



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Expanding the chemical space of antibiotics produced by *Paenibacillus* and *Streptomyces*

Machushynets, N.V.

Citation

Machushynets, N. V. (2024, September 5). *Expanding the chemical space of antibiotics produced by Paenibacillus and Streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4082475>

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/1887/4082475>

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

N

Nederlandse samenvatting

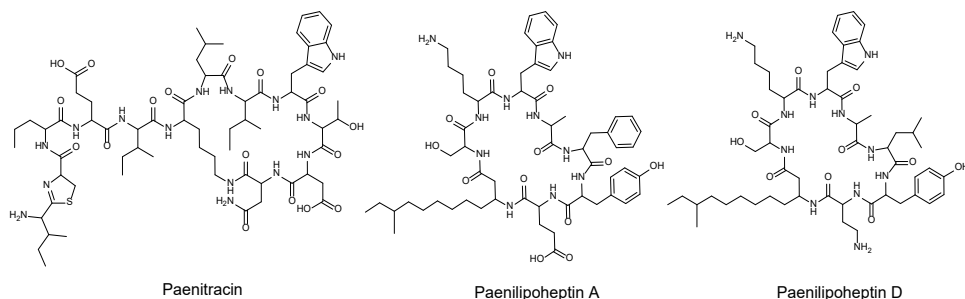
Bacteriën zijn onmisbare en schier onuitputtelijke bronnen van natuurstoffen, wat te danken is aan hun opmerkelijke vermogen om een overvloed aan zowel primaire als gespecialiseerde metabolieten te produceren. Als gevolg hiervan wordt bacteriële fermentaties al lange tijd gebruikt voor de productie van natuurstoffen en derivaten daarvan die toepassing vinden in de landbouw, biotechnologie of de kliniek. Het uitgebreide scala aan bioactiviteiten van natuurstoffen is het resultaat van diversificatie door evolutie van het metabolisme, waarbij duidelijk is dat het grootste deel van de chemische ruimte van natuurstoffen nog ontdekt moet worden (Gavriliadou et al., 2022). De beperkte snelheid van het ontdekken van antibiotica, in combinatie met de toenemende dreiging van antibioticaresistentie, zorgt ervoor dat de noodzaak hoog is om innovatieve benaderingen te ontwikkelen om de diversiteit van bacteriële natuurstoffen volledig te benutten (Silver, 2011; Lewis, 2013).

In dit proefschrift worden benaderingen gepresenteerd om de ontdekking van nieuwe antibiotica uit bacteriën te ondersteunen, met nieuwe strategieën gebaseerd op microbiologie, chemie en bioinformatica. Dit onderzoek richtte zich op het verkennen en uitnuttend van de chemische diversiteit van natuurstoffen van *Paenibacillus* en *Streptomyces*, het activeren van de productie van bioactieve natuurstoffen, het identificeren van nieuwe biosynthetische genclusters (BGC's) en het bedenken van strategieën om bioactieve moleculen te prioriteren voor daaropvolgende isolatie, structuuropheldering of organische synthese. Tot slot werd van veel van de moleculen gekeken naar de bioactiviteit en mogelijke toekomstige ontwikkeling tot nieuw medicijn.

