraciclinas, con un patrón de pH igual al control sin adición. Esta disminución también se presentó en la cepa G21 aunque en menor grado (datos no mostrados). Es posible que exista el efecto de pH sobre la síntesis de antraciclinas, pero adicionalmente la glucosa ejerce un efecto a otro nivel.

Dado que existen numerosos reportes que involucran a la enzima glucosa cinasa (Glc) en el mecanismo de represión en *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1982; Seno y Chater, 1983; Ikeda et al., 1984; Angell et al., 1992; Kwakman y Postma, 1994; Angell et al., 1994), se decidió cuantificar la actividad de esta enzima en algunas de las mutantes obtenidas. Se probaron G5, G16, G18, G21 y G22 crecidas en dos

concentraciones de glucosa, 18 y 60 g/l. En la figura 14 se resumen los resultados de este experimento .

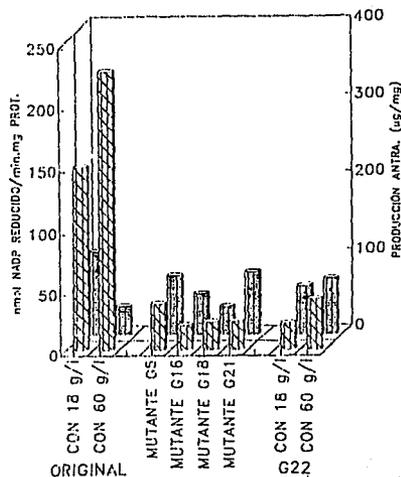


Figura 14.- Actividad de la enzima glucosa cinasa (▨) y producción específica de antraciclinas (▩) en la cepa original y en las mutantes G5, G16, G18, G21 y G22 a las 48 h de crecimiento en medio mínimo con 18 g/l de glucosa. Se presentan adicionalmente los resultados de la cepa original y la mutante G22 con 60 g/l. El comportamiento del resto de las mutantes fue muy similar a esta última).

En las dos concentraciones de glucosa probadas, las mutantes presentaron una baja actividad de esta enzima y no se observó efecto negativo sobre la producción de antraciclinas. En todas las cepas la actividad específica fue mayor en 60 que en 18 g/l. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura para otros *Streptomyces* y permiten concluir que es probable que la enzima Glk también esté involucrada en la represión catabólica por glucosa en este microorganismo.

A pesar de que en mutantes Glk - de *S. coelicolor* no se presentan cambios en el transporte de glucosa (Hodgson, 1982), se decidió medirlo en

algunas de las mutantes obtenidas cuantificando la incorporación de DOG marcada con C¹⁴, esperando fuera transportado por el mismo sistema empleado para la glucosa. Se seleccionaron las cepas G13 (incapaz de utilizar glucosa), G16 y G21. En la figura 15 se presentan los resultados de este experimento.

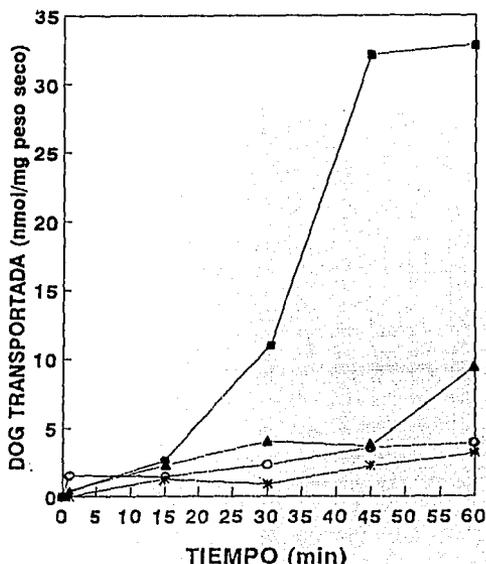


Figura 15.- Transporte del análogo de glucosa 2- desoxi-D-glucosa en la cepa original O (■) y en las mutantes G13 (*), G16 (▲) y G21 (○).

