



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery of novel antibiotics from actinomycetes by integrated metabolomics & genomics approaches

Wu, Changsheng

Citation

Wu, C. (2016, October 26). *Discovery of novel antibiotics from actinomycetes by integrated metabolomics & genomics approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/43768>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/43768>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43768> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Wu, Shangsheng

Title: Discovery of novel antibiotics from actinomycetes by integrated metabolomics & genomics approaches

Issue Date: 2016-10-26

SAMENVATTING EN DISCUSSIE

1. Samenvatting en discussie van experimentele resultaten

Sinds de baanbrekende ontdekking van penicilline door Fleming is het gebruik van antibiotica explosief toegenomen. Dit heeft een scherpe stijging in multiresistente infectieziekten met zich meegebracht die zich al sinds de jaren 80 van de vorige eeuw zich over de wereld verspreiden. Veel ‘multi-drug resistente’ (MDR) bacteriën zijn inmiddels resistent tegen veel, zo niet alle, antibiotica die inde kliniek worden gebruikt. Dit brengt een grote maatschappelijke uitdaging met zich mee. Zodra een nieuw antibioticum op de markt verschijnt duurt het niet lang totdat resistentie ook verschijnt, dit geldt ook voor de laatste linie middelen zoals vancomycine. Dit heeft er toe geleid dat ziekten die ooit als bijna uitgeroeid beschouwd werden nu weer terugkomen, met tuberculose als duidelijk voorbeeld. De zogenaamde ESKAPE pathogenen (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, en *Enterococcus spp.*) vormen echter wellicht de grootste bedreiging. De toename in resistentie komt tegelijkertijd met een afname van ‘drug-discovery pipelines’. Deze afname is vooral te wijten aan het feit dat het ontdekken van nieuwe antibiotica veel tijd kost en daardoor erg duur is. Nieuwe ideeën en inzichten moeten worden geïntroduceerd om het onderzoek naar antibiotica te revitaliseren en om de kans om nieuwe antimicrobiële middelen te vinden te vergroten. Zeker verbindingen met een nieuwe werking en/of unieke chemische structuren zijn van groot belang voor de gezondheidszorg.

Moeten wij nu de hoop om deze obstakels te overkomen verliezen? Een oude Chinese filosofie zegt “dingen in de wereld zijn allelopatie”. Als dit zo is, wat kan dan deze minuscule organismen stoppen? Zoals altijd moet het antwoord in de natuur worden gevonden. Miljarden jaren van evolutie hebben geresulteerd in een buitengewoon diversiteit aan chemische verbindingen met zeer diverse functionaliteiten. Met andere woorden, het is als een tekstboek geschreven in de taal van chemie. Moderne analytische technieken maken het mogelijk om structuren aan bio- en fysiologische functies te koppelen. Met de grote stappen die de synthetische biologie en chemie maken is het niet alleen mogelijk om kopieën te maken van natuurlijke moleculen maar ook om geheel nieuwe biologisch geïnspireerde verbindingen te maken. Deze stoffen kunnen geheel nieuwe functies bezitten die hun gelijke niet hebben in de natuur en zullen ieder opzicht van ons leven kunnen beïnvloeden, zo niet vormen.

Om terug te komen op antibiotica, waar kunnen wij nieuwe moleculen vinden om de pijlpijn naar de Parma-industrie opnieuw te bevoorraden? Ook al hebben wetenschappers uitputtend onderzoek gedaan op zoek naar nieuwe moleculen die kunnen functioneren als onze toekomstige medicijnen, toch wordt de biosynthese potentieel van microben nog onderschat en is waarschijnlijk slechts het topje van de ijsberg ontdekt. Hier zijn een aantal redenen voor aan te geven. Ten eerste is ondanks de grote hoeveelheid filamenteuze micro-organismen die zich in de bodem en in de oceanen bevinden slechts een kleine deel in het lab te kweken. Recentelijk is aangetoond dat methoden om "onkweekbare" bacteriën toch op te groeien mogelijk een nieuw gebied in de chemie van ‘natural products’ kan openen. Ten

tweede zijn veel biosynthese clusters van de kweekbare microben niet actief in laboratoriumomstandigheden. Zo heeft bijvoorbeeld het bepalen van de genomsequentie van actinomyceten aangetoond dat zelfs bij de best bestudeerde modelorganismen de productiecapaciteit volledig onderschat is. Ten derde is het zo dat als een gencluster tot expressie komt dat het product hiervan vaak niet ontdekt wordt vanwege de intensieve fytochemische analyse of chromatografische zuivering die nodig is. Dit is zeker het geval als het deze expressie veel lager is dan die van andere bioactieve verbindingen binnen hetzelfde organisme.

