



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Anthracycline biosynthesis in *Streptomyces*: engineering, resistance and antimicrobial activity

Hulst, M.B.

Citation

Hulst, M. B. (2024, June 20). *Anthracycline biosynthesis in Streptomyces: engineering, resistance and antimicrobial activity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3764194>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3764194>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Nederlandse samenvatting

Actinomyceten vormen een diverse fyllum van meercellige Gram-positieve bacteriën. Deze bacteriën zijn bekend omdat ze veel bioactieve metabolieten produceren, die veelal worden gebruikt als medicijnen voor mensen, dieren en planten. Een belangrijke groep van metabolieten die worden geproduceerd door actinomyceten zijn de anthracyclines. Anthracyclines zijn belangrijke antikankermedicijnen, ondanks dat ze ernstige bijwerkingen hebben. Sinds hun ontdekking in de jaren 1950 is er veel werk gedaan aan het ontwikkelen van anthracyclines met nog betere antikanker activiteit en minder bijwerkingen. Sindsdien zijn er meer dan 500 anthracyclines geïsoleerd uit actinomyceten, waarvan alleen daunorubicine (Dauno), doxorubicine (Doxo) en aclarubicine (Acla) momenteel in de kliniek worden gebruikt. Daarnaast zijn er enkele semisynthetische varianten gemaakt die ook met succes zijn geïntroduceerd in de kliniek.

Recentelijke nieuwe inzichten in de werkingswijze van anthracyclines hebben hernieuwde interesse gewekt in deze belangrijke groep van antikankermedicijnen (**Hoofdstuk 2**). Eén van de meest veelbelovende verbindingen is *N,N*-dimethyldoxorubicine (DMdoxo), een hybride structuur van de aglycon van Doxo met de aminosuiker van Acla die is gemaakt via semi-synthese. DMdoxo heeft sterke cytotoxische activiteit maar veroorzaakt geen cardiotoxiciteit, wat de meest acute en behandeling beperkende bijwerking van Doxo is. Een evaluatie van een grote collectie van anthracyclines wees uit dat de aanwezigheid van een tertiaire amine op de eerste suikergroep van een anthracycline over het algemeen leidt tot minder DNA-beschadigende activiteit, wat geassocieerd is met cardiotoxiciteit, de meest beperkende bijwerking van anthracyclines. Tegelijkertijd is de cytotoxische activiteit juist sterker bij deze moleculen. Deze resultaten zijn veelbelovend voor de ontwikkeling van nog meer anthracyclines met sterke antikanker activiteit en beperkte bijwerkingen.

Op dit moment wordt Doxo geproduceerd via een combinatie van microbiële fermentatie en organische chemie. In de eerste stap wordt Dauno biosynthetisch gemaakt via fermentatie van een *Streptomyces peucetius*. Vervolgens wordt het biosynthetische Dauno omgezet in Doxo via chemische 14-hydroxylering. In principe kan Doxo ook volledig biosynthetisch worden verkregen, maar de laatste enzymatische stap in het proces is erg inefficiënt, wat resulteert in lage opbrengsten.

Voor de productie van DMdoxo als antikankermedicijn zou biosynthese een aantrekkelijke optie zijn, maar het wordt niet door bacteriën geproduceerd. Daarom was het eerste doel van deze studie om de biosyntheseroute van Doxo in *S. peucetius* zo aan te passen dat er *N,N*-gedimethyleerde anthracyclines kunnen worden gemaakt (**Hoofdstuk 3**). Tijdens dit proces kwamen er verschillende uitdagingen naar voren, die leidden tot vervolgstudies naar resistentiemechanismen tegen anthracyclines in *Streptomyces* (**Hoofdstuk 4**) en potentiële toepassingen van anthracyclines met beperkte bijwerkingen als antibiotica (**Hoofdstuk 5**). Tenslotte is er een methode ontwikkeld voor gecombineerde proteoom- en metaboolanalyse van kleinschalige *Streptomyces* culturen om toekomstig onderzoek van streptomyceten als productiestammen te versnellen (**Hoofdstuk 6**).

