

Vida microbiana: un océano de posibilidades biosintéticas

Juan Francisco Martín y Paloma Liras

Universidad de León

INCORPORACIÓN DEL PROFESOR RODRÍGUEZ VILLANUEVA A LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

En la primavera de 1968, Julio Rodríguez Villanueva se incorporó a la Universidad de Salamanca. En ese año los arriba firmantes terminaban sus estudios de Ciencias Químicas y planeaban integrarse en el departamento de Química Orgánica de dicha universidad para realizar sus tesis doctorales. La atracción y la influencia del Prof. Villanueva se puso de manifiesto inmediatamente y nuestro interés en la bioquímica y en la biosíntesis de productos naturales se tradujo en la decisión de unírnos a su grupo de investigación, que en aquel momento contaba en Salamanca solamente con los doctores Gregorio Nicolás y Claudino R. Barruco. Posteriormente, se incorporarían los doctores Federico Uruburu, Santiago Gascón y Carlos Hardisson.

Nuestra inclinación a profundizar en la bioquímica de los productos naturales, y más en concreto de los antibióticos, se enfocó a partir de septiembre de 1968 en estudios sobre la biosíntesis de paredes celulares de los hongos filamentosos y en la biosíntesis de productos farmacológicos y enzimas por estos microorganismos y

por levaduras. Nuestras tesis doctorales se defendieron en 1971 y posteriormente nos incorporamos al Instituto Waksman de Microbiología de la Universidad de Rutgers, en el estado de New Jersey, Estados Unidos. Más tarde nos trasladaríamos a Boston para trabajar, respectivamente, en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) y en la Universidad de Brandeis.

VARIABILIDAD DE LOS METABOLITOS MICROBIANOS

A lo largo de varias décadas se han desarrollado en el mundo científico importantísimos avances en la bioquímica y en la genética molecular de los metabolitos microbianos. Aunque tendemos a homogeneizar la bioquímica de los seres vivos, un análisis detallado de la variabilidad genética que existe, particularmente en el mundo microbiano, ha demostrado que hay una impresionante diversidad de metabolitos, muchos de los cuales son compartidos con ligeras diferencias en todas las células vivas; si bien otros, que denominamos “metabolitos especializados” o “metabolitos secundarios” (MS), muestran una enorme variabilidad estructural. Esta variabilidad tiene un gran interés desde el punto de vista de la salud humana y animal, ya que muchas de estas moléculas tienen >>>



