

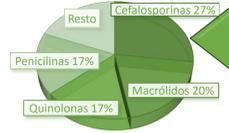


Biología Microbiana: mejoras en la producción de antibióticos β-lactámicos

Gómez Martinho González, Francisco Javier

1. INTRODUCCIÓN

100.000 toneladas de antibióticos
65.000 millones de \$ en ventas



TERAPIAS ANTIBIÓTICAS

BIOTECNOLOGÍA

RESISTENCIAS,
DESABASTECIMIENTOS

700.000 infectados en Europa por bacterias
multirresistentes X 29.000 \$ = **+33.000 muertes anuales.**

+3000 notificaciones de problemas de suministro en ESP (2018-2019)
+260: dificultades para conseguir el principio activo
+800: problemas de capacidad por aumento de demanda
+300: antiinfecciosos de uso sistémico

BIOTECNOLOGÍA

Mutagénesis clásica y selección de cepas.
"Era post-genómica" (2004-2014): secuenciación de +30.000 genomas microbianos

Genómica comparativa, proteómica y metabolómica: conocimiento integral del microorganismo

Tecnología del DNA recombinante: introducir nuevos genes o modificar los existentes.

- Desarrollo de nuevos fármacos que actúen en procesos de gran repercusión
- Desarrollo de estrategias para modificar la biosíntesis de un producto

- Obtener nuevas estructuras químicas de mayor actividad y menores efectos secundarios
- **Aumentar el rendimiento de producción.**

2. OBJETIVOS

Evidenciar la utilidad de la Biotecnología microbiana ante estos problemas

Ejemplo: penicilina en *Penicillium chrysogenum*

MEJORAS DE PRODUCTIVIDAD

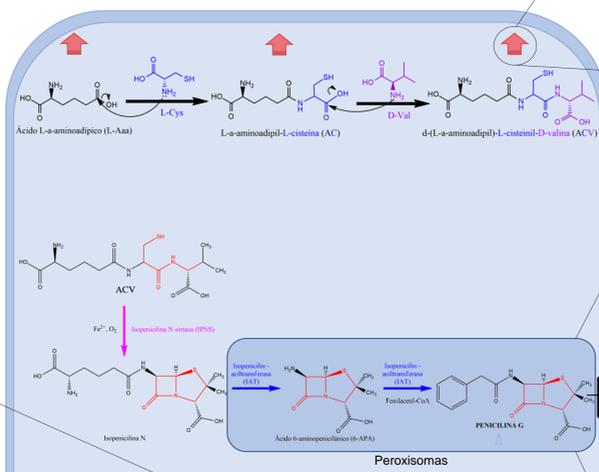
3. METODOLOGÍA



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN CLÁSICA DE β-LACTÁMICOS: *Penicillium chrysogenum*

P. chrysogenum (recientemente reidentificado como *P. rubens*) es desde hace más de 70 años el principal organismo empleado en producción comercial de penicilinas. Si bien Fleming descubrió esta por *Penicillium notatum* en 1929, su rendimiento de 1,2 mg/L fue ampliamente superado por los 150 mg/L del *P. chrysogenum* descubierto en 1943.



4.2.4. Ingeniería del metabolismo secundario

Datos: solo el 10% del carbono acaba formando parte de penicilina, 1 mol penicilina = 73 moles de ATP.
Represión de otras rutas metabólicas alternativas: ahorro de recursos.

- Degradación de aminoácidos o del ácido fenilacético (PAA): citocromo P450 monooxigenasa (gen *phacA*).
 - Mutación Wis.48-701 → Wis.49-133: delección de *phacA*, **↑100% rendimiento.**
- Síntesis de ATP, NADPH y cisteína: aumento de la expresión de *Pga1*.

CoA ligasas peroxisomales: 8 enzimas. Unas colaboran al rendimiento; otras malgastan CoA en otros sustratos.

- 3: expresión muy reducida en las cepas seleccionadas por CSI → no deben estar implicados.
- **Fenilacetil-CoA ligasa (PCL), gen *phl*** → ruta de biosíntesis de penicilina G.
- 3: expresión significativa, pero menor que PCL. Sustratos desconocidos.
- *AclA*: específica para ácidos grasos de cadena larga → ácido adipico (uso potencial en la síntesis de ácido adipoil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (ad-7-ADCA), precursor de cefalosporinas).

BGCs de otras sintasas: 10 sintasas de péptidos no-ribosomales (NRPSs), 20 sintasas de policétidos (PKSs) y 2 híbridos NRPS-PKSs → griseofulvina, melanina... → **Delección BGC de penicilina** para producir estos compuestos.

Intentos de manipulación de NRPS y PKS: producir nuevos principios activos. Estructura grande y complicada: ventaja e inconveniente. Estrategias con mayor éxito: directas (ej. sitio activo de la NRPS A546).