Actinomyceten zijn belangrijke micro-organismen voor de (medische) industrie vanwege hun vermogen om een breed scala aan secundaire metabolieten te produceren. Meer dan tweederde van alle ons bekende antibiotica wordt door deze filamenteuze bacteriën gemaakt, de meerderheid hiervan door *Streptomyces*. De komst van Next Generation Sequencing (NGS) heeft aangetoond dat zelfs de best bestudeerde modelactinomyceet *Streptomyces coelicolor* A3(2) nog veel onbenutte bronnen heeft voor natuurstoffen. Dit toont aan dat er een nieuwe aanpak nodig is om gebruik te kunnen maken van dit reservoir van bioactieve verbindingen om de drug-discovery pijplijn te vullen.

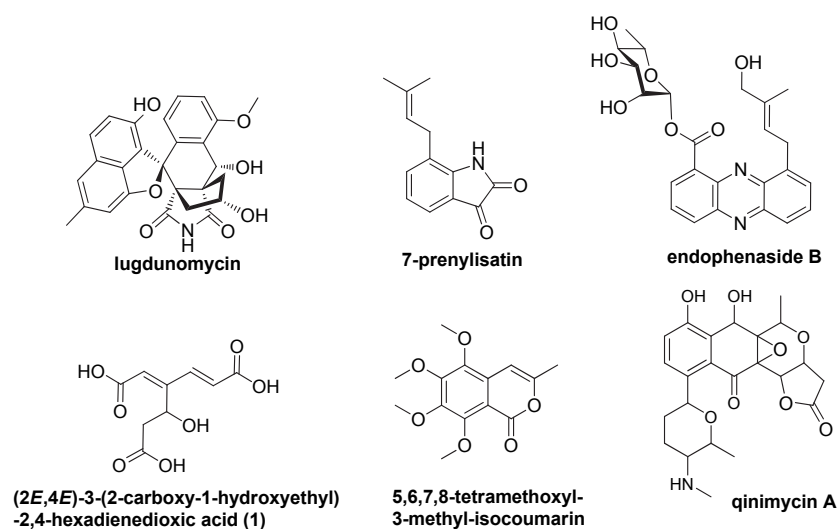
In dit proefschrift worden nieuwe methodieken die de ontdekking van nieuwe antibiotica bewerkstelligen gepresenteerd. Er wordt nadruk gelegd op methoden en ideeën uit zowel chemisch als biologisch perspectief. Veel van deze inspanningen hebben als doel om nieuwe verbindingen te vinden met nieuwe werkingsmethoden, met nadruk op het ontsluiten van slapende of cryptische biosyntheseroutes in bacteriën en het vervolgens karakteriseren van de moleculen die worden geproduceerd. Er wordt 'proof of concept' geleverd dat het integreren van NMR metabolomics met verschillende strategieën voor het induceren van antibiotica een efficiënte methode is om de ontdekking van nieuwe antibiotica uit actinomyceten te bewerkstelligen.

De co-cultivatie van verschillende micro-organismen heeft de afgelopen jaren veel interesse en toepassingen gevonden, vooral omdat het zich bewezen heeft als effectieve strategie voor het verkrijgen van unieke structuren met nieuwe biologische activiteit. In Hoofdstuk 4 van dit proefschrift wordt aangetoond dat co-cultivatie van *Streptomyces coelicolor* met de draadschimmel *Aspergillus niger* grote verandering teweeg brengt in de secundaire metabolieten die ze produceren. NMR metabolomics laat hier zien dat een aantal verbindingen, waaronder het cyclische dipeptide cyclo(Phe-Phe) en 2-hydroxyphenylacetic acid, specifiek worden gemaakt tijdens co-cultivatie. Deze verbindingen worden door *A. niger* geproduceerd als response aan de chemicaliën geproduceerd door *S. coelicolor*. Geïnspireerd door deze co-cultivatie studie is ook de biotransformatie van hydroxycinnamic acid onderzocht, wat liet zien dat dit tijdens co-cultivatie werd omgezet in de nieuwe verbinding (2*E*,4*E*)-3-(2-carboxy-1-hydroxyethyl)-2,4-hexadienedioic acid.