GNPS-moleculaire netwerken voor de ontdekking van nieuwe bioactieve verbindingen

Global Natural Products Social molecular networking (GNPS MN) is een krachtig instrument om tandemmassaspectrometrie (MS^2) gegevens te verwerken en analyseren (Wang et al., 2016). GNPS MN is met succes toegepast om te assisteren bij de ontdekking van nieuwe microbiële verbindingen (Nguyen et al., 2016; Wu et al., 2019; Männle et al., 2020) om de prioritering van productiestammen, groeiomstandigheden en extractiemethoden voor het ontdekken van medicijnen te ondersteunen (Crüsemann et al., 2017; Floros et al., 2016). Tevens vindt het toepassing in het onderzoeken van microbiële interacties (Watrous et al., 2012; Vallet et al., 2017) en profilering van chemische diversiteit (Purves et al., 2016; Nguyen et al., 2013). Bovendien zijn prioriteringsstrategieën voor het ontdekken van nieuwe natuurstoffen toegepast op basis van de combinatie van moleculaire netwerken met verschillende informatiebronnen (bijv. genomische, taxonomische, geografische, bioactiviteits- en spectrale gegevens) (Olivon et al., 2017; Nothias et al., 2018; Olivon et al., 2020; Crüsemann et al., 2017). In **Hoofdstuk 3** wordt een methode geïntroduceerd voor het in een vroeg stadium prioriteren van moleculen, waarbij feature-based GNPS MN en MassQL wordt gecombineerd om peptiden die basische aminozuren bevatten (2,4-diaminoboterzuur, lysine, ornithine, histidine en arginine) en mogelijk interessante antimicrobiële eigenschappen hebben, te prioriteren. Annotatie van basische aminozuren werd gedaan op basis van multifunctionele MNs verkregen uit een bibliotheek van extracten van 227 isolaten uit de Auburn University stammenverzameling

bestaande uit plant-geassocieerde *Paenibacillus* stammen. Dit leidde tot de ontdekking van nieuwe paenilipoheptins en nieuwe bacitracinvarianten, aangeduid als paenitracins (Figuur 1).



Figuur 1. Overzicht van de verbindingen ontdekt door de MassQL Molecular Networking aanpak (Hoofdstuk 3).

Paenitracin verschilt van het bekende bacitracin A op drie posities, met aminozuren die uniek zijn ten opzichte van alle tot nu toe geïdentificeerde bacitracins, namelijk Leu7, Trp9 en Thr10 (Suleiman et al., 2017). Ondanks de significante structurele veranderingen vertoont paenitracine krachtige bioactiviteit tegen Gram-positieve pathogenen, waaronder vancomycine-resistente *Enterococcus faecium* E155. Paenitracine wordt geproduceerd door *Paenibacillus*-soorten, in tegenstelling tot eerder beschreven bacitracins die geïsoleerd werden uit *Bacillus* (Johnson et al., 1945, Stone & Strominger, 1971). We gebruikten een aangenomen GNPS MN-benadering om inzicht te krijgen in de chemische structuren en diversiteit van gespecialiseerde metabolieten van *Paenibacillus* en om de ontdekking van nieuwe natuurstoffen te vergemakkelijken.

Chemische elicitors in combinatie met metabolomics

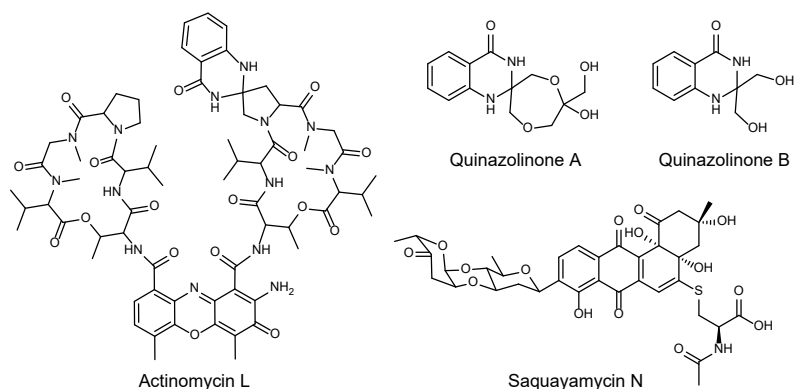
Ons streven om de diversiteit van natuurstoffen te begrijpen, laat zich vergelijken met het kijken door een sleutelgat, wat slechts een beperkte blik biedt op het uitgestrekte chemische landschap van bacteriële gespecialiseerde metabolieten. Bacteriën laten hun volledige spectrum aan gespecialiseerde metabolieten niet zien onder standaard laboratoriumomstandigheden. Veel biosynthetische genclusters (BGC's) blijven inactief of 'slapend' totdat ze worden getriggerd door specifieke omgevingsignalen, die vaak afwezig zijn onder laboratoriumomstandigheden (Demain & Fang, 2000). Het ontcijferen van deze signalen en regelmechanismen is cruciaal voor het ontwikkelen van strategieën die noodzakelijk zijn voor het aanzetten van de biosynthese van natuurstoffen.