Uitdagingen voor de biosynthese van *N,N*-gedimethyleerde anthracyclines

Het combineren van anthracycline biosyntheseroutes uit verschillende streptomyceten is veel toegepast om hybride anthracyclines te genereren. Met name de Acla-producerende bacterie *Streptomyces galilaeus* is veel bestudeerd, waarbij voornamelijk enzymen zijn geïntroduceerd die de latere stappen in de anthracycline biosyntheseroutes katalyseren. Daarnaast zijn genen die betrokken zijn bij anthracycline biosynthese tot expressie gebracht in heterologe gastheren, zoals *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces coelicolor* en *Streptomyces lividans*, die van nature zelf geen anthracyclines produceren.

Om de biosynthese van DMdauno en DMdoxo te realiseren hebben we de biosyntheseroute voor Doxo in de industriële *S. peucetius* stam G001 aangepast (**Hoofdstuk 3**). Allereerst hebben we de methyltransferasegenen die nodig zijn voor de productie van TDP-L-rhodosamine en de glycosyltransferasegenen van *S. galilaeus* geïntroduceerd in G001. Vervolgens hebben we het Doxo glycosyltransferasegen *dnrS* verwijderd om de productie van niet-gemethyleerde anthracyclines te stoppen. Daarna hebben we het rhodomycine methyltransferasegen *rdmC* geïntroduceerd, wat resulteerde in de succesvolle productie van DMdauno, zij dat de stam slechts beperkte hoeveelheden produceerde.

De resultaten toonden aan dat de aanwezigheid van de gedimethyleerde suikergroep de drie opeenvolgende hydroxylatiereacties remt die nodig zijn om de aglycon van Doxo te vormen. Deze reacties worden gekatalyseerd door de cytochroom P450-monooxygenase DoxA, een enzym dat uniek is voor Doxo biosynthese. Het is al lang bekend dat de uiteindelijke reactie in de biosyntheseroute van Dauno naar Doxo zeer inefficiënt is, wat ook de reden is waarom Doxo in de industrie semisynthetisch wordt geproduceerd vanuit Dauno. Het blijkt dat de gedimethyleerde verbindingen nog slechter worden omgezet door DoxA dan de natuurlijke substraten. Het is dus duidelijk dat DoxA een bottleneck is als we DMdoxo willen maken via biosynthese. Een mogelijke oplossing zou kunnen zijn om DoxA te modificeren voor verbeterde activiteit. Aangezien de structuur van DoxA niet bekend is, is het moeilijk om te voorspellen welke mutaties een verbeterde activiteit zouden kunnen opleveren. Anderzijds zouden high-throughput methoden met willekeurige of modelgeleide mutagenese succesvol kunnen zijn bij het identificeren van DoxA-varianten met verbeterde activiteit. Een ander mogelijk beperkende factor voor DMdoxo biosynthese is de sterkere toxiciteit van *N,N*-gedimethyleerde anthracyclines voor *S. peucetius* in vergelijking met de niet-gedimethyleerde varianten. Dit motiveerde ons om resistentiemechanismen tegen anthracyclines in *Streptomyces* te onderzoeken.

Cryptische anthracycline resistentiegenen in *Streptomyces*

Biosynthetische genclusters (BGC's) voor toxische metabolieten coderen vaak ook zelf-resistentie. Anthracycline BGC's bevatten meestal ATP-bindende cassette (ABC) transportergenen die zorgen voor de export van deze toxische metabolieten. Over het algemeen bevatten actinomyceten ook zeer specifieke resistentiemechanismen tegen antibiotica die ze tegenkomen in het milieu. In **Hoofdstuk 4** hebben we resistentie tegen anthracyclines in actinomyceten bestudeerd door middel van een screening van onze stammencollectie en met behulp van evolutie experimenten.