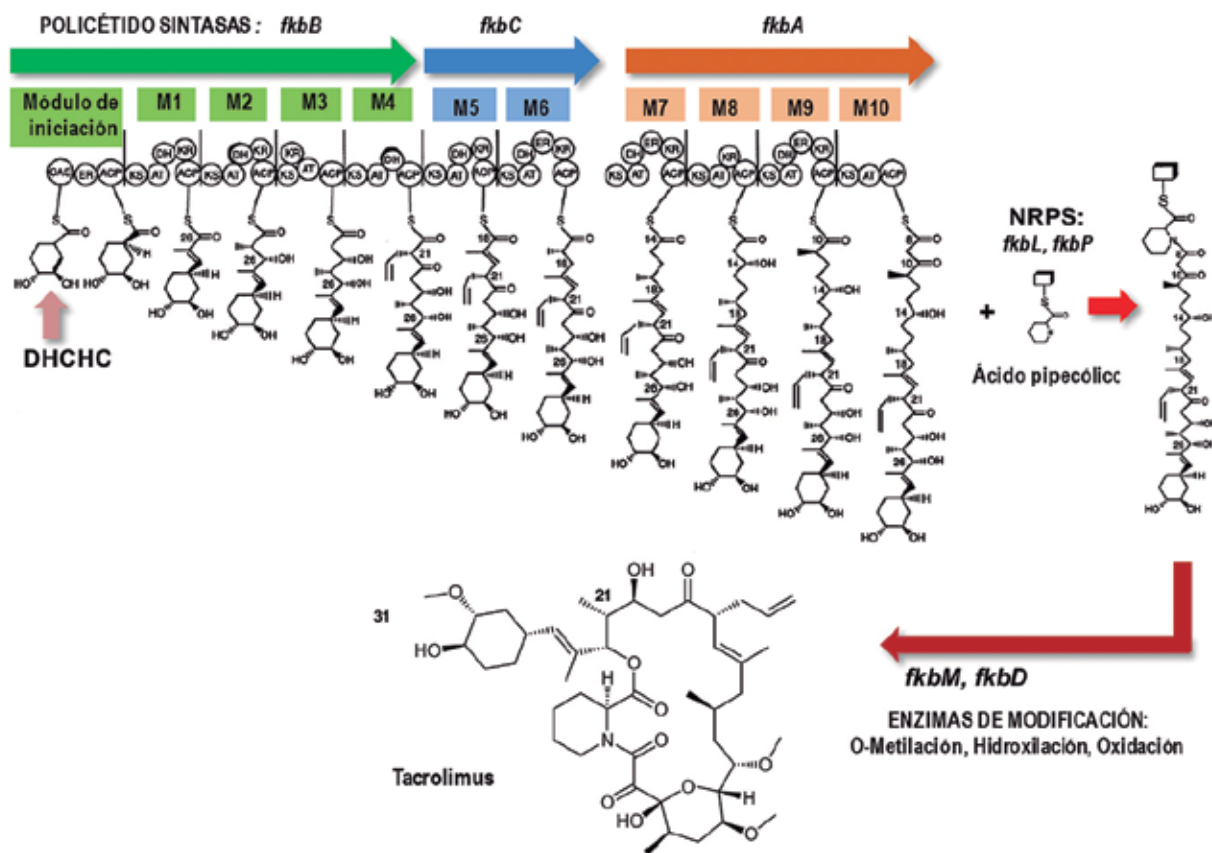


Figura 1

Biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus mediante la acción coordinada de tres PKSs y una NRPS. Tres poliketido sintetasas (*FkbB,C,A*) que constan de un total de 11 módulos, utilizando DHCHC como molécula iniciadora, ensamblan y modifican las distintas unidades de elongación. El ácido pipecólico, formado por una NRPS se introduce como unidad terminal. El poliketido-polipéptido lineal formado se cicla y se modifica por metilación, hidroxilación y oxidación originando la molécula de tacrolimus.

>>> importantes actividades farmacológicas, incluyendo actividades antitumorales, inmunosupresoras, inmunoestimuladoras, antibacterianas, antifúngicas, insecticidas, etcétera.

Con el ánimo de manifestar nuestro profundo aprecio al Prof. Rodríguez Villanueva, que nos encaminó hacia este campo de investigación, presentamos a continuación un breve resumen de los principales grupos de enzimas implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, con el objetivo de proporcionar una visión global de por qué y cómo surge esta inmensa variabilidad estructural durante los procesos biosintéticos de los metabolitos secundarios.

Nuestro interés no es realizar un estudio exhaustivo de las enzimas implicadas en la biosíntesis de millares de metabolitos secundarios, sino simplemente proporcionar unas pinceladas sobre los metabolitos formados por las sintetetasas de péptidos no ribosomales, por poliketido sintetasas, por prenilttransferasas y por una variedad de en-

zimas que modifican sus complejos substratos naturales por oxidación, deshidrogenación, halogenación, metilación, etcétera.

SINTETASAS NO RIBOSOMALES DE PÉPTIDOS

Estas enzimas, denominadas globalmente NRPS (*non-ribosomal peptide synthetases*) semejan a ribosomas muy primitivos. Forman parte de las vías biosintéticas de centenares de metabolitos secundarios de microorganismos y plantas. Las NRPSs son proteínas multimodulares de gran tamaño (aproximadamente entre 100 y 1200 kDa) lo que las hace difíciles de estudiar enzimáticamente. Sus módulos reconocen y activan aminoácidos específicos. El ensamblaje de los aminoácidos sigue el denominado modelo del “tiemolde” en el que la secuencia de dominios de la enzima determina cuáles son los aminoácidos que se unen y el orden de su unión. Frecuentemente hay 2 ó 3 NRPS asociadas que se transfieren entre sí los péptidos que están siendo sintetizados “de novo”, lo que da lugar a péptidos de hasta 25 aminoácidos. Estas enzimas

utilizan no solo los 20 aminoácidos proteínogénicos sino también hasta un centenar de aminoácidos no proteínogénicos como p-hidroxifenilglicina, ácido piperólico, β-aminoácidos o D-aminoácidos.