Streptomyceten hebben een complexe levensstijl, beginnend met een spore die ontkiemt en vervolgens uitgroeit tot een multicellulair netwerk dat bekend staat als het vegetatieve mycelium. IN reactie op stressfactoren zoals uitputting van voedingsstoffen ondergaat een deel van het mycelium autolytische afbraak, waarbij voedingsstoffen in de omgeving vrijkomen om de groei van luchthyfen en sporen te ondersteunen (Jakimowicz & van Wezel, 2012, Flärdh & Buttner, 2009). De productie van antibiotica door streptomyceten

is nauw verbonden met de levenscyclus (Rigali et al., 2008, Barka et al., 2016). Daarbij beïnvloedt het moduleren van de groeiomstandigheden het metabolisme aanzienlijk en daarmee ook de diversiteit van bioactieve verbindingen die gesynthetiseerd worden door deze bacteriën (van der Heul et al., 2018, Urem et al., 2016).

Nieuwe quinazolinon A en B zijn ontdekt na het veranderen van de groeiomstandigheden bij het kweken van *Streptomyces* sp. MBT27 (**Hoofdstuk 4**). De productie van quinazolinon alkaloiden werd sterk verbeterd door de toevoeging van glycerol als C-bron. De chemische structuren van quinazolinon A en B en hun glycerol-afhankelijke productie suggereren dat glycerol bijdraagt aan de constructie van het ringsysteem (Figuur 2). Quinazolinone A en B vertegenwoordigen een nieuwe tak in de familie van quinazolinones. Identificatie en een uitgebreide analyse van het biosynthetische gencluster zullen naar verwachting het precieze biosynthetische pad voor deze nieuwe moleculen onthullen.

Bovendien heeft de specifieke koolstofbron een significante invloed op de antimicrobiële activiteit van *Streptomyces* sp. MBT27 (**Hoofdstuk 5**). De antimicrobiële activiteit piekte wanneer glycerol + mannitol, glucose, glycerol of fructose werden gebruikt als C-bron. Statistische analyse liet een directe correlatie zien tussen bioactiviteit en verhoogde productie van actinomycins; dit zijn de eerste antibiotica die zijn ontdekt in een actinomyceet (Katz, 1967). Opmerkelijk is dat koolstofgebruik niet alleen de algehele productieniveau's van gespecialiseerde metabolieten beïnvloedde, maar ook bijdroeg aan de chemische diversiteit van de actinomycines. Productie van de nieuwe verbinding actinomycine L werd waargenomen in culturen met 1% glucose, 1% of 2% glycerol, of 1% mannitol + 1% glycerol (Figuur 2). De isolatie van het nieuwe actinomycine L binnen zo'n goed bestudeerde familie van natuurstoffen benadrukt het potentieel voor het ontdekken van nieuwe moleculen, zelfs binnen uitgebreid bestudeerde microben en verbindingenklassen.



