

Grupo de biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos (BIOMIC)

José Antonio Salas Fernández y Carmen Méndez Fernández



Universidad de Oviedo



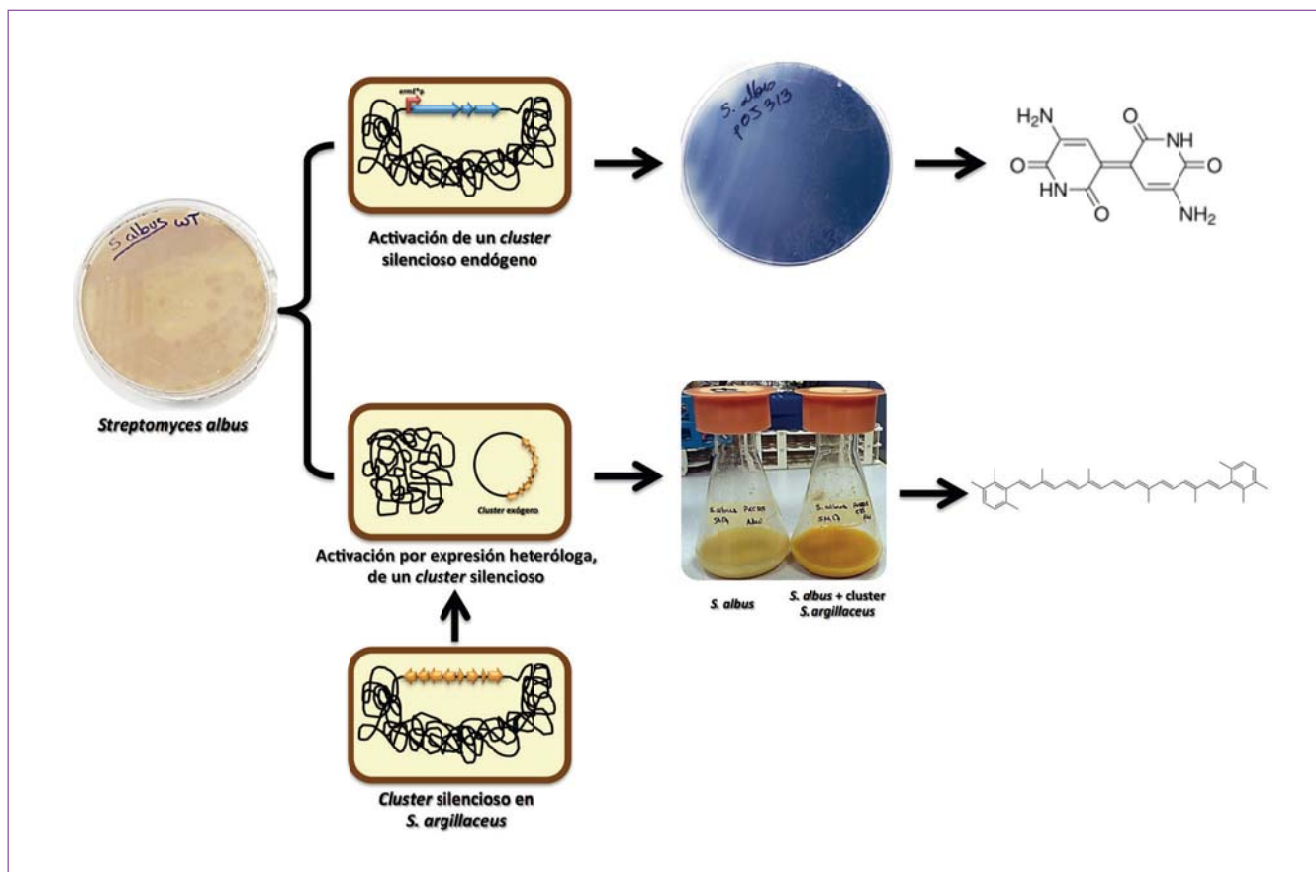
Primera fila desde la izquierda: Adriana Becerril García, Leire Peña Noval, Suhui Ye Huang, Carmen Méndez Fernández, Mónica Gómez Malmierca, Rubén Álvarez Álvarez, Ana Cenicerros Medrano
Segunda fila desde la izquierda: Ignacio Montero Ordóñez, José Antonio Salas Fernández, Carlos Olano Álvarez, Armando Álvarez Losada, Alma M^a Botas Muñoz, Raúl García Salcedo, Jorge Fernández de la Hoz