Selectie van mutanten die resistent zijn tegen het antibioticum streptomycine is een andere breed toepasbare methode om de productie van antibiotica te bevorderen. In hoofdstuk 5 wordt middels NMR metabolomics aangetoond hoe het selecteren voor streptomycine resistente variant van *Streptomyces* sp. MBT28 leidt tot de productie van een nieuw molecuul, namelijk 7-prenylindole, met antimicrobiële activiteit tegen *Bacillus subtilis*. Verdere analyse middels genome mining gecombineerd met *Natural Product Proteomining* leidde vervolgens tot identificatie van een gencluster (*isa*), welke codeert voor onder meer de isoprenyl

transferase die phenylalanine verandert in 7-prenylindole. Dit onderzoek onderstreept dat gecombineerde ‘omics-technieken de ontdekking van nieuwe moleculen kan vergemakkelijken en tegelijkertijd een duidelijke manier biedt om het verantwoordelijke gen-cluster te identificeren. Toch zijn de biosynthesegenen voor het eindproduct 7-prenylisatin niet in één enkel gencluster te vinden in het genoom van *Streptomyces* sp. MBT28: de oxygenases die verantwoordelijk zijn voor de oxidatie van 7-prenylindole naar 7-prenylisatin zijn namelijk niet binnen of nabij de *isa* gencluster gevonden.

Secundaire metabolieten worden vaak in een groeifase afhankelijke manier geproduceerd door actinomyceten, dit betekent dat het cruciaal is om de optimale oogst tijd te vinden om succesvol bioactieve metabolieten isoleren. In hoofdstuk 6 wordt de groei-fase-afhankelijkheid van secundaire metabolieten productie van *Streptomyces* sp. MBT76 geanalyseerd met behulp van metabolomics op basis van NMR. Er zijn hierbij een groep gemethoxyleerde isocoumarines gekarakteriseerd, waaronder een *tetra*-gemethoxyleerde verbinding: 5,6,7,8-tetramethoxyl-3-methyl-isocoumarin. Multivariate data analyse heeft aangegeven dat methoxylering leidde tot een toename in de antimicrobiële activiteit van isocoumarines, zowel van gemethoxyleerde als van niet-gemethoxyleerde isocoumarines. Verder leidde biotransformatie van de isoflavone genistein tot een hele reeks aan gemethoxyleerde isoflavones welke exact dezelfde modificaties ondergaan als isocoumarine. Hoewel isocoumarine-achtige metabolieten veel uit actinomyceten worden geïsoleerd is de onderliggende genetische basis voor dit type polyketide nog nagenoeg onbekend. Als men de gelijkenissen van de structuur van 6,8-dihydroxy-3-methyl-isocoumarine en genistein bekijkt is het niet ondenkbaar dat dezelfde *O*-methyltransferase gebruikt wordt voor de methylering van beide substraten. Met dit in gedachte is het zinnig om de genetische basis van isocoumarine biosynthese in *Streptomyces* sp. MBT76 te karakteriseren. Dit zou nieuw licht kunnen laten schijnen op de methyltransferase die verantwoordelijk is voor de post-PKS modificaties omdat deze genen voor PKS assemblage en post-PKS modificatie zich altijd clusteren in de genomen van actinomyceten. Verder zal dit ook inzichten kunnen verschaffen die gebruikt kan worden voor verdere genetische modificatie, zoals combinatorieke biosynthese, van dit type antibiotica.



Figuur 1. representatieve nieuwe moleculen die in dit proefschrift worden beschreven. In het bijzonder Lugdunomycine, een angucycline-derivaat met een totaal nieuwe chemische structuur.

In hoofdstuk 7 wordt een methode beschreven die gebruik maakt van de overexpressie van een biosynthetische gencluster (BGC). Dit leidde tot de activering van een BGC die normaal gesproken nauwelijks tot expressie komt, namelijk de *qin* cluster voor een type II PKS in *Streptomyces* sp. MBT76. Het chemotype en de genotype van deze recombinante stam werden door NMR-gebaseerde metaboliëten profiling op efficiënte wijze gelinkt. Hierbij laten wij als eerste de intrigerende architectuur van qinimycines A-C zien. Dit is een groep van nieuwe pyranonaphtoquinonen die kenmerken hebben zoals 8-glycosylering, 5,14-epoxydatie en 13-hydroxylering. De methode die in hoofdstuk 7 uiteen word gezet is vooral toepasbaar als er vanuit voorspellende bioinformatica analyse interessante nieuwe structuren uit BGCs worden opgedaan. NMR-profilering van de moleculen die in een zeer complexe matrix worden geproduceerd maakt het hierbij mogelijk om zeer snel het chemotype aan het genotype te koppelen. Dit kan de downstream isolatie en structuur bepaling stroomlijnen. Er zijn echter wel intrinsieke beperkingen aan deze syntheseroute-specifieke strategie. Zo is het niet mogelijk dit high-throughput te doen en zijn in sommige gevallen de syntheseroute-specifieke activatoren niet gemakkelijk te identificeren. Verder is het ook zo dat veel van de uit de natuur geïsoleerde stammen genetisch niet toegankelijk. In Figuur 1 zijn enkele moleculen weergegeven die tijdens NMR-gebaseerde metabolomics studies zijn geïdentificeerd.

