

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



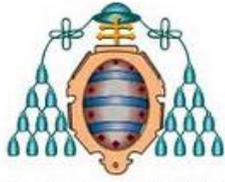
Máster en Biotecnología del Medioambiente y la Salud

Universidad de Oviedo

Caracterización de un mutante en el gen *tioH*, que codifica la última etapa de biosíntesis del cromóforo del antitumoral tiocoralina en *Streptomyces albus*-pFL1049.

Autor: Javier Fernández Fernández

Fecha: 17 de julio de 2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Felipe Lombó Brugos, Doctor en Biología por la Universidad de Oviedo y Profesor Titular de Universidad, Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional (Universidad de Oviedo).

CERTIFICA:

Que el Proyecto Fin de Máster presentado por D. Javier Fernández Fernández, titulado: “Caracterización de un mutante en el gen *tioH*, que codifica la última etapa de biosíntesis del cromóforo del antitumoral tiocoralina en *Streptomyces albus*-pFL1049”, realizado bajo mi dirección, reúne las condiciones necesarias para ser admitido como Proyecto Fin de Máster.

Y para que conste dónde convenga, firma la presente certificación en Oviedo,
a 15 de JULIO de 2013.

Vº Bº

Prof. Dr. Felipe Lombó Brugos Área de Microbiología Departamento de Biología Funcional Universidad de Oviedo

Fdo.: Felipe Lombó Brugos.
Director/ Tutor del proyecto

Índice

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1. FÁRMACOS DE ORIGEN NATURAL	8
1.1. Descubrimiento de fármacos marinos	8
1.2. Los organismos marinos como productores de compuestos bioactivos	9
1.3. Los actinomicetos como factorías bacterianas de metabolitos bioactivos	52
1.4. El género <i>Micromonospora</i>	11
2. TIOCORALINA	12
2.1.1. Actividad biológica de la tiocoralina	12
2.1.2. El ADN como diana terapéutica	13
2.1.3. Familia química de la tiocoralina	14
2.1.4. Diana de la tiocoralina: Secuencias CpG	15
2.2. Biosíntesis de tiocoralina	16
2.2.1. Propuesta de la ruta biosintética	16
2.2.2. Síntesis del cromóforo 3HQA	16
2.2.3. Síntesis de tiocoralina a partir del cromóforo	17
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1. Microorganismos empleados	23
4.2. Métodos microbiológicos	24
4.2.1. Medios de cultivo	24
4.2.2. Cultivo de <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> .	25
4.2.3. Condiciones de conservación de las células	26
4.2.4. Antibióticos	26
4.3. Aislamiento de ADN	27
4.3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de <i>E. coli</i> .	27

4.3.2. Obtención de ADN cromosómico.	27
4.3.3. Obtención de ADN desde <i>E. coli</i> para secuenciar	27
4.4. Manipulación in vitro del ADN	28
4.4.1. Digestiones enzimáticas	28
4.4.2. Ligación del ADN	28
4.4.3. Electroforesis en gel de agarosa	29
4.4.4. Purificación de fragmentos de ADN	29
4.5. Transformación con ADN plasmídico	30
4.5.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes y transformación	30
4.5.2. Preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes y transformación	30
4.6. Técnicas de hibridación de ADN	30
4.6.1. Electroforesis y transferencia de fragmentos de ADN a filtros de nylon	31
4.6.2. Marcaje de sondas	31
4.6.3. Hibridación	31
4.6.4. Revelado	31
4.7. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR	32
4.7.1. Oligonucleótidos cebadores	32
4.7.2. Condiciones de reacción de PCR	33
4.7.3. Programa de amplificación	33
4.8. Generación de mutantes por reemplazamiento génico	34
4.9. Secuenciación	34
4.10. Extracción de compuestos desde cultivos de <i>Streptomyces</i>	35
4.11. Análisis por HPLC	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Generación de un mutante para <i>tioH</i> por sustitución génica	38
5.2. Comprobación del mutante <i>tioH</i>	45
5.3. Análisis de la producción de tiocoralina por el mutante <i>S. albus-pFL1049-ΔtioH</i>	46
6. CONCLUSIONES	49
7. BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

La mayor parte de los tratamientos quimioterápicos de origen natural derivan de compuestos vegetales y de origen microbiano. En los últimos años las nuevas tecnologías han permitido que surjan fármacos de origen marino, aunque todavía están en clara minoría con respecto a los compuestos de origen terrestre. Esto es debido a la falta de conocimiento sobre los ecosistemas marinos, que son mucho más ricos en compuestos bioactivos que los terrestres, pero más difíciles de explorar, y sus organismos más complejos de cultivar

La tiocoralina es un compuesto antitumoral de origen marino producido por dos cepas de actinomicetos del género *Micromonospora* aisladas en la costa de Mozambique por la empresa Pharmamar S.A. Esta molécula es un octatiodepsipéptido que se sintetiza por un sistema NRPS (*Non Ribosomal Peptide Synthase*), y que tiene actividad antitumoral.

Este compuesto ha mostrado eficacia en varias líneas celulares tumorales, actuando sobre el ADN, debido a que se une al surco menor por medio de intercalación, con afinidad de secuencias ricas en CpG. Sus dos cromóforos de ácido 3-hidroxi-quináldico (3HQA) se intercalan entre las bases, dificultando el proceso de replicación y transcripción. Además la tiocoralina es capaz de inhibir la acción de la ADN polimerasa alfa, con lo que la célula entra en apoptosis y muere.

En el presente trabajo fin de máster, se ha realizado la mutación de un gen de la ruta biosintética de tiocoralina, generándose un mutante en las etapas finales de la síntesis del cromóforo 3HQA, molécula que es utilizada por este sistema NRPS como iniciador de la biosíntesis de este compuesto.

1. Introducción

1. FÁRMACOS DE ORIGEN NATURAL

Según la organización mundial de la salud (OMS) el 80% de la población mundial toma remedios naturales para tratar enfermedades, y más del 50% de los fármacos en clínica comparten un origen natural. Los compuestos quimioterápicos contra el cáncer se extraen en su mayoría de microorganismos y plantas, es decir, su procedencia es de origen natural (Grever, 2001).

Conociendo el ciclo celular y las rutas biosintéticas de estos productores de origen natural podemos llegar a modificar características estructurales del agente quimioterápico, lo que puede contribuir a modificar su especificidad, aumentar su eficacia o disminuir los efectos secundarios que produce al ser humano. Pese a ello la biosíntesis combinatoria o la síntesis química no han sido aún capaces de suplir la gran versatilidad estructural que presentan los compuestos naturales, de ahí que exista una necesidad de identificar nuevos compuestos y sus rutas para obtener nuevos fármacos *de novo*.

De todos los compuestos naturales conocidos tan sólo el 10% son de origen marino, aunque la biodiversidad en estos ecosistemas y su extensión son mucho mayores que las terrestres. El difícil acceso y a menudo la dificultad de cultivo de los organismos marinos hacen que el proceso de localizar y descubrir nuevos fármacos marinos esté aún por explotar al máximo (Blunt, Copp et al. 2007).

1.1. Descubrimiento de fármacos marinos

Los primeros seres vivos surgieron en el mar hace más de 3.500 MA, desde entonces han tenido la capacidad de desarrollarse en formas complejas, generando complejos sistemas de interacción, defensa, señalización, ataque, etc. Para realizar estas funciones, los seres vivos marinos tienen la capacidad de sintetizar y liberar diversos compuestos que pueden tener interés como fármaco.

Para poder identificar un nuevo compuesto de interés farmacológico a partir de organismos marinos se requieren varios pasos, las primeras etapas son:

- a) Realizar un cribado o screening para comenzar con la búsqueda de una diana molecular adecuada a nuestros intereses.
- b) Extraer muestras de tejidos o del microorganismo para purificar las sustancias candidatas a compuesto bioactivo de interés.