El grupo de "Biosíntesis de compuestos bioactivos por microorganismos (BIOMIC)" pertenece al Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional y al Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A.) de la Universidad de Oviedo. Está ubicado en la Facultad de Medicina y está coordinado por los Catedráticos de Universidad José Antonio Salas Fernández y Carmen Méndez Fernández. Además el Dr. Carlos Olano (Investigador del I.U.O.P.A.), miembro del mismo desde su creación oficial, codirige distintos proyectos de investigación. Otros miembros del grupo en la actualidad son seis investigadores postdoctorales (Raúl

García Salcedo, Mónica Gómez Malmierca, Rubén Álvarez Álvarez, Alma M^a Botas Muñoz, Suhui Ye Huang y Ana Cenicerros Medrano), tres doctorandos (Armando Álvarez Losada, Adriana Becerril García y Jorge Fernández de la Hoz) y una técnica de laboratorio (Leire Peña Noval).

Desde su creación, el grupo está interesado en el estudio de distintos aspectos relacionados con la biosíntesis de compuestos bioactivos en los microorganismos productores. Los compuestos bioactivos son productos naturales que juegan un papel importante en clínica debido a sus múltiples actividades

biológicas tales como antitumorales, antibióticas, antiparásitas, antivirales, inmunosupresores, neuroprotectores, etc. En los últimos veinte años, estos productos naturales y sus derivados (o compuestos inspirados en ellos) han representado cerca del 50% de todos los compuestos bioactivos aprobados para su uso (tanto clínico como en agricultura o veterinaria). Considerando su origen, la mitad de los productos naturales bioactivos han sido obtenidos a partir de microorganismos (bacterias y hongos) y en particular de las actinobacterias filamentosas, especialmente del género *Streptomyces*, que producen el 40% de los compuestos bioactivos de origen microbiano.



Las principales líneas de investigación del grupo son:

• **Aislamiento y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis de compuestos bioactivos (antibióticos y compuestos antitumorales) producidos por Actinomicetos.**

El grupo posee una amplia experiencia en el aislamiento y caracterización de rutas de biosíntesis de antibióticos y compuestos antitumorales producidos por actinomicetos. Se han aislado y caracterizado totalmente diversas rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos pertenecientes a distintas familias de compuestos policetónicos (“polyketides”), como el antibiótico macrólido oleandomicina, el macrólido antiangiogénico borrelidina, los macrólidos antitumorales PM100117 y PM100118, la anguciclina antitumoral oviedomicina, las antraciclinas antitumorales eloramina y estefimicina y los antitumorales del grupo del ácido aureólico mitramici-

na y cromomicina A3. Así mismo se han caracterizado las rutas de biosíntesis de los péptidos-policetónicos estreptolidigina (antibiótico) y colismicina A (neuroprotector), la ruta del antitumoral peptídico tiocoralina, la del antibiótico carbapenema tienamicina, la ruta de biosíntesis del antibiótico paulomicina, la de los antitumorales rebecamicina y estaurosporina pertenecientes ambos al grupo de los indolocarbazoles y las de los benzoxazoles con actividad antitumoral nataxazol y caboxamicina. Estos estudios implicaron la identificación de los genes de biosíntesis utilizando distintas estrategias; la inactivación y expresión de los genes, experimentos de bioconversión y ensayos de actividad *in vitro* para determinar la función de cada gen; purificación de los compuestos producidos por los diferentes mutantes y su caracterización química utilizando Espectrometría de Masas (MS) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR); y ensayos de actividad biológi-

ca (antibiótica, antifúngica, antitumoral, neuroprotectora e inmunosupresora).