Metabolomics-gestuurde drug discovery biedt ten opzichte van de gewoonlijke bioactiviteit-gestuurde screening veel voordelen. Het grootste bezwaar van de meer traditionele methoden is dat de chemische structuur en bioactiviteit van het target molecuul onbekend zijn voordat het intensieve en tijdrovende werk van isolatie begint. Wel moet worden opgemerkt dat er ook enkele nadelen zijn met betrekking tot het werken met microbiële extracten in NMR metabolomics. Voor dit proefschrift zijn gewoonlijk actinomyceten gekweekt in vloeibare en vaste minimale media. Veel componenten uit deze media worden onlosmakelijk mee-geëxtraheerd met ethylacetaat, en zijn in veel gevallen aanwezig in hogere concentraties dan de secundaire metaboliëten uit de actinomyceten die worden gezocht. Ondanks dat NMR spectroscopie een kwantitatieve techniek is, blijft het relatief ongevoelig ten opzichte van massa spectrometrie (MS). De signalen van de protonen in NMR van de gezochte verbinding zijn vaak in kleine hoeveelheden aanwezig, en vele malen minder dan de signalen van de mediacomponenten. Hierdoor zijn zij vaak verborgen door de sterkere signalen van de media. Dit heeft als gevolg dat metabolomics op basis van NMR het beste werkt als het gecombineerd wordt met een antibiotica-inducerende methode. Het is daarentegen ook mogelijk om de ongewenste verbindingen bij de eerste stap te verwijderen om zodoende de gewenste signalen te accentueren. Om dit bereiken zal een allesomvattende extractiemethode moeten worden gebruikt in plaats van het enkele organische oplosmiddel (ethylacetaat); deze vloeistof-vloeistof partitie zal nog verder moeten worden onderzocht. Een techniek die veelbelovend lijkt is solid-phase extractie (SPE), omdat er een breed scala aan adsorberende materialen met verschillende fysicochemische eigenschappen beschikbaar is. Behalve dat zou het nadeel van ongevoeligheid in metabole profiling met behulp van NMR kunnen worden voorkomen door gebruik te maken van HPLC-NMR technieken. Het grootste voordeel van het gebruik van on-flow HPLC-NMR is directe informatie over de chemische structuur van de pieken uit de HPLC door de NMR spectrometer als detector te gebruiken. Om de inherent lagere gevoeligheid van NMR

spectrometrie en het gelimiteerde injectievolume van HPLC chromatografie te omzeilen kan SPE aan het systeem gekoppeld worden, om zo bij herhaalde injecties de analyten ‘te vangen’ op hetzelfde SPE patroon. Deze geadsorbeerde analyten kunnen dan van de SPE kolom worden geëluëerd met gedeutereerde oplosmiddelen voor NMR analyse. Door gebruik te maken van deze LC-SPE-NMR methode is het mogelijk om omvangrijke structurele informatie en chemische samenstelling van ruwe extracten online te verkrijgen. Hierdoor kunnen we sneller voorspellen of er mogelijk interessante moleculen aanwezig zijn in een bepaald extract. Als men dan verder MS in het systeem integreert, zoals bij LC-DAD-SPE-MS-NMR instrumenten, kan de structuur van nieuwe verbindingen *de novo* online bepaald worden zonder dat er veel tijdrovende zuiveringsstappen van het analyt uit de zeer complexe matrix nodig zijn.