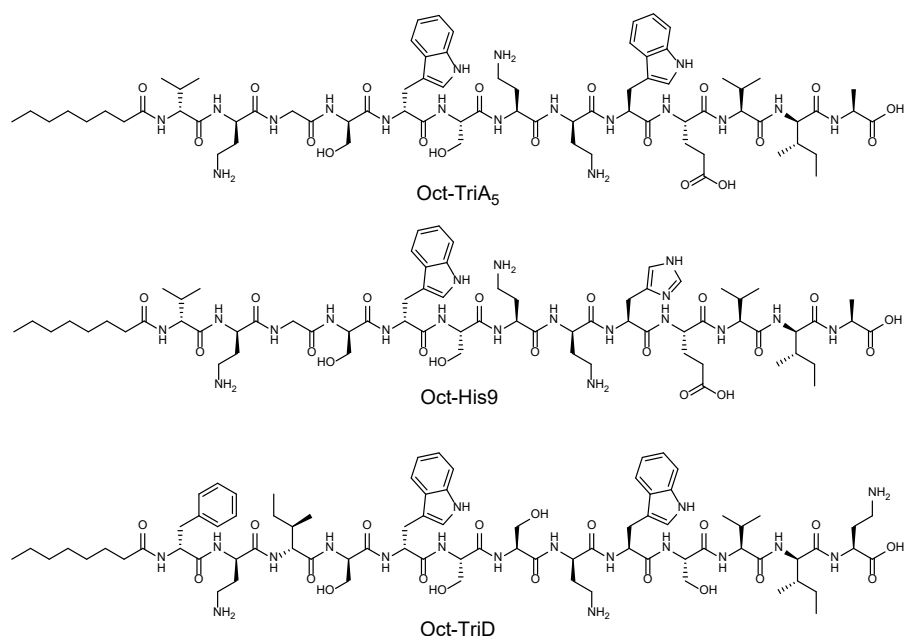
Figuur 2. Overzicht van nieuwe verbindingen die zijn ontdekt na het aanpassen van de groeicondities (**Hoofdstukken 4, 5 en 6**).

Om de vroegtijdige prioritering van bioactieve verbindingen te verbeteren, hebben we een analytisch platform ontwikkeld voor de snelle en efficiënte identificatie en dereplicatie van bioactieve metabolieten op basis van nanofractionering (nanoRAPIDS) (**Hoofdstuk 6**).

NanoRAPIDS combineert hoge resolutie nanofractionering met LC-MS/MS en functionele moleculaire netwerken (FBMN) in één enkele analyse. Het nanoRAPIDS-platform maakt de identificatie van moleculen met lage concentraties mogelijk tegen een achtergrond van bekende antibiotica, die vaak juist in hoge concentraties voorkomen. We gebruikten het platform om antimicrobiële bioactiviteiten te correleren met verbindingen in extracten van *Streptomyces* sp. MBT84 gekweekt in cultures met of zonder catechol als elicitor (van Bergeijk et al., 2022). De meerderheid van de pieken van bioactiviteit was geassocieerd met mass features die behoorden bij angucyclins, die voornamelijk bijdroegen aan de verhoogde bioactiviteit van het ruwe extract van *Streptomyces* sp. MBT84 wanneer het gekweekt werd met catechol (van Bergeijk et al., 2022). Dit leidde tot de isolatie van een nieuw angucycline, saquayamycine N. De combinatie van verschillende elicitatiestrategieën met multi-omics-benaderingen en het nanoRAPIDS-platform biedt een krachtige workflow om bioactieve metabolieten te prioriteren voor isolatie en bij te dragen aan het ‘ontcijferen’ van cryptische BGC’s.

Grootschalig genomonderzoek als een manier om verborgen chemische diversiteit te benaderen

Methoden om genomen te sequencen en te annoteren complementeren analytisch chemische technieken door toegang te bieden tot gespecialiseerde metabolieten die mogelijk niet worden geproduceerd in het laboratorium (Sayed et al., 2020, Gavriilidou et al., 2022, Lloyd Karen et al., 2018). Het analyseren van genomen als basis voor het ontdekken van natuurstoffen omvat het detecteren van nieuwe BGC’s, het voorspellen van de chemische structuren van de relevante moleculen en het inschatten van hun bioactiviteit op basis van deze structuren (Medema & Fischbach, 2015). De verkenning van bacteriële niet-ribosomale peptidesynthetasen (NRPS’s) via grootschalige genomanalyses heeft een aanzienlijk genoompotentieel binnen Firmicutes aangetoond, waarbij de functie van de meerderheid van de NRPS’s onderbelicht blijft (Li et al., 2018). *Paenibacillus* spp. zijn belangrijke producenten van niet-ribosomale peptiden (NRPs), waaronder polymyxins, octapeptins, pelgipeptins, fusaricidins, tridecaptins en cilagins (Cochrane & Vederas, 2016). Deze NRPs vertonen een breed scala aan activiteiten, variërend van antibacterieel en antischimmel tot antikanker en antiviraal. Om inzicht te krijgen in de chemische diversiteit van NRPs en nieuwe potentieel bioactieve natuurstoffen te ontdekken, hebben we 785 volledige, openbaar beschikbare genomen van *Paenibacillus* geanalyseerd met behulp van BiG-SCAPE (Navarro-Muñoz et al., 2020). (Hoofdstukken 7 en 8). Verdere in silico analyse met behulp van het algoritme PARAS maakte mogelijk om de aminozuursamenstelling voor peptide-scaffolds beter te voorspellen, wat heeft geleid tot de ontdekking van tien nieuwe tridecaptin-BGC’s met variaties in aminozuursamenstelling in vergelijking met bekende scaffolds.