1.2. Los organismos marinos como productores de compuestos bioactivos

Los organismos marinos producen gran cantidad de compuestos con diferentes propiedades como: antiinflamatorios, antibióticos y antitumorales. Los mayores productores de compuestos bioactivos marinos son: esponjas (37%), celenterados (21%), microorganismos (18%), algas (9%), equinodermos y tunicados (6%), moluscos (2%) y briozoos (1%) (Blunt, Copp et al. 2006). Sin embargo a los organismos marinos no se les ha prestado una gran atención, debido a que la tecnología para explorar los ecosistemas acuáticos ha sido un factor muy limitante (Amador, Jimeno et al. 2003).

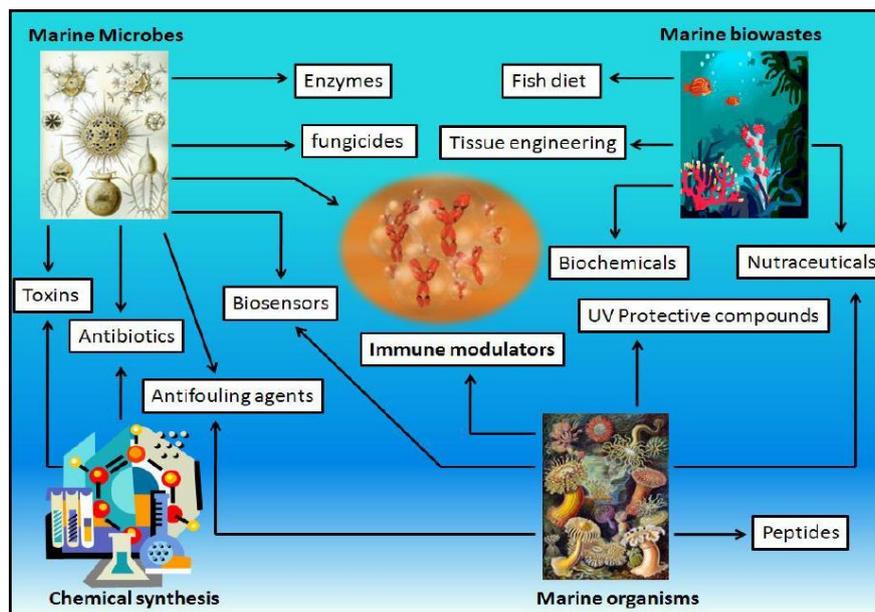


Imagen 1: Diversidad de origen y actividad de los compuestos de origen marino (Bhatnagar y Kim, 2010)

Como ejemplo, los microorganismos en general son responsables de la biosíntesis de 23.000 compuestos bioactivos descritos (antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, antivirales, inhibidores enzimáticos, antiparasitarios...) y de ellos tan solo se usan 150 con fines antitumorales. Unos 10.000 compuestos de estos son producidos por actinomicetos, representando el 45% del total, pero llegando a representar el 80% si

tenemos en cuenta los compuestos aprobados en clínica (Berdy 2005). El número de estos compuestos procedentes de microorganismos marinos es muy inferior con respecto al procedente de fuentes terrestres, lo que permite predecir una futura explosión de compuestos bioactivos de origen marino.

1.3. Los actinomicetos como factorías bacterianas de metabolitos bioactivos

Los actinomicetos son bacterias filamentosas, que dan lugar a micelios ramificados similares al de los hongos filamentosos. Son Gram positivas pertenecientes al filo *Actinobacteria*, una de las unidades taxonómicas más extensas en la microbiología (Ventura, Canchaya et al. 2007). Estas bacterias están ampliamente distribuidas en los ecosistemas acuáticos y terrestres, especialmente en el suelo, donde juegan un papel muy importante en el reciclaje de materia orgánica.

Los miembros de este grupo son productores de muchos compuestos utilizados como antitumorales, como las antraciclinas (aclerubicina, daunomicina y doxorubicina), péptidos de síntesis no ribosomal (bleomicina y actinomicina D), ácidos aureólicos (mitramicina), enedinas (neozarzinostatina), antimetabolitos (pentostatina), carzinopilina, mitomicinas y otros (Olano, Mendez et al. 2011)

Sin embargo, la búsqueda de nuevos medicamentos sigue siendo un objetivo prioritario para el tratamiento del cáncer, debido al rápido desarrollo de resistencia a los fármacos en uso, y la alta toxicidad asociada a la quimioterapia del cáncer y sus efectos secundarios. Esto hace necesarios nuevos fármacos contra tumores intratables, con menos efectos secundarios o con una eficiencia terapéutica mayor.

El aislamiento de actinomicetos marinos ha demostrado ser una buena fuente de nuevos compuestos bioactivos. Se estima que tan solo un 1% de los microorganismos marinos ha sido cultivado (Bernan, Greenstein et al. 1997). Los sistemas biológicos en los que viven los actinomicetos marinos son distintos a los terrestres, ya que se han descubierto muchas especies en simbiosis con esponjas o moluscos, siendo además halófilos. Todas estas características complican su cultivo (Olano, Mendez et al. 2011).

Los géneros de actinomicetos marinos en los que se ha identificado algún compuesto antitumoral son los siguientes: *Streptomyces* (chinicomincinas, caboxamicina, equinosporinas, actinofuranonas...); *Actinomadura* (1,6-fhenazinediol, sandramicinas, IB-0028...); *Salinispora* (esporólidos, salinipironas, salinimicinas...); *Saccharopolyspora* (undecilprodigiosina); *Nocardiosis* (lucentamicinas); *Marinispora* (lucentamicinas); *Verrucosispora* (proximicinas); *Chainia*; *Thermoactinomyces* (mequercarmicinas); *Micromonospora* (tiocoralina, estaurosporinas, IB-96212) (Olano, Mendez et al. 2011)

1.4. El género *Micromonospora*

Micromonospora (*mikros* = pequeño, *mono* = una y *spora* = espora), es un género de bacterias perteneciente al orden de los *Actinomycetales*, caracterizadas por poseer esporas únicas y carecer de micelio aéreo. Sus colonias, cuando crecen en medio sólido, tienen un color amarillo o anaranjado, que va oscureciéndose tornando a rojo, marrón, azul-verdoso o morado.

El género *Micromonospora* fue descrito en 1923 por Orskov. En la década de los 80, la lista de especies englobaba sólo 12. En la década de los 90, el género hasta entonces conocido como *Catellatospora* pasó a denominarse también *Micromonospora* debido a la realización de un análisis de ARN ribosómico 16S (Lee, Goodfellow et al. 1999). A comienzos del año 2000 se publicó una rectificación del género (Kasai, Ezaki et al. 2000). En la última década, los nuevos avances en biología molecular han permitido completar la lista de especies, conociéndose 37 especies del género *Micromonospora* en la actualidad.

Es un género con un hábitat muy diverso. Aparecen en suelos, y la mayor parte de ellas pertenecen a especies acuáticas, desde lodos a sedimentos de los ríos y mares (Trujillo, Fernández-Molinero et al. 2005), e incluso en la turba de zonas boscosas (Thawai, Tanasupawat et al. 2007). De todos los



Imagen 2: *Micromonospora* sp. (Harbor Branch Marine Microbial Database)

actinomicetos aislados en arrozales de Japón, el 14% son *Micromonospora* (Ishizawa et al, 1969). También se han aislado en rocas de la Antártida (Hirsch, Mevs et al. 2004), arena de playa, sedimentos de las profundidades marinas, esponjas marinas o en manglares (Zhang, Lee et al. 2006; Jongrungruangchok, Tanasupawat et al. 2008).