Er zijn waarschijnlijk geen biosynthetische genclusters niet nooit tot expressie komen. De verbindingen zullen ongetwijfeld onder een bepaalde conditie geproduceerd worden in de oorspronkelijke leefomgeving. Als dit niet het geval zou zijn dan zouden veel van deze clusters verloren zijn gegaan tijdens de evolutie, of zouden überhaupt nooit zijn ontstaan. Het is wel zo dat veel microbiële secundaire metabolieten in slechts geringe hoeveelheden worden geproduceerd, vaak onder de detectiegrens van NMR. Hierdoor kunnen zij gemist worden in NMR-gebaseerde metabolomics. Logischerwijs is het ook zo dat componenten die een kleinere hoeveelheid tot expressie komen ook veel gemist gaan worden in traditionele screeningstechnieken, en is het dus ook waarschijnlijker dat zij nog niet eerder geïsoleerd c.q. gekarakteriseerd zijn, in tegenstelling tot de verbindingen die onder routine laboratoriumcondities wel hoog tot expressie komen. Een logische methode om verbindingen die laag tot expressie komen toch te vinden is schaalvergroting. Hoewel deze aanpak tijdrovend en arbeidsintensief is heeft deze techniek wel vruchten afgeworpen. Het bepalen van de chemische skeletten door alle waarneembare verbindingen te isoleren uit een biologisch monster met een systematische zuiveringsmethode komt veel voor in het veld van traditionele natuurstoffen. Het is eigenlijk normaal dat een enkele microbiële bron meerdere secundaire metabolieten produceert; en systematische isolatie is ondubbelzinnig de meest efficiënte manier om meer licht te schijnen op de chemische diversiteit van een bepaalde actinomyceet. Naast het ontdekken van nieuwe chemische verbindingen geeft systematische zuivering vaak ook een beter inzicht in de biosynthetische routes van een complexe natuurstof. Dit komt omdat de structuren van meegeïsoleerde tussen- of zijproducten inzicht kunnen geven in de bioassemblage van het eindproduct. Verder is het ook zo dat de verandering van groeicondities kan leiden tot een complete verandering in het metabole profiel van micro-organismen, wat heeft geleid tot de OSMAC (one strain many compounds) strategie voor microbiële drug discovery. Een micro-organisme zal nooit zijn volledige arsenaal aan antimicrobiële verbindingen tegelijk in een bepaalde groeiconditie aanmaken, dit zou namelijk te kostbaar zijn omdat het produceren van complexe moleculen veel energie en dure bouwstenen kost. Daarom worden veel verbindingen alleen aangemaakt wanneer deze nodig zijn, hetgeen competitief voordeel geeft wanneer de omgevingscondities veranderen. Daarom is het variëren van de groeicondities een logische aanpak voor de inductie, c.q. optimalisatie, van de productie van secundaire metabolieten. In deze context vergroot de systematische verandering van groeicondities (medium samenstelling, beluchting, pH, temperatuur, toevoeging van chemicaliën, etc.) voor een micro-organisme de kans op het vinden van

secundaire metabolieten uit een enkele bacteriestam. De statische cultivatie van micro-organismen is van bijzonder belang voor de diversificatie van secundaire metabolieten in het laboratorium, dit komt doordat deze methode het meest overeenstemt met de natuurlijke groeicondities. Het is in het verleden al aangetoond dat de coproductie door actinomyceten in de natuur van twee of meer secundaire metabolieten nodig is om concurrenten de baas te blijven. Het is ook voorgesteld dat synergie en toeval samen de drijvende kracht voor de productie van meerdere secundaire metabolieten door deze onbeweeglijke saprophyten is. De OSMAC strategie was toegepast in de ontdekking van nieuwe natural products van *Streptomyces* sp. QL37 (hoofdstuk 8) en *Kitasatospora* sp. MBT66 (hoofdstukken 9 en 10). Er zijn daarbij verschillende koolstofbronnen (glycerol, mannitol, glucose, rhamnose, *N*-acetylglucosamine) en verschillende toevoegingen (gist extract, aardappel extract, pepton, zetmeel, sojameel), of basische (pH 10) condities getest in vloeibare NMMP media in schuldkolven, net als in vaste MM media; hierbij bleken vaste voedingsbodems beter dan vloeibare voor productie van secundaire metabolieten door deze twee actinomyceten.