4.2.3. Ingeniería de los procesos de transporte

Peroxisomas

- Aumentar sus niveles: **sobreexpresión de *pex11*** (peroxina que estimula su formación) = **rendimiento x2**
- **Inhibir su degradación:** delección de *atg1* (relacionado con su autofagia y degradación).

Transportadores inespecíficos

- **Transportadores MFS (PenM y PaaT):** entrada del PAA y la isopenicilina N en peroxisomas.
- Sobreexpresión de *penM*: **↑236% rendimiento**
- Silenciamiento: **↓90% rendimiento**

Transportadores ABC: secreción activa de la penicilina.

- Evidencia:
- Estimulación por verapamilo
- Expresión en levaduras → expulsión natural de penicilina (8'0 y 8'5, respectivamente).

Consecuencias:
 Aumento de superficie → flujo de los precursores de cadenas laterales (difusión pasiva)
 Concentración de IAT y PCL en su lumen
 → evasión de reacciones secundarias no deseadas
 → pH alcalinizado (7'5-8'0) próximo a su pH óptimo (8'0 y 8'5, respectivamente).

4.2.5. Ingeniería del medio de cultivo

Inespecífica. Optimizar:

- Herramientas de **high-throughput screening**
- Array de condiciones de cultivo**
- Herramientas de **bioinformática**
- CONDICIONES IDEALES**
- Detección de nuevos metabolitos**

Ejemplo: aspoquinolonas en *A. nidulans*.

Específica: modificar [sustancias] determinadas

Sustancia	Efecto
↑↑ [glucosa, fosfato o amonio]	Represor del metabolismo secundario
↓↓ [hierro y nitrógeno]	Estimulante del metabolismo secundario
Oligosacáridos, como mananos	↑ actividad de IAT
4'-fosfopanteteína*	↑ actividad de IAT
Ácido L-α-aminoadipico	↑ conversión por ACVS
1,3-diaminopropano	Induce transcripción de <i>pcbAB</i> , <i>pcbC</i> , y <i>penDE</i> en un 100%

*Sintetizada por PPTasa → amplificar gen *ppt*

Co-cultivo ("crosstalk"): simbiosis.
 Metabolitos secundarios de uno; intermediarios aprovechables por el otro, o protección frente a crecimiento de un 3º organismo indeseado.

Descubrimiento de clústeres silenciados → fomicilinas A y B

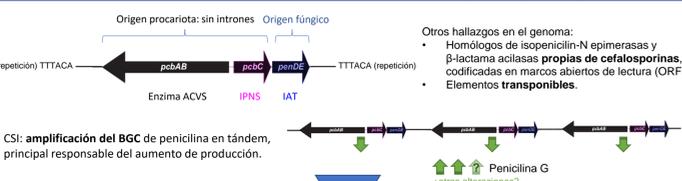
4.2. OPTIMIZACIÓN DE CEPAS

MÉTODO CLÁSICO (CSI) POR MUTAGÉNESIS CLÁSICA

CEPA	PRODUCTIVIDAD (g/L)	Nº DE CLÓSTERS*	DESARROLLADOR	MÉTODO DE OBTENCIÓN
NRRL 1951	0,150 mg/L	1	Cepa original	Aislado de un melón cantalupo mohoso
X1612	0,3	**	Carnegie Institution, Nueva York	Mutagénesis de NRRL 1951 por rayos X
Wis Q176	0,55	**	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de X1612 por rayos UV
Wis 48-701	0,65	**	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de Q176 por mostaza nitrogenada
Wis.54-1255	0,550-0,8	1	Universidad de Wisconsin	Mutagénesis de Q176 por rayos UV (16 generaciones)
DSO4825	0,98	5-6	DSM N.V. (Países Bajos)	Desconocido, a partir de Wis54-1255 (9 generaciones)
NMUZ/40	6	4	Biotika a.s., Slovenská L'upča	Desconocido, a partir de Wis54-1255
P2	7,4	5-6	Panlabs (Taiwán)	Desconocido, a partir de Q176
AS-P-78	4,8	5-6	Antibióticos SA (España)	Desconocido, a partir de Wis54-1255
E1	**	12-14	Antibióticos SA (España)	Desconocido, a partir de Wis54-1255
BW1952	≈10	50	Beecham Pharmaceuticals UK	Desconocido, a partir de X1612

*Número de cepas del Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) de penicilina [ver apartado 4.2.1.] **No estudiado o publicado

4.2.1. El Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) de penicilina



4.2.2. Ingeniería genética del BGC y sus reguladores

EDICIÓN GENÉTICA:

- Unión de extremos no-homólogos (NHEJ): complejo proteico **ku70/80**
- Recombinación homóloga (HR)
- Tecnología **CRISPR/Cas9**

Hallazgos:

- **La enzima limitante cambiaba en cada cepa**
- **Suplemento de genes por transformación:** 3 *pcbAB* + 1 *pcbC* + 2 *penDE* = **↑ 299%**.
- **TRANSCRIPTÓMICA** → no se expresa de igual manera cada gen en cada cepa.