• **Utilización de la “Biosíntesis Combinatoria” para generar nuevos compuestos bioactivos.**

La “Biosíntesis Combinatoria” es una estrategia que permite generar nuevos compuestos bioactivos mediante la utilización de técnicas de Ingeniería genética. Así, se pueden crear microorganismos recombinantes con combinaciones de genes de rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos no existentes en la naturaleza, que potencialmente pueden dar lugar a la producción de nuevos compuestos. La purificación posterior de estos compuestos, su caracterización química y el ensayo de sus actividades biológicas, así como su toxicidad en ratones, permite determinar la potencialidad de los compuestos para ser patentados y desarrollados posteriormente. Utilizando esta estrategia, el grupo ha generado más de 150 nuevos compuestos derivados de compuestos bioactivos (mitramicina,

cromomicina, eloramycin, estefimicina, rebecamicina, estaurosporina, colismicina, oviedomicina, nataxazol, caboximicina, estreptolidigina, borrelidina), algunos de los cuales poseen mayor bioactividad y/o menor toxicidad que los compuestos originales.

- **Mejora de la producción de compuestos bioactivos por Ingeniería metabólica.** Uno de los posibles problemas en el desarrollo de un nuevo compuesto bioactivo, es que éste se produzca en cantidades suficientes para llevar a cabo distintos tipos de ensayos, como ensayos preclínicos. Uno de los potenciales cuellos de botella que pueden existir es la disponibilidad de los precursores metabólicos a partir de los cuales se sintetiza el compuesto. Aplicando estrategias de Ingeniería metabólica (sobreexpresión y/o inactivación de genes del metabolismo primario) se puede favorecer y/o canalizar los precursores metabólicos de compuestos bioactivos hacia las rutas de biosíntesis de interés. Por otro lado, las rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos están sometidas a sistemas de regulación que actúan a distintos niveles, cuyo conocimiento y manipulación permite mejorar los niveles de producción codificados por las mismas. Utilizando estas estrategias hemos podido incrementar la producción de mitramicina, estreptolidigina, colismicina, nataxazol y caboximicina.
- **Aplicación del análisis genómico para activar rutas de biosíntesis “silenciosas” e identificar nuevos compuestos bioactivos.** La secuenciación de genomas de actinomicetos ha puesto de manifiesto que estos contienen agrupaciones de genes para la formación de 10-30 compuestos bioactivos que, por razones desconocidas, o no se expresan o se expresan poco en condiciones de cultivo de laboratorio, lo que implica que gran parte del potencial de estos microorganismos como productores de compuestos bioactivos está por descubrir. En nuestro laboratorio, se está analizando el genoma de diferentes actinomicetos con el fin de identificar agrupaciones de genes de biosíntesis de

compuestos bioactivos desconocidas e inducir su activación (utilizando estrategias de Ingeniería genética) para de esta manera descubrir nuevos compuestos. Con esta tecnología se ha podido descubrir que *S. albus* posee la capacidad de sintetizar varios compuestos bioactivos (indigoidina, antimicinas, alteramidas, candicina) y que *S. argillaceus* puede producir una familia de nuevos compuestos a los que se han denominado argimicinas P.