Systematische isolatie van *Streptomyces* sp. QL37 gegroeid in MM met mannitol en glycerol leidde tot de productie van lugdunomycines. Dit zijn natuurstoffen met een volledig nieuwe chemische structuur (Figuur 1). Hun chemische structuur geeft aan dat de lugdunomycines zijn afgeleid van angucyclines, echter is hun basisstructuur gemodificeerd om een zeer complex molecuul te geven met een ongehoorde drie-dimensionele structuur. Lugdunomycines bevatten een benzaza[4,3,3]propellane skelet met daaraan spirocyclische 2*H*-naphthol[1,8,bc]furan en twee volledig koolstof quaternaire centra met daarin 5 aangrenzende stereogene koolstoffen. De opvallende ruggengraat van benzaza[4,3,3]propellane-6-spiro-2'-2*H*-naphthol[1,8,bc]furan is tot dusver ongehoorde scheikunde. Verdere fermentatie van *Streptomyces* sp. QL37 op R5 agarplaten met peptone gevolgd door systematische isolatie resulteerde in de karakterisatie van velen anderen herrangschikte angucyclines (hoofdstuk 8). Dit had als gevolg dat in totaal bijna 30 angucycline derivaten zijn gekarakteriseerd welke in vier verschillende klassen onderverdeeld konden worden: de zeven-ring lugdunomycines, drie-ring anthraquinonen, vier-ring benz[a]nthaquinonen, en vijf-ring limamycines. Metaboliet gerichte genome mining identificeerde een type II PKS (*lug*) gencluster welke verantwoordelijk is voor de angucyclineproductie in *Streptomyces* sp. QL37. Dit werd bevestigd door mutatie-analyse van de minimale PKS genen. Het is echter mogelijk dat de *lug* cluster niet voldoende is voor de synthese van alle gevonden angucyclines; met andere woorden, op dit moment kan niet worden uitgesloten dat genen van buiten het cluster eveneens nodig zijn om de complexe structuur van lugdunomycine te vormen. Wat verder ook nog moet worden onderzocht is dat alle gevonden angucycline derivaten een oxidatieve C-C splitsing hebben in de post-PKS stap die de basisstructuur van de benz[a]nthaquinone vormt. Het is aannemelijk dat er meerdere oxygenases nodig zijn voor de modificatie van lugdunomycine omdat er meerdere verschillende oxidaties plaatsvinden tijdens de synthese. De oxygenase die verantwoordelijk is voor de opening van de quinon ring via Baeyer-Villiger oxidatie is van groot belang voor de biosynthese van lugdunomycine en zou mogelijk ook andere polyketide antibiotica kunnen modifieren zoals tetracycline.

Hoofdstuk 9 beschrijft de systematische analyse van *Kitasatospora* sp. MBT66 en de ontdekking van zowel vijf nieuwe gerhamnosyleerde phenazines (genaamd endophenasides

A-E), als de eveneens gerhamnosyleerde plecomacrolide leucanicidine. Met behulp van metaboliëte gerichte genome mining van MBT66 werd een endophenaside gencluster geïdentificeerd welke bijna identiek is aan de endophenaside BGC (*epa*) van *Kitasatospora* sp. HKI 714. De genen die verantwoordelijk zijn voor de glycosylering van de endophenazine aglycons worden beschreven in hoofdstuk 10. Het is interessant om te zien dat de *de novo* rhamnosylering van beiden type centrale structuur in *Kitasatospora* sp. MBT66, phenazine en plecomacrolide, beiden hun oorsprong vinden in de modificatie via dezelfde glycosyltransferase en methyltransferase - LeuAB. Deze opvallende substraat flexibiliteit van LeuAB was de aanleiding om de structurele diversiteit van endophenasides in MBT66 opnieuw te onderzoeken. Hierbij maakte moleculaire netwerken middels MS/MS fragmentatie de karakterisering van negen nieuwe endophenasides mogelijk, waaronder een nog niet eerder gevonden tautomerische glyceride phenazine (hoofdstuk 10). Moleculaire netwerken zijn een effectief gereedschap voor chemische dereplicatie en een manier om nieuwe verbindingen op prioriteit te rangschikken. Het fundamentele principe achter deze netwerken is dat natuurstoffen met vergelijkbare structuur ook vergelijkbare MS/MS fragmentatie patronen zullen geven. De lage selectiviteit van LeuB voor het substraat kan mogelijk worden gebruikt om een breed scala aan natural products te 'glycorandomiseren'. Dit biedt een alternatieve methode om nieuwe antibiotica te ontwikkelen met een post-biosynthese modificatie strategie.