Algunas cepas de este género son simbioses, encontrándose en el tracto digestivo de termitas y ovejas (Maluszynska y Janota-Bassalik 1974), siendo desconocidas las funciones que desempeñan. En otros estudios más recientes se observa que aparecen cepas con una posible función protectora de raíces, al exudar metabolitos secundarios que protegen a la planta frente a patógenos (Trujillo, Fernández-Molinero et al. 2005).

Todas las bacterias pertenecientes a este género tienen la cualidad de producir un gran número de metabolitos secundarios. A partir de estas cepas se han obtenido antibióticos como las gentamicinas y sisomicinas (aminocilicinas), macrólidos como la rosamicina, y antibióticos polisacáridos como la everninomicina (Lazzarini, Cavaletti et al. 2000).

También se obtienen antitumorales como la dinemicina A de *Micromonospora chersina* (Miyoshi-Saitoh, Morisaki et al. 1991), la calicheamicina producida por *Micromonospora echinospora* (Love, Maiese et al. 1992), y la lupinadicina en *Micromonospora lupini*, que ha demostrado capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon (Igarashi, Trujillo et al. 2007).

2. TIOCORALINA

En 1997 la compañía farmacéutica Pharmamar SA aisló dos subespecies de *Micromonospora*, a partir de muestras de invertebrados recogidas en la costa de Mozambique, denominándolas *Micromonospora sp.* ML1 (aislada a partir de un molusco) y *Micromonospora sp.* ACM2-092 (aislada de un coral blando). Ambas son productoras de tiocoralina.

2.1.1. Actividad biológica de la tiocoralina.

La tiocoralina es un potente compuesto antitumoral que ha mostrado actividad *in vitro* contra el cáncer de colon, carcinomas de células microcíticas de pulmón y líneas

celulares de melanina, así como *in vivo* contra carcinomas humanos injertados en ratón (Sheoran, King et al, 2008). La tiocoralina inhibe la síntesis de ADN consiguiendo parar el ciclo celular, al inhibir de forma directa la actividad de la ADN-polimerasa alfa (Dawson, Malkinson et al. 2007).

Para evaluar la citotoxicidad de la tiocoralina se han utilizado 12 líneas celulares tumorales humanas: próstata, ovario, mama, melanoma, pulmón, leucemia, páncreas, colon y cuello de útero. La tiocoralina mostró un potencial similar en todas ellas después de 72h, siendo en ovario y próstata menos efectiva y más efectiva en leucemia y colon (Negri, Marco et al. 2007).

2.1.2. El ADN como diana terapéutica

El cáncer está caracterizado por una división celular incontrolada, esta proliferación celular implica la replicación del material genético, cuyo soporte físico es el ADN. Además, se trata de una enfermedad originada por la acumulación de mutaciones que alteran la funcionalidad o a la regulación genética de genes que regulan el proceso de proliferación celular. Estos dos acontecimientos hacen que la molécula de ADN sea muy importante como diana en las investigaciones oncológicas.

Existen moléculas cuya afinidad por el ADN puede estar dirigida hacia la cadena sencilla o hacia la doble hélice. Por su interés terapéutico, tienen especial relevancia los compuestos que se unen a la doble hélice del ADN. Estas moléculas pueden tener distinta afinidad por el surco mayor y menor. Además, el ADN de doble cadena es capaz de adoptar diferentes conformaciones en función a diversos factores como su hidratación, secuencia de bases y la cantidad de cargas positivas que se encuentren en el medio (Tse y Boger 2004).

Así, existen fármacos que utilizan como diana el ADN dependiendo de su conformación espacial característica. El fármaco Trabectedine, por ejemplo, se une al surco menor del ADN causando una modificación que finaliza con la inducción en la célula de la muerte por apoptosis (Denny 2001).

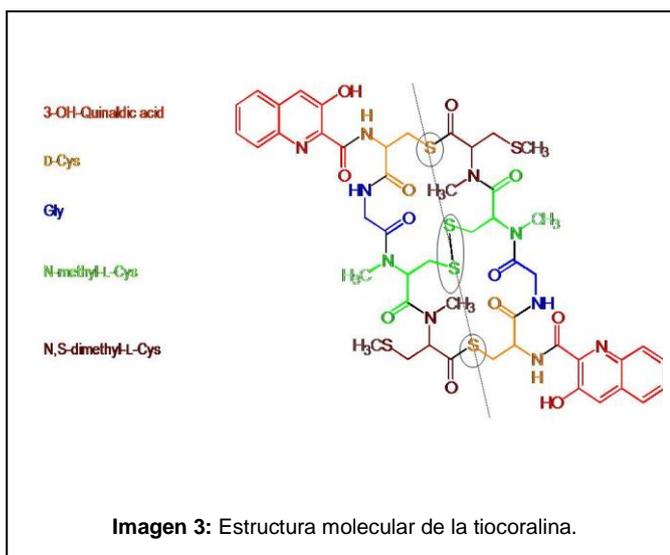
En general son más comunes los compuestos bioactivos naturales que se unen al ADN por el surco menor, como por ejemplo, la distamicina A, obtenida a partir de

Streptomyces distallicus, o la nestropsina, obtenida de *Streptomyces netropsis* (Denny 2001). La tiocoralina es también un agente intercalante en el surco menor de la doble hélice del ADN (Zolova et al. 2010).

2.1.3. Familia química de la tiocoralina.

Los agentes intercalantes suelen estar formados principalmente por estructuras policíclicas planas, que son generalmente conjuntos de anillos aromáticos o heteroaromáticos y que tienen la capacidad de insertarse entre las bases nitrogenadas del ADN. Debido a su estructura tienen la capacidad de absorber la luz UV y son sustancias coloreadas, por lo que se suelen denominar también ``cromóforos``. Las fuerzas de unión a la doble hélice se basan en interacciones hidrofóbicas (Zolova et al. 2010).

La tiocoralina es un agente intercalante que pertenece a la familia de los tiodepsipéptidos, grupo que se caracteriza por poseer uno o varios grupos *tiol* acilados. Este antitumoral contiene dos moléculas del cromóforo ácido 3-hidroxi-quináldico (3HQA), que actúa como iniciador en la ruta de biosíntesis de la tiocoralina, en la cual al mismo se incorporan de forma ordenada cuatro aminoácidos. Además, en la



estructura de este compuesto hay dos secciones idénticas y antiparalelas, formadas por los mismos constituyentes: 3HQA-D-Cys-Gly-N-metil-L-Cys-N,S-dimetil-L-Cys. Las dos secciones se unen a través de enlaces tioéster entre la primera D-Cys y la última N,S-dimetil-L-Cys de la otra sección, y por un enlace disulfuro central, generándose la molécula final bicíclica (Zolova, Mady et al. 2010). La tiocoralina pertenece a su vez a una pequeña familia de agentes intercalantes sintetizados por actinomicetos.