Figuur 3. Syn-BNPs ontdekt door wereldwijde genomontginning van *Paenibacillus* NRPs.

We zagen daarbij significante diversificatie binnen de tridecaptin familie, waarbij chemisch gesynthetiseerde varianten verschillende bioactiviteitsprofielen vertoonden ten opzichte van bekende tridecaptins (Figuur 3). Tridecaptin A₅ werd ontdekt door analyse van genomdatabasesanalyses, vervolgens geïdentificeerd door metaboolstudies en tot slot synthetisch geproduceerd. Gezien het opvallende verschil in het activiteitsspectrum tussen de bekende tridecaptin A₁ (actief tegen Gram-negatieven) en de nieuwe tridecaptin A₅ (actief tegen zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën), konden we een specifiek residu (positie 9) identificeren dat een sleutelrol speelt in het veranderen van het antibacteriële spectrum en het profiel van de cytotoxiciteit van deze verbindingen. Een enkele aminozuursubstitutie op positie 9 leidde tot de ontdekking van Oct-His9, die colistine-resistente *Pseudomonas aeruginosa* efficiënt remde en lagere hemolytische en cytotoxische activiteit vertoonde in vergelijking met Oct-TriA₁. Wereldwijde genomontginning onthulde ook Oct-TriD, dat 6 substituties bevatte in vergelijking met Oct-TriA₁ en aanzienlijke bioactiviteit vertoonde tegen *E. faecium*. Het is daarom belangrijk om tridecaptins verder te blijven verkennen voor de ontwikkeling van effectieve antibacteriële middelen. De benadering om synthetische biologie te combineren met bioinformatica om natuurstoffen te analyseren en produceren (syn-BNP) vertegenwoordigt een geavanceerde methodologie op het snijvlak van computationele biologie, synthetische chemie en microbiologie (Chu et al., 2020). Het integreren van strategieën voor aminozuursubstituties bij syn-BNP stelt onderzoekers in

staat systematisch de structuur-activiteitsrelaties van natuurstoffen te analyseren, om zo rational design van analogen met verbeterd therapeutisch potentieel te vergemakkelijken.