De screening van onze MBT-collectie van actinomyceten liet zien dat resistentiemechanismen tegen anthracyclines relatief vaak voorkomt, maar dat alle stammen zeer gevoelig zijn voor DMdoxo. Vervolgens werden een aantal streptomyceten blootgesteld aan steeds hogere concentraties DMdoxo in een evolutie-experiment, wat resulteerde in sterk verhoogde anthracycline resistentie al na vijf generaties. Transcriptoomanalyse van een DMdoxo-resistente *S. lividans* TK24 stam toonde aan dat de expressie van twee paren van ABC-transportergenen, *cdtAB* en *sclAB*, sterk was verhoogd. CdtAB en SclAB zijn homoloog aan de DrrAB-transporter in het Dauno BGC die zorgt voor export van Dauno en Doxo. Daarnaast vonden we mutaties in de promotorregio's van *cdtAB* en *sclAB*, en ook in de coderende regio's van de corresponderende regulatiegenen *cdtR* en *sclR*. SclAB is eerder geïdentificeerd in een evolutie-experiment waar *S. lividans* werd blootgesteld aan het macrolide antibioticum spiramycine. Het verwijderen van het corresponderende TetR-familie regulatiegen, *sclR*, of overexpressie van *sclAB* zorgde voor milde resistentie tegen verschillende antibiotica, waaronder Dauno. Onze studie laat zien dat zowel CdtAB als SclAB bijzonder sterke resistentie bieden tegen anthracyclines. Het introduceren van expressiecassettes met *cdtAB* of *sclAB*, of het uitschakelen van *cdtR* of *sclR* in de originele stam, resulteerde in een meer dan achtvoudige toename van resistentie tegen zowel Doxo als het sterkere antibioticum DMdoxo. Homologen van de CdtAB- en SclAB-transporters komen vaak voor binnen de familie van *Streptomyetaceae*, en de aanwezigheid is niet gecorreleerd met het voorkomen van mogelijke anthracycline BGC's.

Interessant genoeg werd in *S. lividans* de expressie van de transporters niet direct geactiveerd tijdens blootstelling aan anthracyclines, maar alleen via de accumulatie van spontane mutaties na langdurige blootstelling aan de toxische verbinding DMdoxo. Deze bevindingen tonen aan dat *Streptomyces* genomen niet alleen cryptische BGC's bevatten die nog onbekende bioactieve metabolieten kunnen coderen, maar ook cryptische resistentiemechanismen.

Potentiële antimicrobiële toepassingen van anthracyclines met beperkte bijwerkingen

Hoewel anthracyclines oorspronkelijk zijn ontdekt vanwege hun antimicrobiële activiteit, worden ze niet gebruikt als antibiotica doordat ze ernstige bijwerkingen hebben. Recentelijk verkregen inzichten in de ontwikkeling van anthracyclines met beperkte bijwerkingen kunnen ervoor zorgen dat er wel een mogelijkheid is om anthracyclines als antibiotica te gaan gebruiken. Aangezien actinomyceten zeer gevoelig zijn voor DMdoxo, een veelbelovende anthracycline met beperkte bijwerkingen, besloten we om de antimicrobiële activiteit van anthracyclines verder te onderzoeken.

In **Hoofdstuk 5** is een collectie van anthracyclines getest op mogelijke bioactiviteit tegen ESKAPE pathogenen. *N,N*-gedimethyleerde anthracyclines vertoonden bactericide activiteit tegen Gram-positieve bacteriën en de Gram-negatieve *A. baumannii*. Met name DMdoxo en een *N,N*-gedimethyleerde Doxo variant met drie suikergroepen lieten de sterkste antimicrobiële activiteit zien. Het is belangrijk om te vermelden dat we geen ontwikkeling van resistentie tegen Doxo en DMdoxo observeerden in methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).