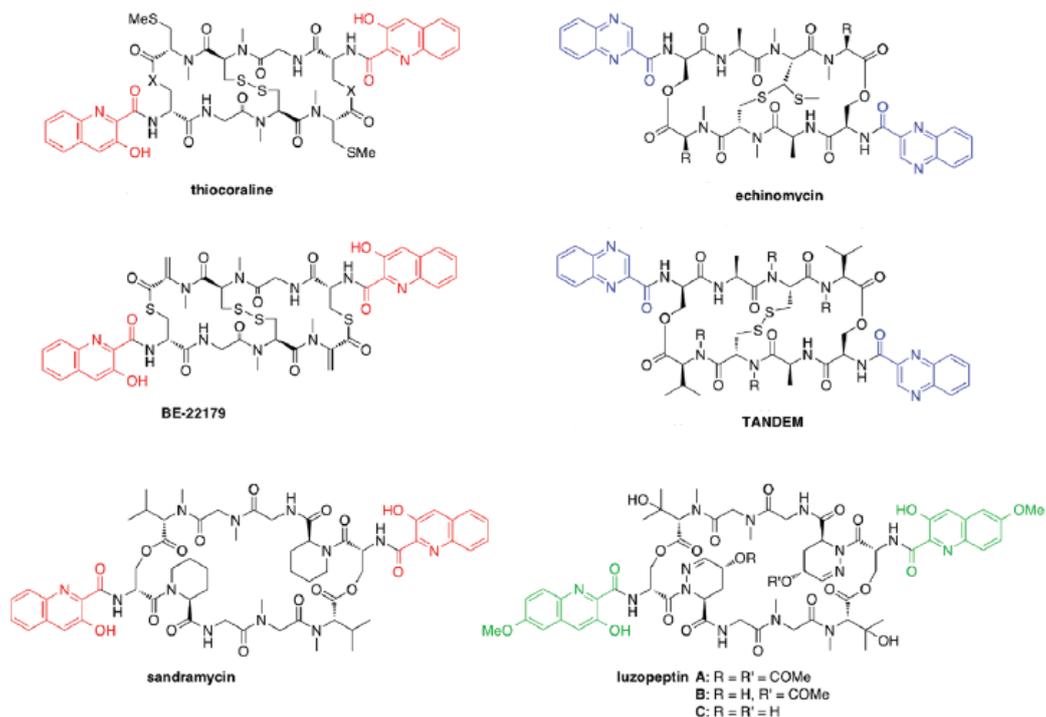


Imagen 4: Cromóforos en agentes intercalantes producidos por actinomicetos. En rojo se muestra el ácido 3-hidroxiquináldico, en verde el ácido 6-metoxi-3-hidroxiquináldico y en azul el ácido quinoxálico (Zolova et al. 2010).

2.1.4. Diana de la tiocoralina: Secuencias CpG.

La técnica de *ADN footprinting* utilizando ADNsa I ha sido utilizada para identificar los sitios de unión de diversos ligandos, como la actinomicina, mitramicina, antibióticos quinoxalínicos, daunomicina, nogalamicina y agentes que se unen al surco menor (Negri et al. 2007; Biswas et al. 2010).

Se demostró que el 3HQA (cromóforo de la tiocoralina) lleva a cabo un sistema de unión al ADN en sitios ricos de secuencias GpC. Durante la bisintercalación, entre el corazón peptídico de la tiocoralina y el surco menor del ADN se crean puentes de hidrógeno que consolidan esta estructura y la refuerzan. De esta forma las dos hebras de ADN no se separan, las polimerasas no pueden actuar y la célula sufre apoptosis (Negri, Marco et al. 2007; Biswas, Zolova et al. 2010). Se ha confirmado la unión preferente de la tiocoralina a secuencias ricas en GC frente a AT y en concreto al par CpG (Negri, Marco et al. 2007; Sheoran, King et al. 2008; Zolova, Mady et al. 2010).

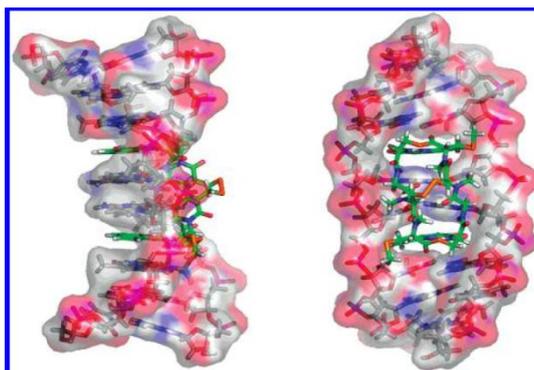


Figure 10. Side and front views of a representative structure of the bisintercalated thiocoraline-d(CATCGTG)₂ complex studied. Note the unwinding of the helix that is typical in the complexes of echinomycin and triostin A with similar oligonucleotides.^{8,30} DNA atoms are enveloped by a semitransparent surface, and thiocoraline is displayed as sticks with C atoms colored in green.

Imagen 5: Unión de la tiocoralina al surco menor del ADN en secuencias CpG (Negri, et al 2007).

2.2. BIOSÍNTESIS DE TIOCORALINA.

La biosíntesis de la tiocoralina sigue un modelo que ocurre en cuatro etapas: la biosíntesis del cromóforo (3HQA), la unión del 3HQA a D-Cys, el crecimiento de la cadena peptídica por una NRPS modular y la dimerización del producto final simétrico (Lombó, Velasco et al. 2006).

2.2.1. Propuesta de la ruta biosintética

La tiocoralina contiene dos moléculas del cromóforo ácido 3-hidroxi-quináldico (3HQA), que probablemente actúa como iniciador de la ruta biosintética de la tiocoralina. Cada una de las dos secciones de este compuesto contiene los mismos residuos: 3HQA-D-Cys-Gly-N-metil-L-Cys-N,S-dimetil-L-Cys. Las dos partes se unen a través de enlaces tioéster entre la primera D-Cys y la N,S-dimetil-L-Cys final a la otra sección y por un enlace disulfuro cruzado, que genera la molécula final bicíclica.

2.2.2. Síntesis del cromóforo 3HQA

El precursor para la biosíntesis de 3HQA es el L-triptófano. Este aminoácido es activado por la NRPS TioK con ayuda de la enzima TioT. A continuación el citocromo P450 TioI hidroxila la cadena lateral del L-Trp, y la tioesterasa de tipo II TioQ libera el

hidroxi-L-Trp. La triptófano-dioxigenasa TioF rompe el heterociclo del hidroxi-L-Trp y genera formil-kynurenina. A partir de aquí no está claro si existe una formamidasa encargada de la hidrólisis de este grupo formilo o si su eliminación es espontánea. Finalmente la aminotransferasa TioG genera ácido 3,4-dihidroxi-quináldico, el último precursor del 3HQA.

El gen seleccionado en este trabajo, *tioH*, está relacionado con la última etapa de esta ruta biosintética del 3HQA. Este gen parece estar encargado de la eliminación del grupo 4-hidroxi del precursor ácido 3,4-dihidroxi-quináldico. La caracterización de esta enzima en este trabajo va a permitir validar el modelo de síntesis aceptado para la formación del 3HQA.

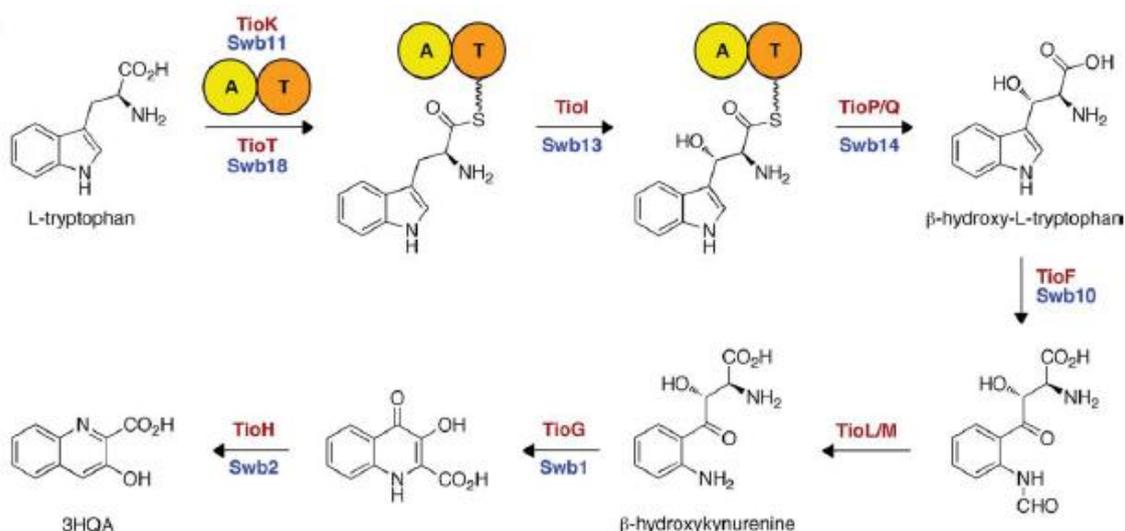


Imagen 6: Modelo aceptado para la síntesis del 3HQA (Zolova, Mady et al. 2010).