In actinomyceten liggen de genen voor enzymen van de biosyntheseroutes doorgaans geclusterd op het chromosoom, en hiervan kunnen we gebruik maken in de bioinformatica bij het zoeken naar kandidaatgenclusters voor een bepaald antibioticum. Het is echter geen zekerheid dat alle genen bij elkaar liggen, gezien de cross-talk tussen de *epa*, *baf* en *rml* genclusters voor endophenaside productie in *Kitasatospora* sp. MBT66 (hoofdstuk 10), en de samenwerking van de *isa* cluster en een elders gelegen gen voor een oxygenase die leiden tot productie van 7-prenylisatine in *Streptomyces* sp. MBT28 (hoofdstuk 5), en wellicht ook de genetica voor lugdunomycine productie in *Streptomyces* sp. QL37 (hoofdstuk 8). Daarom kunnen we concluderen dat samenwerking tussen twee of wellicht zelfs meer genclusters bij de vorming van secundaire metaboliëten vaker voorkomt in actinomyceten dan tot nu toe wordt aangenomen. Dit is eerder waargenomen in actinomyceten van het genus *Salinispora* bij de biosynthese van sioxanthin. Ook bij de biosynthese van prodiginines in *Streptomyces coelicolor* en pyrrolamiden in *Streptomyces netropsis* zijn verschillende regio's van het chromosoom betrokken. In andere gevallen kan één gencluster leiden tot meerdere producten, zoals bij de *act* (type II PKS) cluster van *S. coelicolor* die verschillende aryl-verbindingen kan synthetiseren, zoals pyranonaphthoquinonen, anthraquinonen, naphthoquinonen en mutacine. Het metabole profiel van een recombinante *Streptomyces* stam die het minimale PKS van de *whiE* gencluster uit *S. coelicolor* tot expressie bracht resulteerde in zo'n 30 polyketiden van verschillende lengtes en cyclisatiepatronen. Enkele voorbeelden staan in dit proefschrift, namelijk productie van meer dan 20 phenazines in *Kitasatospora* sp. MBT66 (hoofdstuk 9 en 10), of de productie van tenminste vier verschillende chemische skeletten met tientallen verschillende metaboliëten door de *lug* BGC in *Streptomyces* sp. QL37 (hoofdstuk 8). Met dit in het achterhoofd is het niet ondenkbaar dat bij de voortgaande trend om BGC's te synthetiseren middels synthetische biologie als strategie (hoofdstuk 1), men het risico loopt dat niet alle genen die nodig zijn voor de productie daadwerkelijk worden meegenomen.

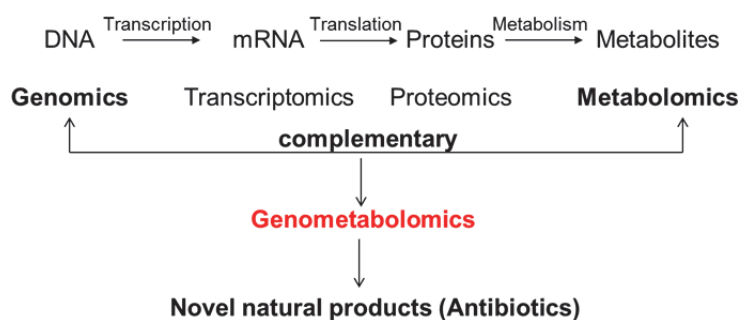
Ongeacht de pijplijnen die ontwikkeld worden voor de ontdekking van nieuwe antibiotica, zal de fytochemische analyse van microbiële culturen om de moleculen van interesse te profileren een gemeenschappelijke factor zijn in elk proces. Een rationele extractieprocedure zal dus van groot belang zijn om de ongewenste componenten (zoals uit de kweekmedia) te verwijderen en zoveel mogelijk secundaire metabolieten met diverse polariteiten te isoleren. In hoofdstukken 4-10 is ethylacetaat gebruikt om metabolieten die door de actinomyceten werden geproduceerd te extraheren. Zoals eerder besproken zijn veel mediacomponenten meegeëxtraheerd, in veel gevallen zijn deze relatief meer prominent aanwezig dan de gezochte (nieuwe) secundaire metabolieten. Dit waren vooral apolaire stoffen als 2,5-di-tert-butylphenol, 3,4-di-tert-butylphenol en (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionzuur octadecyl ester. Dit heeft een verregaand effect op de structuurbepaling en bioactiviteitsassays, zeker als de gezochte verbindingen in lage concentraties aanwezig zijn. Een ander nadeel van ethylacetaat is dat het minder geschikt is voor de extractie van polaire stoffen, zoals bijvoorbeeld de wateroplosbare aminoglycosiden. In hoofdstuk 11 is daarom de toepassing van het natuurlijke polymeer cellulose onderzocht als middel voor de absorptie van antibiotica uit een polaire matrix. Dit onderzoek heeft aangetoond dat solid-phase extractie op basis van cellulose als complementaire methode kan worden beschouwd naast vloeibaar-vloeibaar extractie om een breed scala aan secundaire metabolieten uit actinomyceten te ontdekken, zeker voor wateroplosbare antibiotica die bij veel extractiemethoden worden gemist.