BIBLIOGRAFÍA

- García I, Vior NM, Braña AF, González-Sabín J, Rohr J, Moris F, Méndez C y Salas JA.** (2012). Elucidating the biosynthetic pathway for the polyketide-nonribosomal peptide collismycin A: mechanism for formation of the 2,2'-bipyridyl ring. *Chem Biol* 19: 399-413.
- Gómez C, Olano C, Palomino-Schätzlein M, Pineda-Lucena A, Carbajo R, Braña AF, Méndez C y Salas JA.** (2012). Novel compounds produced by *Streptomyces lydicus* NRRL 2433 engineered mutants altered in the biosynthesis of streptolydigin. *J Antibiot* 65: 341-348.
- Núñez LE, Nybo SE, Gonzalez-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, Braña AF, He M, Moris F, Salas JA, Rohr J y Méndez C.** (2012). A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 55: 5813-5825.
- Gómez C, Horna DH, Olano C, Méndez C y Salas JA.** (2012). Participation of putative glycoside hydrolases SlgC1 and SlgC2 in the biosynthesis of streptolydigin in *Streptomyces lydicus*. *Microb Biotechnol* 5: 663-667.
- Gómez C, Olano C, Méndez C y Salas JA.** (2012). Three pathway-specific regulators control streptolydigin biosynthesis in *Streptomyces lydicus*. *Microbiology-UK*. 158: 2504-2514.
- García I, Vior NM, González-Sabín J, Braña AF, Rohr J, Moris F, Méndez C y Salas JA.** (2013). Engineering the biosynthesis of the polyketide-nonribosomal peptide collismycin A for generation of analogs with neuroprotective activity. *Chem Biol* 20: 1022-1032.
- Sialer C, García I, González-Sabín J, Braña AF, Méndez C, Moris F y Salas JA.** (2013). Generation by mutasynthesis of potential neuroprotectant derivatives of the bipyridyl collismycin A. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 5707-5709.
- Zabala D, Braña AF, Flórez AB, Salas JA y Méndez C.** (2013). Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metab Eng* 20:187-197.
- Vior NM, Olano C, García I, Méndez C y Salas JA.** (2014). Collismycin A biosynthesis in *Streptomyces* sp. CS40 is regulated by iron levels through two pathway-specific regulators. *Microbiology-UK* 160:467-478.
- Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Méndez C y Salas JA.** (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol* 7: 242-56.
- Olano C, Cano-Prieto C, Losada AA, Bull AT, Goodfellow M, Fiedler HP, Méndez C y Salas JA.** (2014). Draft genome sequence of marine actinomycete *Streptomyces* sp. strain NTK 937, producer of the benzoxazole antibiotic caboxamycin. *Genome Announc.* 2(4). pii: e00534-14. doi: 10.1128/genomeA.00534-14.
- Flórez AB, Álvarez S, Zabala D, Braña AF, Salas JA y Méndez C.** (2015). Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: dual role as activator and repressor of the PadR-like regulator MtrY. *Microbiology-UK* 161: 271-284.
- Cano-Prieto C, García-Salcedo R, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Fiedler HP, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2015). Genome mining of *Streptomyces* sp. Tü 6176: characterization of the nataxazole biosynthesis pathway. *Chembiochem* d16: 1461-1473.
- Cano-Prieto C, Losada AA, Braña AF, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2015). Crosstalk of nataxazole pathway with chorismate-derived ionophore biosynthesis pathways in *Streptomyces* sp. Tü 6176. *Chembiochem*. doi: 10.1002/cbic.201500261.
- Méndez C, González-Sabín J, Moris F y Salas JA.** (2015). Expanding the chemical diversity of the antitumor mithramycin by combinatorial biosynthesis and biocatalysis: the quest for mithralogs with improved therapeutic window. *Planta Med* 81(15):1326-38.
- Zabala D, Braña AF, Salas JA y Méndez C.** (2016). Increasing antibiotic production yields by favoring the biosynthesis of precursor metabolites glucose-1-phosphate and/or malonyl-CoA in *Streptomyces* producer strains. *J Antibiot* 69 (3): 179-82. doi:10.1038/ja.2015.104.
- Salcedo RG, Olano C, Gómez C, Fernández R, Braña AF, Méndez C, de la Calle F y Salas JA.** (2016). Characterization and engineering of the biosynthesis gene cluster for antitumor macrolides PM100117 and PM100118 from a marine actinobacteria: generation of a novel improved derivative. *Microb Cell Fact* 15(1): 44. doi: 10.1186/s12934-016-0443-5.
- González A, Rodríguez M, Braña AF, Méndez C, Salas JA y Olano C.** (2016). New insights into paucolomycin biosynthesis pathway in *Streptomyces albus* J1074 and generation of novel derivatives by combinatorial biosynthesis. *Microb Cell Fact* 15(1): 56. doi: 10.1186/s12934-016-0452-4.
- Salcedo RG, Olano C, Fernández R, Braña AF, Méndez C, de la Calle F y Salas JA.** (2016). Elucidation of the glycosylation steps during biosynthesis of antitumor macrolides PM100117 and PM100118 and engineering for novel derivatives. *Microb Cell Fact* 15: 187.
- Ye S, Molloy B, Braña AF, Zabala D, Olano C, Cortés J, Moris F, Salas JA y Méndez C.** (2017). Identification by genome mining of a type I polyketide gene cluster from *Streptomyces argillaceus* involved in the biosynthesis of pyridine and piperidine alkaloids argimycins P. *Front Microbiol* 8:194. doi: 10.3389/fmicb.2017.00194.