2.2.3. Síntesis de tiocoralina a partir del cromóforo.

A continuación, este 3HQA va a ser activado por una ligasa, generando 3HQA-AMP, que es cargado en el dominio PCP (*peptidil-carrier-protein*) o de tiolación de la NRPS de tiocoralina. Los siguientes módulos de esta NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthase), va a ir añadiendo secuencialmente los cuatro aminoácidos mencionados: L-Cys, Gly, L-Cys y L-Cys. Este sistema NRPS está formado por las proteínas TioR (módulos para los dos primeros aminoácidos) y TioS (módulos para los dos siguientes aminoácidos). Los sistemas NRPS son complejos enzimáticos modulares en los que

cada módulo es responsable de añadir el correspondiente aminoácido para el crecimiento de la molécula.

La biosíntesis llevada a cabo por una NRPS comprende varias etapas repetidas basadas en la acción de tres componentes que se encuentran en cada módulo de elongación del sistema NRPS: un dominio de adenilación (A), otro de tiolación (T) y otro de condensación (C). Los dominios de adenilación activan el aminoácido correspondiente a su forma unida a AMP, y éste aminoácido activado es cargado covalentemente en el dominio de tiolación. Finalmente, el dominio de condensación forma un enlace covalente entre este aminoácido cargado en el dominio T₂ y el aminoácido cargado en el dominio T₁ precedente, formándose un díptido que permanece cargado en el dominio T₂.

Además, en la NRPS de la tiocoralina, los módulos 1, 3 y 4 contienen dominios catalíticos especiales, que modifican algunos de estos aminoácidos: un dominio de epimerasa (E, módulo 1) para generar una D-Cys, y un dominio N-metiltransferasa (M, módulos 3 y 4) para generar N-methyl-L-Cys.

Durante esta fase se forman dos cadenas peptídicas idénticas.

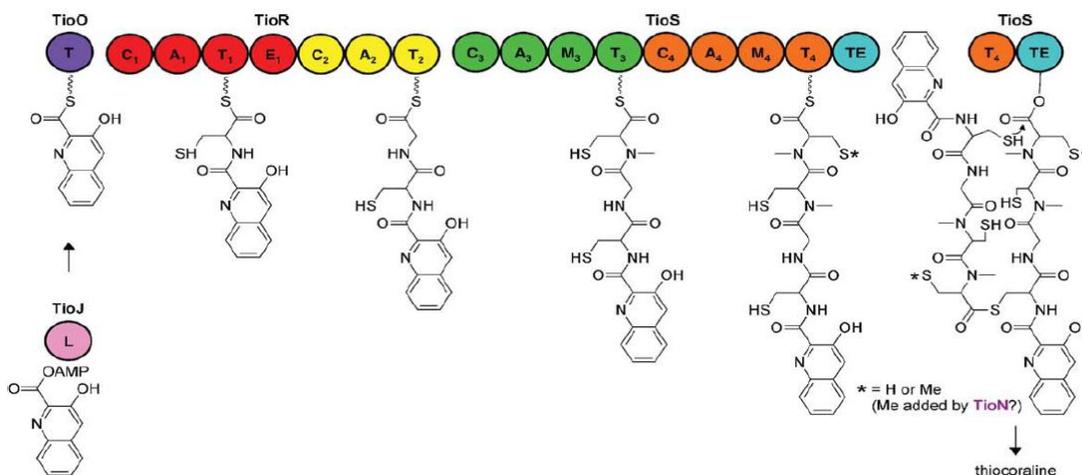


Imagen 7: Estructura del NRPS de tiocoralina, A es el dominio de adenilación, C es el dominio de condensación, E es el dominio de epimerización, L es la AMP-ligasa, M es el dominio N-metiltransferasa, T es el dominio de Tiolación Y TE el dominio Tioesterasa (Zolova, Mady et al. 2010).

Una vez que la NRPS de tiocoralina ha unido los cuatro aminoácidos correspondientes al 3HQA que había actuado como iniciador de la cadena, el compuesto naciente formado por 3-HQA-D-Cys-Gly-N-metil-L-Cys-N,S-dimetil-L-Cys queda todavía unido al dominio T del último módulo. En este momento, el dominio tioesterasa (TE) hidroliza esta unión y dimeriza dos cadenas peptídicas idénticas, que se unen así entre sí, formándose un puente disulfuro entre las dos N-metil-L-Cys y dos enlaces tioéster

entre D-Cys y N,S-dimetil-L-Cys. Así se forma el depsipéptido bicíclico simétrico y antiparalelo final, la tiocoralina.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS.

En el presente trabajo fin de máster se ha determinado si la enzima codificada por el gen *tioH*, está implicada en la última etapa de la biosíntesis del cromóforo de la tiocoralina, el 3HQA.

Estos estudios se han realizado mediante la mutación de este gen en la cepa productora heteróloga de tiocoralina *S.albus*-pFL1049. Esta cepa es más manipulable a nivel genético que el productor marino original *Micromonospora sp.*ML1, y contiene insertada en su cromosoma la ruta completa de biosíntesis de tiocoralina.

El objetivo de este trabajo ha sido:

- Generación de un mutante por reemplazamiento génico en *tioH* y análisis de la producción de tiocoralina en el mismo, para conocer la función de la enzima TioH durante la biosíntesis de este antitumoral.

4. Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Microorganismos empleados

En las siguientes tablas se muestran los microorganismos y los principales plásmidos utilizados en el presente trabajo, indicando su genotipo y su procedencia. Los datos de los microorganismos se han obtenido de [http://openwetware.org/wiki/Main Page](http://openwetware.org/wiki/Main_Page):

ORGANISMO	CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	F-, <i>endA1</i> , <i>recA1 galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> , Δ lacx74, ϕ 80lacZ Δ M15, <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) λ -, <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>nupG</i> .	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, <i>nupG recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> λ -.	Invitrogen
<i>Streptomyces albus</i>	pFL1049	Cepa productora de tiocoralina.	Lombó et al. 2006

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pCR©Blunt	Vector de clonación de productos de PCR; LacZ ⁺ , Kn ^R (3,5 kb)	Invitrogen
pUC19	Vector de selección positiva de <i>E.coli</i> ; LacZ ⁺ , Ap ^R (2,6 kb).	Yanisch-Perron, C., <i>et al.</i> , 1985
pBSKT	Vector de selección positiva; derivado de pBSK: LacZ ⁺ , Ap ^R , Tio ^R (4,4 kb)	Lombó, F., <i>et al</i> , 1999
pDSHermE	Vector derivado de pCR©Blunt Secuencias lox flanqueando al gen <i>ermE</i> ; 4,8 kb.	Sánchez, D., no publicado

4.2. Métodos microbiológicos

Los métodos utilizados para el cultivo de *E. coli* y *Streptomyces albus*, han sido los descritos por Sambrook et al. 2001 y Hopwood et al. 1985, respectivamente.