Las cepas G presentaron una incorporación mas lenta de la marca que la cepa original, por lo que es posible que en las 3 mutantes probadas al generarse la mutación que afectó la actividad de Glk simultaneamente se haya afectado algún gen involucrado en el transporte de glucosa, o bien, que la glucosa cinasa esté involucrada en el transporte de glucosa en este microorganismo, a diferencia de lo observado en *S. coelicolor*. Otra

posibilidad sería que la baja actividad enzimática detectada fuera debida a una mutación que afectara el transporte, y que la menor concentración intracelular de glucosa generada fuera la responsable de la baja en Glk, pues los resultados obtenidos demuestran que esta enzima constitutiva también responde a la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo, lo cual también ha sido observado en *S. coelicolor* (Ikeda et al., 1984). Sin embargo, la actividad es demasiado baja como para explicarla en estos términos y además la resistencia a DOG en otros *Streptomyces* generalmente es debida a mutaciones en el gen de glucosa cinasa.

De acuerdo con los datos de transporte, la insensibilidad al efecto de glucosa en las mutantes G de *S. peucetius* podría explicarse simplemente por la generación de una menor concentración de la molécula efectora, si ésta fuera un producto del metabolismo de glucosa. Se ha sugerido que el efector de la represión catabólica en *Streptomyces* podría ser glucosa-6-P, lo que explicaría el papel de la Glk en este fenómeno (Hodgson, 1982). En experimentos con DOG marcada (la cual es capaz de llevar a cabo la represión), se observó que en *S. peucetius* este análogo también es fosforilado, sin que al parecer sufra otra modificación posterior (datos no mostrados), este resultado sugeriría la posibilidad de que el efector fuera glucosa-6-P. Sin embargo, existe evidencia de que el papel de la glucosa cinasa en la represión es regulatorio y no catabólico, ya que otras glucosa cinasas no reestablecen la represión en mutantes de *S. coelicolor* que carecen de la Glk original, a pesar de reestablecer la actividad de fosforilación (Angell et al., 1994). Este papel regulatorio se ha sugerido que podría ser aun mas general y no solo estar relacionado con la represión por glucosa, sino con fenómenos de represión ejercidos por otras fuentes de carbono, como citrato y glutamato, que no son metabolizados via glucosa cinasa (Kuakman y Postma, 1994). Los datos obtenidos de las mutantes G no permiten discernir entre la importancia de la Glk en la represión catabólica por su actividad de fosforilación de glucosa, como molécula regulatoria, o bien como un factor importante en el transporte de glucosa en *S. peucetius* y podría ser diferente al presentado por *S. coelicolor*.

Fusión de protoplastos.

Con la finalidad de reunir en una sola cepa las características de producción de los tres tipos de mutantes obtenidas, se procedió a realizar la fusión de protoplastos de estas cepas.

Cepas GD.

Se decidió fusionar primero las mutantes G21 y D8. La primera fue incapaz de crecer en presencia de doxorubicina y la segunda no creció en el medio con el análogo de glucosa, por lo que se decidió seleccionar a las cepas producto de la fusión en medio con doxorubicina + DOG + glicerol.

La frecuencia de aparición de colonias con resistencia a los dos agentes selectivos dentro de la población de protoplastos regenerados fue de 2.35×10^{-3} . De estas colonias se seleccionó a aquéllas que presentaron una mayor resistencia a doxorubicina ($25 \mu\text{g/ml}$) y la coloración mas intensa en caja (mayor producción de antraciclinas). Estas cepas se probaron posteriormente en el medio de producción con 60 g/l de glucosa y 0.3 g/l de K_2HPO_4 (concentraciones mas adecuadas para la cepa G21). Los resultados de producción a las 144 h se ilustran en la figura 16. Como controles se utilizaron las cepas G21 y D8 en el mismo medio de cultivo y la cepa original con 18 g/l de glucosa (concentración que permite la mayor producción), con la finalidad de comparar los máximos niveles alcanzados por modificación de la concentración de glucosa con los de las nuevas cepas obtenidas. Las 11 cepas GD probadas presentaron niveles de producción similares entre si, tanto en este experimento como en repeticiones posteriores. La producción en todas las pruebas realizadas fue mayor que la de las cepas parentales. Sin embargo, y de manera inesperada, la D8 presentó una producción de antraciclinas considerablemente mayor a la obtenida en experimentos anteriores, e incluso alcanzó los títulos de las fusantes, aunque a tiempos posteriores (datos no mostrados). La D8 nunca había sido probada en concentraciones de glucosa altas, pues se había asumido que su comportamiento en estas condiciones sería similar al de la cepa original, ya que el método de selección de esta mutante no guarda relación aparente con este fenómeno regulatorio, y su sensibilidad al