Chimere biosynthese van tridecaptins en actinomycine

Analyse van *Paenibacillus* genomen met behulp van BiG-SCAPE heeft aangetoond dat sommige van de tridecaptin BGC's niet alleen verschillen in de voorspelde aminozuursamenstelling, maar ook in hun architectuur. Deze “verkorte BGC's” bevatten het 10-modulaire NRPS triD-gen maar missen het gen dat codeert voor de terminale 3-modulaire TriE-synthase. Het is suggestief dat de verkorte tridecaptin-achtige BGC's altijd samenvallen met ofwel een volledige BGC met alle 13 modules of met een andere verkorte tridecaptinachtige BGC die een 3-modulaire TriE-synthase codeert. Gezien het wijdverbreide voorkomen van zowel een volledige als een verkorte BGC, kan worden aangenomen dat beide tridecaptin BGC's functioneel zijn en deelnemen aan de biosynthese van zogenaamde “chimerische tridecaptins”. Via MS-gebaseerde metaboolanalyse van 227 plant-geassocieerde *Paenibacillus* spp. detecteerden we de chimerische tridecaptine B in de ruwe extracten van zeven *Paenibacillus*-isolaten. Genoomsequentie van een dergelijk isolaat, *Paenibacillus* spp. JJ-1683, identificeerde zowel volledige als verkorte tridecaptine BGC's. Daarom concluderen we dat tridecaptine B een product is van collaboratieve biosynthese, waarbij het NRPS van het verkorte cluster de eerste tien aminozuren levert, terwijl enzymen gecodeerd door het volledige cluster zorgen voor de toevoeging van de laatste drie aminozuren (**Hoofdstuk 8**). Een ander geval van collaboratieve biosynthese is te zien in de productie van actinomycine L (**Hoofdstuk 5**). De biosynthese van actinomycine L vereist genen van buiten het actinomycine-cluster voor de productie van anthranilamide, een van de precursors van actinomycine L. De voedingsexperimenten toonden overtuigend aan dat actinomycine L wordt gevormd door de reactie van anthranilamide met de 4-keto-groep op het prolinerestant in de pentapeptidelacton vóór de condensatie van de pentapeptidelactonen tot actinomycine L. Het enzym dat verantwoordelijk is voor de omzetting van anthranilzuur naar anthranilamide moet nog worden geïdentificeerd. Chimere biosynthese is een mechanisme van secundair metabolisme van bacteriën en schimmels, dat het potentieel heeft om de structurele diversiteit van gecodeerde moleculen verder te vergroten en de daaropvolgende biologische activiteit.

Conclusies en toekomstperspectieven

De integratie van diverse soorten data, zoals metabolomics, genomics, transcriptomics en fenotypische gegevens, biedt een holistisch inzicht in het antibiotica producerende potentieel van bacteriën en om de antibiotica die ze produceren te prioriteren. Om nieuwe wetenschappelijke doorbraken te maken in dit belangrijke veld, moeten we manieren vinden om onontdekte diversiteit van natuurstoffen te verkennen. Kunstmatige intelligentie cq

artificial intelligence (AI) is een veelbelovende toevoeging aan de beschikbare tools en stelt ons in staat informatie uit meerdere bronnen te combineren om complexe relaties tussen moleculaire structuren, biologische functies en bioactiviteit te identificeren (Mullowney et al., 2023). Ontwikkelingen in de AI zullen naar verwachting een revolutie teweeg brengen in het ontdekken van bioactieve natuurstoffen en het ontwerp van op deze moleculen geïnspireerde medicijnen en hun toekomstige ontwikkeling. Naast het vinden van nieuwe chemische entiteiten zijn microben biofabrieken voor de ontwikkeling van metabolieten, peptiden en eiwitten door middel van recombinant DNA technologie (Pham et al., 2019). De toekomstige stappen in metabolic engineering zouden genetische manipulaties van biosynthetische krachtpatsers zoals *Streptomyces* moeten omvatten (Whitford et al., 2021), om zo nieuwe en complexe natuurstoffen op een duurzamere manier te ontwikkelen. Dit onderzoek heeft aangetoond dat een gecombineerd gebruik van metabolomics en genomics benaderingen een effectieve manier is om nieuwe natuurstoffen te ontdekken. Door genomische inzichten te integreren met metaboolanalyses, hebben we een rijke diversiteit aan chemische structuren en bioactiviteiten ontdekt, zelfs binnen bekende families van moleculen, waaronder quinazolinones, actinomycins, saquayamycins, tridecaptins, paenilipoheptins en bacitracins. Deze strategie vergemakkelijkt niet alleen de identificatie van eerder onontdekte natuurstoffen, maar biedt ook inzichten in de biosynthetische routes en hun potentiële toepassingen. Door gebruik te maken van de collectieve kracht van AI-technologieën, natuurstofchemie, synthetische biologie en genoomanalyse, kunnen we het uitgebreide reservoir van microbiële biodiversiteit ontgrendelen en paden effenen naar de ontwikkeling van antibiotica van de volgende generatie om zo infectieziekten te bestrijden en het groeiende gevaar van antimicrobiële resistentie aan te pakken.