4.2.2.1. Reguladores globales

Ningún factor de transcripción propio.

Factores generales: **Pacc** (pH), **AreA** (N), **CreA** (C), **AnCF** y **AnBH1**, y **PTA1**.

Otros BGC: clústeres de péptidos no-ribosomales (NRPS) o de policétidos (PKS).
 Modificar su afinidad y selectividad → dirigirlos a BGC penicilina

- NRPS: reguladores más diversos
- PKS: familia del Zn_2Cys_6 .

Principales estrategias por ingeniería genética

- **Delección** de genes relacionados con la represión
- **Reemplazo de promotores.**
- **Sobreexpresión** de reguladores positivos

4.2.2.2. Regulación sobre la cromatina

EPIGENÉTICA: cromatina estructurada en nucleosomas, superhélices de DNA compactado por octámeros de histonas (dos pares de H2A, H2B, H3 y H4).
 Dos conformaciones:

- Una más densa (**heterocromatina**)
- Otra más relajada (**eucromatina**)

Condicionadas por modificaciones postraduccionales de las histonas:

- **Acetilación** → Eucromatina
- **Metilación** → H3K9, H3K27 y H4K20, heterocromatina → H3K4, eucromatina
- Sobreexpresión de Histona-desacetilasa (HDAC) → activación de genes silentes (sorbicilinoideos).

Complejo Velvet (LaeA/VeA/VeB): la luz inhibe la expresión de VeA (entrada y salida del núcleo).

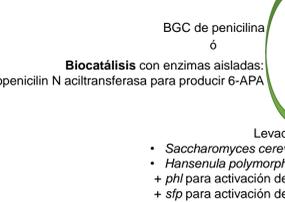
- **LaeA:** metiltransferasa → sobreexpresión: **↑ 20-25%** → inactivación: **↓ 40-50%**

4.3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA

4.3.1. *Penicillium chrysogenum* como donador

Principales obstáculos:

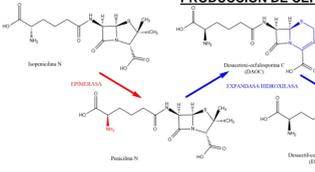
- gran tamaño del fragmento de DNA (> 40 kbp)
- lograr expresión y activación efectivas
- toxicidad de los productos para el hospedador



4.3.2. *Penicillium chrysogenum* como hospedador

Facilitada por el desarrollo de la biología sintética: sistema de promotores y terminadores optimizados para *P. chrysogenum* + producción relativamente barata de DNA sintético.

Programar rutas sintéticas enteras a un bajo coste



4.4. BÚSQUDA DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS

Vuelta al enfoque tradicional: **screening de productos naturales**, gracias a la biotecnología e ingeniería genética, junto con las técnicas de **high-throughput screening** (HTS).

- Ingeniería inversa** → aplicar estas estrategias en otros BGCs silenciados (ej. sorbicilinoideos o viridicatumtoxina).
- Metagenómica** → introducir genes de microorganismos no cultivables en otros más domesticados.
 - Identificar nuevas enzimas o productos de compleja obtención química → bibliotecas de genes
 - Obstáculo de la bioinformática: falta de **validación in vivo**.
- Lipidómica** → estudio del uso de lípidos por microorganismos
 - Descripción de nuevas dianas antibióticas (ej. FabI, FabH, FabF o acetyl-CoA carboxilasa).
 - Descripción de la estructura de membranas y paredes → Desarrollo de modelos sintéticos (ej. liposomas)

5. CONCLUSIONES

Biotecnología: **poderosa herramienta** para mejorar constantemente la producción de antibióticos.

Ingeniería genética → **amplio margen de mejora** en la biosíntesis de penicilinas

Conocimiento básico de su genoma y proteoma

Aplicaciones en la **mejora de la salud pública:**

- **↑ rendimiento de producción** → garantiza el abastecimiento y el acceso a estos medicamentos
- Facilita el desarrollo de alternativas terapéuticas:
 - **Screening** de nuevos productos naturales no caracterizados
 - Diseño racional de antibióticos contra dianas específicas
 - Aprovechando la maquinaria optimizada de *P. chrysogenum* para producir otras sustancias

6. BIBLIOGRAFÍA



Abaratamiento de la producción de penicilinas en grandes cantidades

Potencial inmediato más interesante: obtención de cefalosporinas, de más amplio espectro

Relativa sencillez de la ruta biosintética de penicilinas → **gran variedad de factores** que pueden condicionar su desempeño y sobre los que la Biotecnología puede actuar

Cada una de estas estrategias → **multiplicación de la productividad** → ¿es posible aplicarlas todas en una misma cepa?