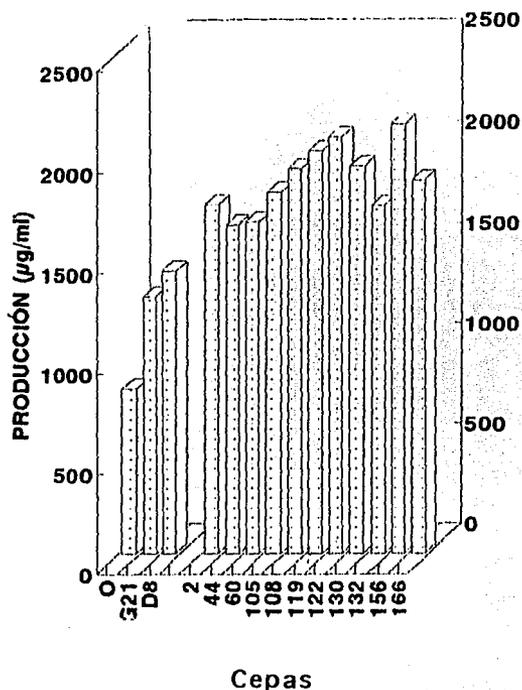


Figura 16.- Comparación de la producción de antraciclinas de las cepas GD, producto de la fusión de las mutantes G21 y D8. Los datos corresponden a las 144 h en el medio de producción modificado con 60 g/l de glucosa y reactivos grado industrial. Se ilustra únicamente el resultado de las mejores cepas obtenidas.

análogo de glucosa fue igual a la de la cepa original. A pesar de este hecho, las cepas GD presentaron mejores características de producción que las cepas que les dieron origen, sobre todo en términos de productividad (μg de antraciclinas/h). Con base en los resultados de este experimento y repeticiones, se seleccionó a la GD119 para fusionarla con P11.

Cepas GDP.

Las cepas GDP se seleccionaron en medio con doxorubicina + desoxiglucosa + glicerol + 30mM de fosfato. En este medio la mutante P11 fue incapaz de crecer y la GD119 presentó una coloración clara. Como

producto de la fusión de estas dos cepas se obtuvieron algunas con una coloración roja intensa en el medio de selección. Con estas cepas se utilizó un segundo criterio de selección creciéndolas posteriormente en cajas con medio de producción. Las colonias que presentaron la coloración mas intensa fueron probadas en líquido.