La sintetasa del péptido L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV), un precursor de la penicilina, es una NRPS sencilla y bien estudiada y puede servir como modelo de este grupo de enzimas. La ACV sintetasa (ACVS) contiene tres módulos diferentes, cada uno de aproximadamente 1000 aminoácidos para la activación y procesamiento de los tres aminoácidos que ensambla. Cada módulo contiene a su vez:

1. Un dominio para la adenilación de un aminoácido (A), que determina la especificidad de sustrato y activa el aminoácido con ATP formando un aminoacil-adenilato.
2. Un brazo de fosfotanteína unido a la enzima mediante un grupo tiol en una serina del dominio transportador de péptidos (T) que une y transloca el aminoacil-adenilato entre dominios.
3. Un dominio que conduce a la condensación (C) de dos aminoácidos activados presentes en módulos adyacentes y da lugar a la elongación del péptido.

Frecuentemente, las NRPS tienen dominios adicionales para la modificación de los aminoácidos por deshidrogenación o epimerización, entre otros mecanismos. En el caso de la ACVS existe un dominio (E) de 365 aminoácidos para la epimerización de L-valina a D-valina. Por tanto esta enzima tiene dominios con la organización ATC ATC ATE.

Una vez formado el tripéptido δ(L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina) existe un dominio que conduce a la liberación del péptido ACV mediante una actividad tioesterasa integrada en la enzima. Esta función se ha establecido claramente por mutación del residuo serina que forma el centro activo de la tioesterasa y mediante delección del dominio final TE implicado en la liberación del péptido. El dominio TE ejerce un control de la calidad del péptido naciente como se demuestra en mutantes en el dominio E, que producen LLL-ACV pero no liberan este péptido con lo que se bloquea la actividad enzimática total. El intercambio entre los dominios de distintas NRPS o la mutación de los dominios puede dar lugar a la formación de nuevos péptidos modificados con interés farmacológico.

SINTASAS DE POLICÉTIDOS (PKSs)

Una segunda clase de enzimas para la biosíntesis de metabolitos secundarios son las sintetetas de policétidos (*poliketide synthases*, PKSs) relacionadas con las sintetas de ácidos grasos en el metabolismo primario, que proporcionan una impresionante variedad de pro-

ductos utilizando la conjunción combinatorial de solo unas pocas unidades precursoras o elongadoras durante la biosíntesis.

Las PKS son multienzimas de alto peso molecular estructuradas en módulos. Cada módulo está formado siempre por al menos tres dominios, un dominio cetoácido sintasa (KS), una acil transferasa (AT) y un dominio ACP (dominio transportador de grupos acilos), lo que proporciona una unidad de elongación en una vuelta completa. En algunos casos estos dominios básicos están combinados con unidades que codifican actividades cetereductasa (KR), enoil reductasa (ER) o deshidratasa (DH), lo que origina al final un ácido graso hidroxilado, o bien parcial o totalmente saturado, dependiendo de los dominios variables que existen en cada módulo. La diferencia fundamental con las sintetas de ácidos grasos es la presencia/ausencia en los módulos de las PKSs de dominios variables, lo que origina una gran versatilidad en los policétidos formados.

Las unidades de iniciación de los policétidos en las PKS son frecuentemente acetil-CoA o propionil-CoA, que proporcionan unidades de 2 y 3 átomos de carbono. Sin embargo, en muchos metabolitos secundarios hay una gran variedad de unidades iniciadoras como dihidrociclohexano carboxilato (DHCHC, ver *Figura 1*), o aromáticas como cumaroil-CoA, fenilacetil-CoA o p-aminobenzoil-CoA, entre otras. Las unidades de elongación son, casi exclusivamente, malonil-CoA o metilmalonil-CoA que proporcionan 2 ó 3 átomos de carbono al sufrir una descarboxilación durante la condensación. En casos concretos, estas unidades de elongación pueden estar acompañadas por unidades raras como etilmalonil-CoA o alilmalonil-CoA como sucede en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus (*Figura 1*). Algunas PKS constan de 2, 3 o más módulos, proporcionando por tanto varias vueltas de condensación y, finalmente, varios módulos pueden estar agrupados en distintas proteínas de forma que los policétidos pueden llegar a contener decenas de dominios agrupados en 2, 3 o más módulos. Así, la policétido sintasa de tacrolimus está formada por tres proteínas FkbA, FkbB y FkbC, que contienen conjuntamente 11 módulos (*Figura 1*).

PRENIL TRANSFERASAS

Otro importante grupo de MS son las moléculas isoprenoides. Los isoprenoides o terpenoides son moléculas que proceden de la condensación reiterada de cinco unidades de carbono, isopreno, que se forma a partir del precursor isopentenil pirofosfato. Forman una enorme variedad de moléculas dependiendo del número de unidades de isopentenil pirofosfato condensadas, siendo los esqueletos estructurales más >>>



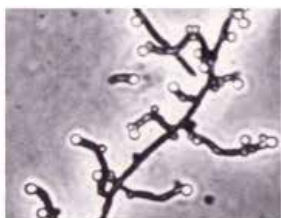
Acremonium chrysogenum



Penicillium solitum



Penicillium sp.