4.2.1. Medios de cultivo.

Los medios sólidos se han realizado añadiendo agar en un porcentaje adecuado (generalmente el 2%). Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

- **Medio LB:** (Kieser et al. 2000). Medio líquido utilizado para obtener masa celular de la que se puede obtener ADN plasmídico. Composición: Triptona (5 g/l), extracto de levadura NaCl (5 g/l) y glucosa (1 g/l). Al añadir agar se obtiene el medio LA.
- **Medio TSB:** (Tryptone Soya Broth, Merck). Medio líquido comercial compuesto de peptona de caseína (g/l), peptona de soja (g/l), NaCl(g/l), fosfato dipotásico (g/l), y glucosa (g/l) por litro de agua destilada. Si al TSB le añadimos 15 g de agar por litro obtenemos el medio TSA. Se utiliza para obtener masa celular en *E.coli* o para realizar preinóculos de *Streptomyces* destinados a la obtención de ADN cromosómico o plasmídico.
- **Medio YEME 17%:** (Kieser et al. 2000): Medio líquido utilizado para obtener protoplastos de *Streptomyces albus*. Composición: glucosa (10 g/l), extracto de levadura (3 g/l), extracto de malta (3 g/l), peptona de carne (5 g/l) y sacarosa (170 g/l). Tras el autoclavado se suplementa con glicina al 20% (625 µl/25 ml) y MgCl₂ 1M (125 µl/25 ml).
- **Medio R5:** (Kieser et al. 2000): Medio sólido para regenerar protoplastos de *Streptomyces*. Composición: Sacarosa (103 g/l), K₂SO₄ (0,25 g/l), MgCl₂*6H₂O (10,12 g/l), glucosa (10 g/l), casaminoácidos (0,1 g/l), extracto de levadura (5 g/l), TES (5,73 g/l), 2 ml de solución de oligoelementos (ZnCl₂ 0,04 g/l, FeCl₃*6H₂O 0,2 g/l, CuCl₂*2H₂O g/l, MnCl₂*4H₂O 0,01g/l, Na₂B₄O₇*10H₂O 0,01g/l y (NH₄)₆Mo₇O₂*4H₂O 0,01g/l) y agar 25 g/l.

Tras autoclavar se suplementa con 10 ml/l de KH_2PO_4 0,5%, 4 ml/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5M, 15 ml/l de L-prolina 20% y 7 ml/l de NaOH 1M.

- **Medio R5A:** (Kieser et al. 2000): Medio utilizado para la producción de metabolitos secundarios y su aislamiento. Composición: Sacarosa (103 g/l), K_2SO_4 (0,25 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,12 g/l), glucosa (10 g/l), casaminoácidos (0,1 g/l), extracto de levadura (5 g/l), MOPS (21 g/l) y 2 ml de solución de oligoelementos (como en R5). Se ajusta a pH 6,8 antes de autoclavar.
- **Medio Bennet:** (Kieser et al. 2000): Medio sólido utilizado para la esporulación de *Streptomyces albus*. Composición: Glucosa (5 g/l), extracto de levadura (0,5 g/l), extracto de carne (0,5 g/l), casaminoácidos (1 g/l) y agar (22 g/l). Se ajusta a pH 7 utilizando KOH.

4.2.2. Cultivo de *E. coli* y *Streptomyces*.

1. Para los cultivos de *E. coli* se ha partido de una colonia aislada en medio sólido y se inoculó en medio TSB o LB al que se añade el antibiótico de selección y se incuban a 37° C en agitación (250 rpm) durante una noche.
2. Para *Streptomyces*.
 - a) Recogida de esporas:

Sembramos en medio Bennet (sólido) cubriendo con esporas o micelio la superficie de la placa Petri, e incubamos los días suficientes para que se produzca la esporulación (una semana a 30° C). Las esporas se recogen en un criovial con una solución de glicerol al 20% y se guardan a -20° C.
 - b) Obtención de protoplastos:

De las esporas en suspensión obtenidas y guardadas a -20° C, se hace un preinóculo de 100 µl en medio líquido con 10 ml de TSB, que se deja una noche a 30° C y 250 rpm en matraces lisos de 50 ml. Tras 24 h se inoculan 750 µl de este micelio fresco recién obtenido en matraces invaginados de 250 ml con 25 ml de medio líquido YEME 17% suplementado y se dejan 36 h a 30° C y 250 rpm.
 - c) Obtención de tiocoralina:

Se procede de la forma anterior, pero se utiliza un preinóculo de micelio fresco para inocular 25 ml de medio R5A en matraces invaginados de 250 ml, dejándolos en agitación durante 5 días a 30° C y 250 rpm.

4.2.3. Condiciones de conservación de las células.

Para conservar las células de *E. coli* de interés, se parte de 1,5 ml de cultivo líquido, se centrifuga 5 minutos a 14.000 rpm, se resuspende en 750 µl de medio LB y se añade 750 µl de glicerol al 50%.

Las esporas de *Streptomyces* recogidas de medio sólido se han conservado en glicerol al 20%.

Ambas suspensiones celulares se han guardado a -20° C para su posterior uso como inóculos.

4.2.4. Antibióticos.

Las soluciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

ANTIBIÓTICO	SOLVENTE	CONCENTRACIÓN INICIAL (mg/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL (µl/ml)
Ampicilina. Ap	H ₂ O	100	100
Kanamicina. Kn	H ₂ O	50	25
Tioestreptona. Tío	DMSO	25	50 (sólido), 5 (líquido)
Apramicina. Am	H ₂ O	200	15
Eritromicina. Em	Etanol 50%	100	200

Para la selección de los clones positivos en los plásmidos de *E. coli* que llevaban el inserto del ADN plasmídico que nos interesaba, en algunos casos se ha añadido al medio de cultivo el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido). Algunos de los plásmidos utilizados llevan el gen *lacZ*, cuyo producto, la enzima β-galactosidasa, hidroliza al X-gal del medio dando galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo que da coloración azul. Las colonias de *E. coli* crecidas en el medio con antibiótico y X-gal, llevan el plásmido que tiene la resistencia para el antibiótico determinado, y este el gen *lacZ* intacto, siendo por tanto azules. Sin embargo, las colonias blancas tienen el plásmido, pero con el gen *lacZ* interrumpido por el gen o región que nosotros hayamos

clonado en el sitio de clonación múltiple. La solución de X-gal se prepara (para 10 ml) con 400 mg de X-gal (Sigma) y 10 ml de N,N-dimetil-formamida (Merck) y se conserva alicuotada en criotubos ámbar de 2 ml y a -20° C.

4.3. Aislamiento de ADN.

Los métodos de este apartado han sido los descritos por Sambrook et al. (2001) y Kieser et al. (2000).

4.3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de *E. coli*.

La obtención de ADN plasmídico a pequeña escala ADN desde *E. coli* se ha realizado siguiendo los protocolos que aparecen en el libro de Sambrook y Russell, 2001 (adaptación del protocolo de extracción de ADN plasmídico de Birnboim y Doly, 1979) con algunas pequeñas modificaciones:

- Solución I. Tris-HCl 50 mM y EDTA 10 mM, pH= 8.
- Solución II. NaOH 0,1 N y SDS 1%.
- Solución III. Acetato potásico 2,5 M y ácido acético glacial hasta pH 5,5.
- Etanol 70%.
- Isopropanol absoluto.
- TE: Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH= 8.

4.3.2. Obtención de ADN cromosómico.

Para extraer el ADN cromosómico desde *Streptomyces* se ha seguido el método de fenol-cloroformo descrito por Kieser et al. (2000), que permite obtener ADN poco dañado y sin proteínas acompañantes.

4.3.3. Obtención de ADN desde *E. coli* para secuenciar.

Se ha utilizado el ADN plasmídico obtenido en colonias de *E. coli* DH10B incubadas a 37° C en agitación durante una noche, y purificado mediante el Kit comercial de ``Gene JET TM Plasmid Miniprep Kit`` (Thermo FisherThermo Fisher).

4.4. Manipulación *in vitro* del ADN.

4.4.1. Digestiones enzimáticas.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se han realizado siguiendo los métodos descritos por Sambrook et al. (2001). Los tampones y las condiciones de reacción han sido los recomendados por el fabricante (Takara o Roche).