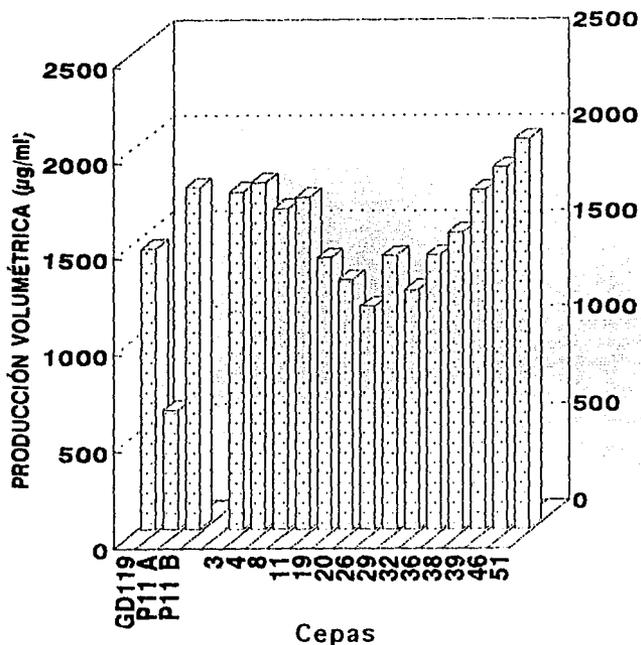


Figura 17.- Comparación de la producción de antraciclinas de las cepas GDP, producto de la fusión de la cepa GD119 y la mutante P11. Los datos corresponden a las 144 h en el medio de producción modificado con 60 g/l de glucosa y reactivos grado industrial. Las antraciclinas de la mutante P11 se cuantificaron en medio con 18 g/l de glucosa (P11A) y con 60 g/l (P11B). Se ilustra únicamente el resultado de las mejores cepas obtenidas.

En la figura 17 se ilustran los niveles de producción alcanzados con las cepas GDP en medio con 60 g/l de glucosa. Como controles se usaron las dos cepas parentales en el mismo medio. Adicionalmente se probó la

cepa P11 en concentración baja de glucosa. Al igual que la cepa D8 y por las mismas razones, la cepa P11 no había sido probada en medio con glucosa alta. Esta, contrariamente a lo esperado, también presentó una estimulación de la producción con 60 g/l de glucosa, a pesar de ser una cepa diferente de las mutantes G. Al igual que D8, siguió siendo sensible al análogo de glucosa.

Sobre la razón por la cual en estas dos cepas no se presenta el efecto negativo de glucosa, solo se sabe que la o las mutaciones generadas son diferentes a la que presentan las cepas G, como la indica la sensibilidad a DOG. Es posible que P11 y D8, al sobreproducir antraciclinas canalicen de manera diferente la fuente de carbono, evitando así la acumulación de algún efector o componente del sistema de represión, aunque en *S. coelicolor* los productos del metabolismo de glucosa parecen no tener importancia en este fenómeno y la enzima glucosa cinasa desempeña mas bien un papel regulatorio (Kwakman y Postma, 1994; Angell et al., 1994). Otra posibilidad es que de esta manera se impida la disminución en el pH, que se sabe repercute en la producción de antraciclinas, aunque el efecto por glucosa no es debido únicamente al pH. Para concluir sobre este resultado inesperado es necesario continuar con la caracterización de estas mutantes y contar con mas información sobre el mecanismo de represión catabólica en *Streptomyces*.

Algunas de las cepas GDP presentaron producciones mayores que las de las cepas de las que se originaron. Aunque las diferencias no son muy grandes, en repeticiones de este experimento con las mutantes GDP46 y 51 se lograron producciones de hasta 2300 $\mu\text{g/ml}$, las cuales no han sido alcanzadas por ninguna otra cepa de las utilizadas en este trabajo. Es importante hacer notar que en cajas con el medio de producción estas dos cepas mostraron aun mayor diferencia con respecto al resto de las mutantes, por lo que es posible que con modificaciones en el medio o condiciones de cultivo se alcancen en el medio líquido aun mejores producciones.

Pensando en esta posibilidad, se realizaron modificaciones del medio producción, alterando las concentraciones de glucosa, extracto de

levadura, carbonato de calcio. En ninguno de los medios probados fue posible aumentar la producción de antraciclinas de la cepa GDP51 (datos no mostrados), sin embargo se considera conveniente continuar con la selección y optimización de medios para encontrar uno mas adecuado para estas cepas. Algo que resultó claro en estos experimentos fue que las concentraciones de los componentes del medio requeridas para una producción óptima en las mutantes son muy diferentes a los requerimientos de la cepa original.