Micromonospora



Streptomyces coelicolor



Esporas de *Streptomyces sp.*

»» sencillos los de monoterpenoides, esquiterpenoides o sesterterpenoides, con 2, 3 ó 5 unidades de isopreno. Estos compuestos están enormemente extendidos en el mundo vegetal y también en el mundo microbiano, especialmente en hongos filamentosos. Forman pigmentos y una variedad de sustancias aromáticas características de los MS. La biosíntesis de algunas moléculas isoprenoides por hongos, tales como el ácido clavárico, han proporcionado importante evidencia de modificaciones tardías de los terpenos que se forman por las condensaciones iniciales de isoprenoides. Algunas de estas moléculas son toxinas fúngicas como es el caso de la toxina PR de *Penicillium roqueforti* que se producen en quesos azules en los que *P. roqueforti* se utiliza como microorganismo de maduración. Otro grupo importante de moléculas isoprenoides son los carotenoides que originan los intensos colores en tomates y otros vegetales, y las xantofilas que son productos oxidados derivados de los carotenos básicos y que tienen un gran interés como sustancias antioxidantes en la nutrición humana.

Una variante importante en la formación de metabolitos complejos es la prenilación de moléculas basadas en aminoácidos o en policétidos utilizando preniltransferasas. Estas preniltransferasas son muy variadas y pueden prenilar distintos carbonos de sus moléculas sustrato o grupos amino primarios o secundarios de los mismos. Entre las mejor conocidas están las preniltransferasas implicadas en la biosíntesis de alcaloides derivados del indol, como la roquefortina preniltransferasa que también está implicada en la formación de meleagrina y de otros metabolitos producidos por *P. roqueforti* y otros hongos filamentosos.

OXIDASAS QUE CONTIENEN HIERRO NO LIGADO A UN GRUPO HEMO

Estas enzimas contienen un ion ferroso en su centro activo, generalmente unido a dos residuos histidina de la proteína, carecen de grupo hemo y actúan como oxidasas o como oxigenasas. En su acción como oxidasas

consumen una molécula de oxígeno, extraen 4 átomos de hidrógeno de su sustrato y forman dos moléculas de agua. Este es el modo de acción de la isopenicilina N sintasa que cierra los anillos β -lactámico y tiazolidínico de la penicilina. La estructura cristalina de esta enzima tiene una organización en “jelly roll” y el átomo de hierro está unido a cuatro ligandos de la proteína (His²¹⁴, Asp²¹⁶, His²⁷⁰ y Gln³³⁰). El péptido ACV tiolado se une al átomo de Fe en el centro activo, en el cual está unido un átomo de oxígeno; se eliminan 4 H del ACV formando dos moléculas de agua con el oxígeno, a la vez que se cicla el sustrato. Además, algunas enzimas de este grupo pueden también actuar como oxigenasas.

RESUMEN

En resumen, el ejemplo y la influencia científica del Prof. Rodríguez Villanueva, puesto de manifiesto en la amplia escuela de científicos y profesores que se generó en Salamanca, ha contribuido al desarrollo de varias ramas de la Microbiología en España. En este sentido nuestro grupo ha contribuido de forma decisiva al desarrollo de la Microbiología Industrial y de la Biotecnología mediante la creación del grupo inicial de Microbiología Industrial de la SEM, dirigida en aquel momento por el Prof. Fernando Baquero y, posteriormente, de la Sociedad Española de Biotecnología. Todo ello no hubiera sido posible sin la influencia y el apoyo del Prof. Rodríguez Villanueva. ■

PARA LEER MÁS

- Sundaram S, Hertweck C, 2016. On-line enzymatic tailoring of polyketides and peptides in thio-template systems. *Curr Opin Chem Biol.* 31:82-94.
- Payne JA, Schoppet M, Hansen MH, Cryle MJ, 2016. Diversity of nature's assembly lines—recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis. *Mol Biosyst.* 13(1):9-190.
- Martín JF, Liras P, 2016. Insights into the structure and Molecular mechanisms of β -lactam synthesizing enzymes in fungi. En: *Biotecnology of Microbial Enzymes*. Eds.: G. Brahmachati, A.L. Demain y J.L. Adrio. Elsevier, New York, pp 215-41.