- Enzimas de restricción: Takara, Roche, Thermo Fisher y EurX.
- ADN ligasa del fago T4: Thermo Fisher.
- Lisozima: Roche
- RNasa: Sigma. Se preparó una concentración final de 10 mg/ml en Tris-HCl y NaCl 15 mM, calentándola a 90° C durante 15 minutos, para luego dejarla enfriar a temperatura ambiente y almacenarla a -20° C.
- En las desfosforilaciones, necesarias en algunos casos antes de la purificación de algunos de los plásmidos digeridos, se usaron 2 µl de fosfatasa alcalina “CIAP” (40 U/µl) (EURx) durante 10 min a 37° C, en un volumen final de 100 µl.
- Para realizar ligaciones con extremos romos partiendo de extremos cohesivos, se utilizó la enzima Klenow (fragmento largo de la AADN polimerasa I).
 - Para rellenar el extremo 3´ se utilizó 1 µl de Klenow 2U/ µl, 10 µl Buffer Klenow 10X, 3,5 µl de agua MiliQ, 2,5 µl de dNTPs 2 mM y 80 µl de AADN. Se incubó 15´ a 37° C y se purificó con el kit de purificación StrataPrep®PCR (Agilent Technologies).
 - Para rellenar el extremo 5´ se utilizaron las mismas condiciones de reacción pero primero se incubó 7´ a 37° C sin añadir dNTPs, pasado este tiempo se añadieron los dNTPs y se incubó todo 8´ a 37 °C; finalmente se purificó con el kit de purificación StrataPrep®PCR (Agilent Technologies).

4.4.2. Ligación del ADN.

En este apartado se tuvieron en cuenta las indicaciones descritas por Sambrook et al. (2001). El enzima utilizado fue la ADN ligasa del fago T4 (Invitrogen), la cual es apropiada para la unión de extremos cohesivos o romos. La proporción molar del vector

respecto del fragmento a clonar fue al menos cuatro veces favorable al fragmento de interés, estando el vector en algunos casos defosforilado para evitar religaciones del mismo. Para las ligaciones romas se utilizó la ADN ligasa de 5U/ μ l y se dejaron una noche, mientras que para las ligaciones con extremos cohesivos se utilizó una ADN ligasa de 1U/ μ l y se dejaron 2 h a temperatura ambiente.

4.4.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Las electroforesis se realizaron con tampón TBE 1X (Tris-acetato 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0,5 M 20 ml y agua hasta 1 L) como electrolito. La concentración de agarosa en el gel fue de 0,7 %. Las muestras de ADN se mezclaron con el tampón de carga 10X (100 mM de EDTA, 43 % glicerol y 0,5 % azul de bromofenol) utilizado como densificante y marcador cromogénico.

Los marcadores de peso molecular utilizados a lo largo del trabajo fueron “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Thermo Fisher), y “Perfect Plus™ 1kb DNA Ladder” (EURx), 0,5 μ g/ μ l.. Estos se resuspendieron en 100 μ l de tampón de carga (Thermo FisherThermo Fisher) y 400 μ l de agua miliQ, a una concentración final de 0,1 μ g/ μ l.

A las soluciones del ADN a cargar en los pocillos de agarosa se añadió el tampón de carga “Loading buffer 10x” (TaKaRa Biotechnology). Los geles se visualizaron en un equipo “Gel Doc 2000” (Bio-Rad).

4.4.4. Purificación de fragmentos de ADN.

Finalizada la electroforesis, se cortó la agarosa con los fragmentos de ADN de interés con un bisturí estéril. La purificación de los productos amplificados por PCR y la de los fragmentos resultantes de los cortes con enzimas de restricción en geles de agarosa al 0,7 % se llevó a cabo con el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo scientific). Para purificar el ADN después de las digestiones con enzimas de restricción se utilizó el kit de purificación StrataPrep®PCR (Agilent Technologies).

4.5. TRANSFORMACIÓN CON ADN PLASMÍDICO.

4.5.1. Preparación de células de *E. coli* quimiocompetentes y transformación.

Las células competentes de *E. coli* TOP10 se obtuvieron de cultivos en fase de crecimiento exponencial, induciendo la competencia por calcio. La transformación de dichas células se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook et al. (2001). Las células transformadas se sembraron en placas de TSA con el antibiótico de selección adecuado.

Antes de sembrar en placa, a la alícuota de células competentes transformada con el ADN plasmídico, se le añadió 1 ml de LB y se incubó en un eppendorf a 37° C durante 1h.; así aseguramos que se exprese el gen de resistencia al antibiótico. Transcurrido este tiempo las células fueron sembradas en placas de TSA y se dejaron a 37° C 24 h hasta observar colonias aisladas.

4.5.2. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes y transformación.

Las células competentes de *E. coli* DH10B se obtuvieron a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial, induciendo la competencia por glicerol al 10% a 4° C, según describe Sambrook et al. (2001). La transformación se llevó a cabo utilizando un electroporador Multiporator (Eppendorf) y aplicando a la mezcla de células y ADN plasmídico un pulso de 2500 V y 5 ms. Las células electroporadas se inocularon en 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubaron durante 1 h en agitación a 37° C para que se expresase el gen de resistencia al antibiótico. A continuación se sembraron en placas de TSA con el antibiótico de selección.

4.6. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ADN.

Estas técnicas sirven para comprobar el genotipo de los mutantes seleccionados y determinar si efectivamente se trata de los clones correctos. El proceso consta de los

siguientes pasos: electroforesis en gel de agarosa, transferencia del gen a una membrana de nylon, marcaje del fragmento de ADN usado como sonda, hibridación y revelado.

4.6.1. Electroforesis y transferencia de fragmentos de ADN a filtros de nylon.

Los fragmentos de restricción del ADN cromosómico, separados por electroforesis en gel de agarosa, fueron transferidos a membranas Hybond-N+ (GE) siguiendo la variante ``en seco`` del procedimiento descrito por Southern en 1975 (Sambrook et al. 2001).

La transferencia se llevó a cabo durante un mínimo de una noche a temperatura ambiente, para asegurar la transferencia eficaz de los fragmentos de ADN de mayor tamaño. El ADN transferido se fijó a la membrana mediante exposición a la luz UV durante 2 minutos.

4.6.2. Marcaje de sondas.

El marcaje de los fragmentos de ADN utilizados como sondas se realizó con el sistema comercial ``DIG ADN labelling and Detection Kit`` (Roche), basado en el método ``random primed`` (Feinberg y Vogelstein, 1983). Este método consiste en la incorporación enzimática de digoxigenina-11-dUTP tras añadir una mezcla de hexanucleótidos sintetizados al azar, que actúan como iniciadores de la síntesis en múltiples lugares del ADN molde, previamente desnaturalizado. La reacción fue catalizada por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*.

4.6.3. Hibridación.

Para los procesos de prehibridación e hibridación se usó un tampón de prehibridación (10xSSC, N-laurilsarcosina 0,1 %, SDS 0,2 %, reactivo de bloqueo 1 %). Con esta solución se llevó a cabo la prehibridación, incubando la membrana entre 4 y 6 h, en agitación constante y a 68° C. Tras la hibridación, las membranas se lavaron con la finalidad de eliminar las uniones inespecíficas de la sonda. Para ello se utilizaron dos soluciones de lavado (2xSSC y 0,1 % SDS) a 68° C durante 30 min cada una de ellas.

4.6.4. Revelado.

Se llevó a cabo mediante detección inmunológica de las sondas marcadas con DIG unidas al ADN cromosómico, utilizando un anticuerpo antidioxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche). La visualización de la reacción se llevó a cabo por la adición de los sustratos colorimétricos NBT/BCIP (Roche).

4.7. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR.