En pruebas adicionales que se realizaron con las mejores cepas obtenidas (figura 18), se observó que las producciones fueron muy diferentes dependiendo del grado de pureza de los componentes del medio de cultivo. Al utilizar reactivos grado analítico (a excepción de la levadura de cerveza que en todos los casos fue de grado industrial), las producciones alcanzadas por todas las cepas fueron muy inferiores con respecto a las logradas con los reactivos grado industrial. Esto podría deberse a la presencia de algún compuesto en éstos últimos, que presentan una menor pureza, que de alguna manera favorece la síntesis de antraciclinas. La producción mas alta fue de 580 μg de antraciclinas/ml y correspondió a la cepa GDP51. En estas condiciones, se observaron mayores diferencias entre las cepas producto de la fusión de protoplastos con respecto a las cepas que les dieron origen, hecho que demuestra que existen diferencias en cuanto a las características de producción de las distintas mutantes y permite concluir que con la fusión de protoplastos se lograron reunir en una sola cepa características que en conjunto permiten mejores producciones.

Por los resultados obtenidos es recomendable que, para la selección de la cepa mas adecuada para la producción de doxorrubicina, se evalúen distintas condiciones de producción, incluyendo en esta evaluación no solo concentraciones de los componentes sino inclusive el origen de éstos.

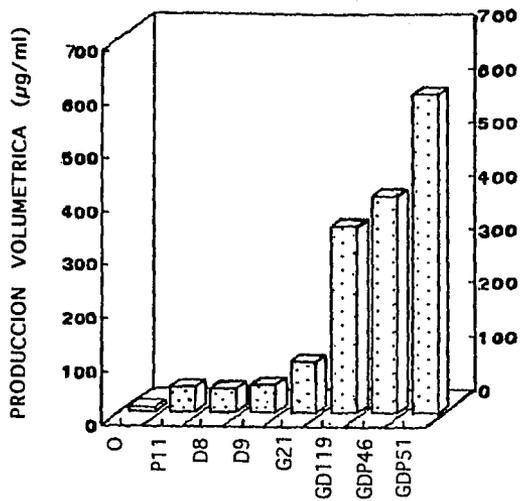


Figura 18.- Comparación de la producción de antraciclinas de las mejores mutantes en el medio de producción original con reactivos grado analítico. El resultado ilustrado corresponde a las 96 h (máxima productividad).

CONCLUSIONES

- Las mutantes seleccionadas por su resistencia al efecto negativo de fosfato (cepas P) resultaron menos sensibles que la cepa original, aunque siguieron siendo afectadas en concentraciones altas de este compuesto.
- Algunas de las mutantes P sobreprodujeron antraciclinas con respecto a la cepa original en el medio de producción, tanto en concentración alta como en baja de fosfato.
- La selección de mutantes (cepas D) con mayor resistencia a doxorubicina que la cepa silvestre permitió obtener cepas sobreproductoras del anticancerígeno.
- Algunas de las mutantes D sobreprodujeron antraciclinas, tanto en concentración baja como alta de glucosa, presentándose incluso una estimulación de la producción en esta última condición y a pesar de seguir siendo sensibles al análogo DOG.
- La asimilación de glicerol, lactosa, galactosa y fructosa fue afectada negativamente por el análogo DOG, sugiriendo que la glucosa interviene en algún mecanismo de control sobre la asimilación de estas fuentes de carbono en este microorganismo.
- La glucosa también ejerció un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas en concentraciones mayores al 6 %.
- Las mutantes seleccionadas por su capacidad de utilizar glicerol, fructosa, lactosa o galactosa en presencia de DOG (cepas G) presentaron una pérdida de la regulación general por glucosa en varios procesos celulares y sobreprodujeron antraciclinas en el medio de producción, tanto en concentración baja como en alta de glucosa.

- La mayoría de las mutantes G siguieron siendo capaces de utilizar la glucosa del medio de cultivo, aunque a una velocidad menor.
- Al igual que lo reportado en *S. coelicolor* A(3)2, las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes a DOG presentaron una actividad de glucosa cinasa disminuida. La actividad específica de esta enzima respondió a la concentración de glucosa presente en el medio. Así, la G1k probablemente esté implicada en el mecanismo regulatorio por glucosa en este microorganismo.
- El transporte de DOG, y probablemente el de glucosa, en al menos 3 de las mutantes G, fue menor al cuantificado en la cepa original.
- La fusión de protoplastos de los 3 tipos de mutantes obtenidas permitió la generación de cepas que produjeron una mayor cantidad de antraciclinas.
- La composición del medio de cultivo tuvo un efecto importante sobre los niveles de producción alcanzados por las diferentes mutantes.