2. Vooruitzichten

Met de snel groeiende toename in antibioticumresistentie is het van groot belang om nieuwe antibiotica te ontwikkelen. Historisch gezien is de ontdekking van antibiotica en andere natuurstoffen het domein van de scheikunde geweest met een nadruk op de isolatie van zuivere producten, structuurbepaling en hun (semi-)totaalsynthese. De biologie gaat ook een steeds grotere rol spelen in het (post-)genomics tijdperk. De recentelijke explosie aan publicaties over genomics methoden voor de ontdekking van nieuwe antibiotica laat zien dat de ‘genotype-to-chemotype’ roadmap een veelbelovende strategie is die het traditionele onderzoek sterk vernieuwt. Dit onderzoeksveld begint zich nu te mengen met meerdere disciplines zoals genome sequencing, bioinformatica, transcriptomics, proteomics, synthetische biologie, systeembioïologie en chemische ecologie. Synthetische biologie heeft daarbij grote potentie om drug discovery een nieuw leven in te blazen door de voorraad aan natuurstoffen aan te vullen. Daarbij kan synthetische biologie de exploitatie van cryptische BGC's en de opheldering van de structuur van het eindproduct mogelijk maken. De vooruitgang in moderne genetische gereedschappen, zoals transformatie-afhankelijke recombinatie (TAR), Red/ET recombinatie, en CRISPR-Cas9 genoom editing, zal de synthetische biologie verder kunnen versnellen en daarmee ook het onderzoek naar nieuwe antibiotica en andere natuurstoffen. In deze context is het van groot belang dat een wetenschapper die zich toelegt op de zoektocht naar nieuwe antibiotica ook de biologische kennis en praktische genetische gereedschappen tot zijn beschikking heeft. Verregaande samenwerking tussen wetenschappelijke experts van verschillende disciplines is dan ook de beste manier om de ontdekking van nieuwe antibiotica verder te brengen.

Micro-organismen leven in bijna alle ecologische niches, en hier spelen zij een doorslaggevende rol in het onderhoud van duurzame macroscopische en microscopische ecosystemen. Veel ecologische fenomenen zijn direct te herleiden tot de natuurlijke functie van natuurstoffen, zoals bij rhizoxin dat rijst zaailingziekte veroorzaakt. Het zou daarom heel goed zijn om ‘ecologisch geïnspireerde’ methodes te volgen voor de ontdekking van antibiotica, zeker met de onvoorstelbare biodiversiteit van de aarde. In die zin kan de natuur altijd als een belangrijke inspiratiebron dienen. Het is vooral belangrijk om onze aandacht te richten op de interessante natuurlijke fenomenen en na te denken over de onderliggende principes, dit te koppelen aan nog niet ontdekte microben en dan verschillende ('omics)-tools te gebruiken bij het screenen naar nieuwe biomoleculen. Zoals Auguste Rodin al zei: “het is niet een tekort aan schoonheid in het leven, maar een tekort aan ogen om de schoonheid te vinden”.

Het centrale dogma van de moleculaire biologie – de overdracht van informatie van DNA via RNA naar eiwit - is nu uitgebreid met het metabooloom. Daarbij zijn diverse 'omics technieken ontwikkeld voor iedere stap in dit bredere centrale dogma om de ontdekking van natuurstoffen mogelijk te maken (Figuur 2). Het gegeven dat alle biomoleculen een genetische basis hebben suggereert een nieuw concept wat ik “Genometabolomics” zou willen noemen. Dit verenigt de universeel beschikbare kennis van biosynthesegenen en biosynthetische enzymen en reacties wat vervolgens kan worden gebruikt om de aanwezigheid van nog onbekende metabolieten te voorspellen en te karakteriseren – en ook andersom.



Figuur 2. Genometabolomics voor onderzoek naar nieuwe biomoleculen in actinomyceten.