De aanwezigheid van een tertiaire amine op de eerste suikergroep van anthracyclines leidt over het algemeen tot het verlies van DNA-beschadigende activiteit, wat geassocieerd is met cardiotoxiciteit, een ernstige bijwerking van anthracyclines die de toepassing beperkt. Onze resultaten laten zien dat dit ook correleert aan verbeterde antibioticum activiteit. Het mechanisme dat zorgt voor de antimicrobiële activiteit van anthracyclines is nog steeds niet erg duidelijk, al is recentelijk aangetoond dat idarubicine zich richt op het celmembraan en de bacteriële topoisomerase II. Het zou interessant zijn om het antimicrobiële werkingsmechanisme van anthracyclines beter te begrijpen en met name de factoren die bijdragen aan de verbeterde activiteit van gedimethyleerde anthracyclines. Hoewel gedimethyleerde anthracyclines verminderde toxiciteit hebben, zullen ook de beperkte bijwerkingen ervoor zorgen dat ze niet als eerstelijnsantibiotica worden gebruikt. In plaats daarvan zien we vooral een toepassing in levensbedreigende situaties, zoals bij de bestrijding van sepsis.

High-throughput analyse van *Streptomyces* culturen

Streptomyceten blijven een belangrijke bron van nieuwe bioactieve metabolieten. Om de ontdekking van deze metabolieten te versnellen, zijn high-throughput methoden nodig om grote stammencollecties onder veel verschillende experimentele omstandigheden te onderzoeken. De morfologie van streptomyceten in vloeibare culturen zorgt vaak voor een sterke heterogeniteit in experimentele waarden. Het is belangrijk om reproduceerbare kleinschalige culturen van *Streptomyces* te bereiken. Dit kan bijvoorbeeld door goed na te denken welk inoculum wordt gebruikt, alsmede over de experimentele omstandigheden.

In **Hoofdstuk 6** wordt een methode beschreven waarbij kwantitatieve proteoom- en metaboolanalyse van *Streptomyces* worden gecombineerd. Deze zijn uitgevoerd in goed gecontroleerde microbioreactor (MBR) culturen. Onze resultaten laten zien dat er uit dergelijke kleinschalige culturen betrouwbare en sensitieve data kan worden verkregen. Verdere optimalisatie van de methode is echter vereist om biologische variatie verder te verminderen. Deze methode kan worden toegepast in de zoektocht naar nieuwe bioactieve metabolieten die door streptomyceten worden geproduceerd.

Vooruitzicht

Anthracyclines vormen al decennia een belangrijke basis voor medicijnen die worden toegepast in de oncologie. Het is belangrijk om meer te weten te komen over de biosynthese en bioactiviteiten van anthracyclines voor de ontwikkeling van nieuwe antikankermedicijnen en antibiotica.

Het combineren van biosyntheseroutes voor anthracyclines zoals die in verschillende streptomyceten is een effectieve aanpak gebleken voor het genereren van hybride moleculen. Expressie van genen uit de biosynthese routes voor aclarubicine en rhodomycine in *S. peucetius* leidde tot de biosynthese van *N,N*-gedimethyleerde anthracyclines en met name DMdauno. Een vergelijkbare aanpak zou kunnen worden toegepast voor de biosynthese van andere interessante anthracyclines, zoals de *N,N*-gedimethyleerde Doxo variant met drie suikergroepen die krachtige antimicrobiële activiteit vertoonde tegen ESKAPE pathogenen. Bovendien zou

het interessant zijn om de mogelijke anthracycline BGC's te bestuderen die aanwezig zijn in verschillende *Streptomycetaceae*.

N,N-gedimethyleerde anthracyclines vertonen sterke bioactiviteit tegen Gram-positieve bacteriën, waaronder actinomyceten. Hoewel deze ontdekking een veelbelovend perspectief is voor de mogelijke toepassingen van anthracyclines als antibiotica, blijft een belangrijke vraag wat de het mechanisme erachter precies is. Het bestuderen van de opnamen van anthracyclines via microscopie zou waardevolle inzichten kunnen opleveren, waarbij gebruik kan worden gemaakt van het feit dat anthracyclines van zichzelf fluorescent zijn.. Bovendien kan het bestuderen van de structuur-activiteit relatie nieuwe inzichten verschaffen in de factoren die bijdragen aan de antimicrobiële activiteit van gedimethyleerde anthracyclines. Ten slotte kunnen deze inzichten helpen bij de rationele engineering van anthracyclines voor effectievere antikanker-medicijnen en antibiotica.