BIBLIOGRAFIA

Ajito, K., S. Atsumi, D. Ikeda, S. Kondo, T. Takeuchi, K. Umezawa. 1989. Inhibition of human immunodeficiency virus-associated reverse transcriptase by 14-O-acyladriamycins. *J. Antibiot.* 42: 611-619.

Angell, S., C. G. Lewis, M. J. Buttner, M. J. Bibb. 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244: 135-143.

Angell, S., E. Schwarz, M. J. Bibb. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844.

Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla. 1969. 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 11:1101-1110.

Arcamone, F., G. Franceschi, S. Penco. 1969. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin) a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 13: 1007-1010.

Arcamone, F. 1981. Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. Academic Press.

Baltz, R. H. 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 107: 93-102.

Baltz, R., P. Matsushima. 1981. Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 127: 137-146.

Bartel, P. L., N. C. Connors, W. R. Strohl. 1990. Biosynthesis of anthracyclines: analysis of mutants of *Streptomyces* sp. strain C5 blocked in daunomycin biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1877-1886.

Blum R. H., S. K. Carter. 1974. Adramycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Int. Med.* 80: 249-259.

Carter, S. K. 1975. Adriamycin - A review. *J. National Cancer Inst.* 55: 1265-1274.

Colombo, A. L., M. M. Solinas, G. Perini, G. Biamonti, G. Zanella, M. Caruso., F. Torti, S. Felippini, A. Inventi-Solari, L. Garofano. 1992. Expression of doxorubicin-daunorubicin resistance genes in different anthracycline mutants of *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* 174: 1641-1646.

Connors, N. C., P. L. Bartel, W. R. Strohl. 1990. Biosynthesis of anthracyclines: enzymic conversion of aklanonic acid to aklavinone and E-rodomycinone by anthracycline-producing streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1887-1894.

Connors, N. C., P. L. Bartel, W. R. Strohl. 1990. Biosynthesis of anthracyclines: carminomycin 4-O-methyltransferase, the terminal enzymic step in the formation of daunomycin. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1895-1898.

Dekleva, M. L., J.A. Titus, W. R. Strohl. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31: 287-294.

Dekleva M. L., W. R. Strohl. 1987. Glucose stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can J. Microbiol.* 33: 1129-1132.

Delic, V., D. A. Hopwood, E. J. Friend. 1970. Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mut. Res.* 9: 167-182.

Di Marco, A., F. Arcamone, F. Zunino. 1975. Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action, pp. 101-128. En J. W. Corcoran , F. E. Hahn (Eds.), Antibiotics, Vol. 3. Springer Verlag, New York,

Donadio, S., M. J. Staver, J. M. McAlpine, S. J. Swanson, L. Katz. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science.* 252: 675-679.

Eckardt T., J. Strickley, L. Gorniak, W. Burnett, L. R. Fare. 1987. Characterization of the promoter signal sequence and amino terminus of a secreted β -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 169: 4249-4256.

Esser, K., G. Dohmen. 1987. Drug resistance genes and their use in molecular cloning. *Process Biochem.* 22: 144-148.

Grein, A. 1981. Development of biosynthetic anthracyclines of the daunorubicin group by genetic and fermentation studies. *Process Biochem.* 12: 246.

Grein, A. 1987. Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* 32: 203-215.

Guilfoile, P. G., C. R. Hutchinson. 1991. 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* 88: 8553-8557.

Hindle, Z., C. P. Smith. 1994. Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12: 737-745.

Hodgson, D. 1982. Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2417-2430.

Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, M. D. Ward, H. Schrempf. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual. The John Innes Foundation. Norwich, United Kingdom.

Huk, B., M. Blumauerova. 1989. Streptomycetes producing daunomycin and related compounds: do we know enough about them after 25 years?. *Folia Microbiol.* 34: 324-349.

Hutchinson, C. R.

Ikeda, H., E. T. Seno, C. J. Bruton, K. F. Chater. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.

Kuakman, J. H. J. M., P. W. Postma. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176: 2694-2698.

Madduri, K., F. Torti, A. L. Colombo, C. R. Hutchinson. 1993. Cloning and sequencing of a gene encoding carminomycin 4-O-methyltransferase from *Streptomyces peucetius* and its expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 3900-3904.

McGuire, J. C., B. K. Hamilton, R. J. White. 1979. Approaches to development of the daunorubicin fermentation. *Process Biochem.* 12: 2-5.

Nakashima, H., N. Yamamoto. 1987. Inhibition of human immuno-deficiency virus (HIV) infection and replication in vitro. *J. Antibiot.* 40: 396-399.

Okanishi, M., K. Susuki, H. Umezawa. 1974. Formation and reversion of streptomycetes protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* 80: 389-400.

Otten, S. L., K. J. Stutzman-Engwall, C. R. Hutchinson. 1990. Cloning and expression of daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *S. peucetius* subsp. *caesius*. *J. Bacteriol.* 172: 3427-3434.

Pandey, R. C., C. C. Kalita, R. J. White, M. W. Toussaint. 1979. Process development in the purification of daunorubicin from fermentation broths. *Process Biochem.* 14: 6-13.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seno, E. T., K. F. Chater. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129: 1403-1413.

Simpkins, H., L. F. Pearlman, L. M. Thompson. 1984. Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. *Cancer Res.* 44: 614-618.

Smith, T. H., A. N. Fujiwara, D. W. Henry, W. W. Lee. 1976. Synthetic approaches to adriamycin. Degradation of daunorubicin to nonasymmetric tetracyclic ketone and refunctionalization of the A-ring to adriamycin. *J. Am. Chem Soc.* 98:1969-1971.

Smith, T. H., A. N. Fujiwara, D. W. Henry, W. W. Lee. 1977. Synthesis of adriamycin and 7,9-epiadriamycin. Patente de los Estados Unidos No. 4,012,448.

Strohl, W. R., N. C. Connors. 1992. Significance of anthraquinone formation resulting from the cloning of actinorodin genes in heterologous streptomycetes. *Mol. Microbiol.* 6: 147-152.

Stutzman-Engwall, K. L., C. R. Hutchinson. 1989. Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3135-3139.

Stutzman-Engwall, K. J., S. L. Otten, C. R. Hutchinson. 1992. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* 174: 144-154.

Summer, B. 1944. Determination of inorganic phosphate. *Science*. 100: 413.

Susuki, F., S. Trenbeath, R. D. Gleim, C. J. Sih. 1978. Total synthesis of adriamycinone. Regiospecific synthesis of anthracyclines via base catalyzed cyclizations. *J. Am. Chem Soc.* 100: 2272-2273.

Tritton, T. R., A. Yee. 1982. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cell. *Science*. 217: 248-250.

Vanék, Z., J. Tax, I. Komersová, P. Sedmera, J. Vokoun. 1977. Anthracyclines. *Folia Microbiol.* 22: 139-159.

Vigevani, A., M. J. Williamson. 1980. Doxorubicin, p. 245-274. *En K. Florey* (ed.), *Analytical Profiles of Drugs Substances*, vol. 9. Academic Press.

Wagner, C., K. Eckardt, W. Ihn, G. Schumann, C. Stengel, W. F. Fleck, D. Tresselt. 1991. Biosynthese der anthracycline: eine neuinterpretation der ergebnisse zur daunomycin-biosynthese. *J. Basic Microbiol.* 31: 223-240.

White, R. J. R. M. Stroshane. 1984. Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis and fermentation, p.569-594. *En E. J. Vandame* (ed.), *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, vol. 22. Marcel Dekker, Inc., New York.

Ye, J., M. L. Dickens, R. Plater, Y. Li, J. Lawrence, W. R. Strohl. 1994. Isolation and sequence analysis of polyketide synthase genes from the daunomycin-producing *Streptomyces* sp. strain C5. *J. Bacteriol.* 176: 6270-6280.