4.7.1. Oligonucleótidos cebadores.

El diseño de los oligonucleótidos cebadores se realizó tomando como referencia la secuencia nucleotídica de los fragmentos a amplificar. Para ello se tuvo en cuenta criterios como la proporción de G+C, el tamaño, la temperatura de desnaturalización y la posible existencia de hibridaciones entre pareja de cebadores, así como apareamientos intercadena que podrían interferir en la reacción de amplificación. Para facilitar este proceso, se utilizaron herramientas informáticas (Fast PCR y Primer3) en el diseño de oligonucleótidos (Kibbe, 2007). Además, para facilitar la posterior clonación de los amplicones obtenidos, en la secuencia se añadieron en los extremos 5' de forma manual secuencias que presentan sitios diana para enzimas de restricción concretos.

En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para amplificar las dos regiones flanqueantes a *tioH* necesarias para realizar un doble sobrecruzamiento:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DE ADN (5'-3') up.	SECUENCIA DE ADN (5'-3') rp.
TIOHleft	aaagacagcgagtcggcgaggtggtc	aaagacggcggtcgcacctcctga
TIOHright	aaatgcctcggcttcggttggggacac	aaagcttggcgggatactgcggtcca

El fragmento de amplificación TIOHleft tiene un tamaño de 3.590 pb, mientras que TIOHright tiene un tamaño de 3.613 pb.

Para la comprobación del mutante final, se sintetizaron dos oligonucleótidos flanqueantes a *tioH*; el oligo up en el interior de la secuencia de *tioG* y el oligo rp en el interior de la secuencia de *tioI*. La amplificación con estos oligonucleótidos debe de dar una banda de 1.478 pb si se trata de la cepa salvaje, mientras que en la cepa mutante

(donde se produce una sustitución de *tioH* por el gen *ermE*) debe de dar una banda de 2.250 pb. De este modo podremos comprobar la existencia o no de las cepas mutantes.

En la tabla siguiente se muestran los oligonucleótidos de comprobación:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DE ADN (5'-3') up.	SECUENCIA DE ADN (5'-3') rp.
TIOHcomprobación	tggcggggtgaagtagggctcgc	agctcaacctgcagcgtcgggttagga

4.7.2. Condiciones de reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo añadiendo los siguientes elementos a un volumen final de 50 µl.

H ₂ O miliQ	22 µl
Buffer Pfx, 10x (Invitrogen)	5 µl
Mezcla de desoxirribonucleótidos ``dNTPs`` (2mM)	7,5 µl
Primer up (20 µM)	1,5 µl
Primer rp (20 µM)	1,5 µl
ADN molde	1 µl
MgSO ₄ (1mM)	1 µl
PCRx enhancer solution (Invitrogen)	10 µl
Polimerasa Pfx 1U/ µl (Invitrogen)	0,5 µl

Cuando se amplifica ADN de *Streptomyces* frecuentemente aparecen problemas debido al alto porcentaje guanina citosina (G+C). Las regiones de ADN ricas en G+C forman estructuras secundarias que impiden su completa desnaturalización e interfieren con el anillamiento de los oligonucleótidos, dando lugar a baja cantidad de producto de PCR o un completo fallo en la amplificación. Para facilitar el proceso de desnaturalización se añadió el reactivo ``PCRx Enhancer Solution`` (Invitrogen), que debilita las uniones GC, eliminando estructuras secundarias y permitiendo que los oligonucleótidos puedan acceder fácilmente a su secuencia diana.

El termociclador utilizado fue Veriti 96 Whell Thermal Cyclers (Applied Biosystems).

4.7.3. Programa de amplificación.

El programa de amplificación estándar fue el siguiente:

1. 94° C / 5'. Paso inicial de desnaturalización.
 2. 94° C / 30''.
 3. 63,4° C / 1'. Anillamiento.
 4. 72° C / 4'. (1' por cada Kb amplificada).
 5. 72° C / 5'. Paso final de la extensión.
 6. 4° C / ∞. Fin de reacción.
- Ciclos de amplificación: 30x

Para la amplificación de comprobación se utilizó este programa:

7. 94° C / 5'. Paso inicial de desnaturalización.
 8. 94° C / 30''.
 9. 65,1° C / 1'. Anillamiento.
 10. 72° C / 90''. (1' por cada Kb amplificada).
 11. 72° C / 5'. Paso final de la extensión.
 12. 4° C / ∞. Fin de reacción.
- Ciclos de amplificación: 30x

4.8. GENERACIÓN DE MUTANTES POR REEMPLAZAMIENTO GÉNICO.

En este proceso se sustituye el gen de interés por un gen asociado a un marcador de utilidad selectiva. En nuestro caso la sustitución se realizó por el gen de resistencia a la eritromicina y su promotor. De esta forma se genera un mutante en el que el gen *tioH* no podrá traducirse a una proteína funcional.

4.9. SECUENCIACIÓN.

Los productos amplificados fueron purificados usando el Gel Extraction Kit (Qiagen). Una vez purificados, fueron secuenciados con el kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se purificó según las indicaciones de BigDye[®] Terminator y los productos fueron analizados en el secuenciador automático 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

La secuenciación automática de ADN desarrollada por Applied Biosystems utiliza la metodología de Sanger, con una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación cíclica. El producto de la reacción se separa mediante electroforesis capilar y la detección de fluorescencia es inducida por láser. La detección de cada una de las bases se realiza por el método de terminación de cadena en el que los ddNTPs se encuentran marcados con 4 fluorocromos distintos, de tal forma que a medida que se incorporan detienen la elongación y marcan la base que incorporaron. Estos fluorocromos están incorporados en el kit BigDye[®] que se utilizan en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (SCTs), y que incluye la polimerasa, el MgCl₂, los dNTPs marcados y el tampón de reacción (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Los cromatogramas obtenidos se leyeron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Para comparar la secuencia que obteníamos desde los SCTs y la secuencia teórica de las regiones correspondientes, y comprobar si se trataba del clon correcto, se utilizó el programa ClustalW2, del Instituto Bioinformático Europeo EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Una vez comprobados los diferentes clones, para dibujar los plásmidos resultantes y también los vectores comerciales, se utilizó el programa Clone Manager Professional_v9.2.

4.10. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DESDE CULTIVOS DE *Streptomyces*.

La producción de tiocoralina se realizó en medio R5A. El cultivo se inició con un inóculo grande de esporas (10⁶ esporas/ml de cultivo) conservadas en glicerol al 20 %, y éste matraz se incubó a 30° C durante 4 días. Tras este tiempo se realizó la extracción de 1 ml de cultivo con 2 ml de acetato de etilo, de los que se recogieron 1,5 ml tras centrifugación. El solvente se evaporó en una centrífuga acoplada a una bomba de vacío (Speed-Vac).

El extracto, una vez seco, se resuspendió en 100 µl una mezcla de DMSO y MeOH 1:1 se analizó por HPLC.

4.11. ANÁLISIS POR HPLC

El análisis para monitorizar la producción de tiocoralina por parte de la cepa *S. albus*-pFL1049 silvestre, frente al mutante *S. albus*-pFL1049-*AtioH*, se realizó en

HPLC(Agilent), en un sistema equipado con dos bombas LC-10AD y un detector UV-Vis SPD-M10AD con foto-diodo DAD.

El extracto seco del cultivo correspondiente se resuspendió en 100 µl de DMSO:MeOH 1:1, y fue analizado con la siguientes condiciones de cromatografía:

- Columna: C18 ODS1 TeknoCroma 0,41x25 cm 5 µm partícula.
- Volumen de inyección: 10 µl.
- Flujo: 1 ml/min.
- Fase móvil A: H₂O + 0,1 % Ácido acético.
- Fase móvil B: Acetonitrilo
- Programa: 0-10 min 10 % B, 10-30 min subiendo hasta 99 % B, 30-40 min 99 % B, 40-50 min 10 % B.

Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 250 nm. En esas condiciones, el pico correspondiente a tiocoralina aparece a los 29,1 min.

5. Resultados y discusión

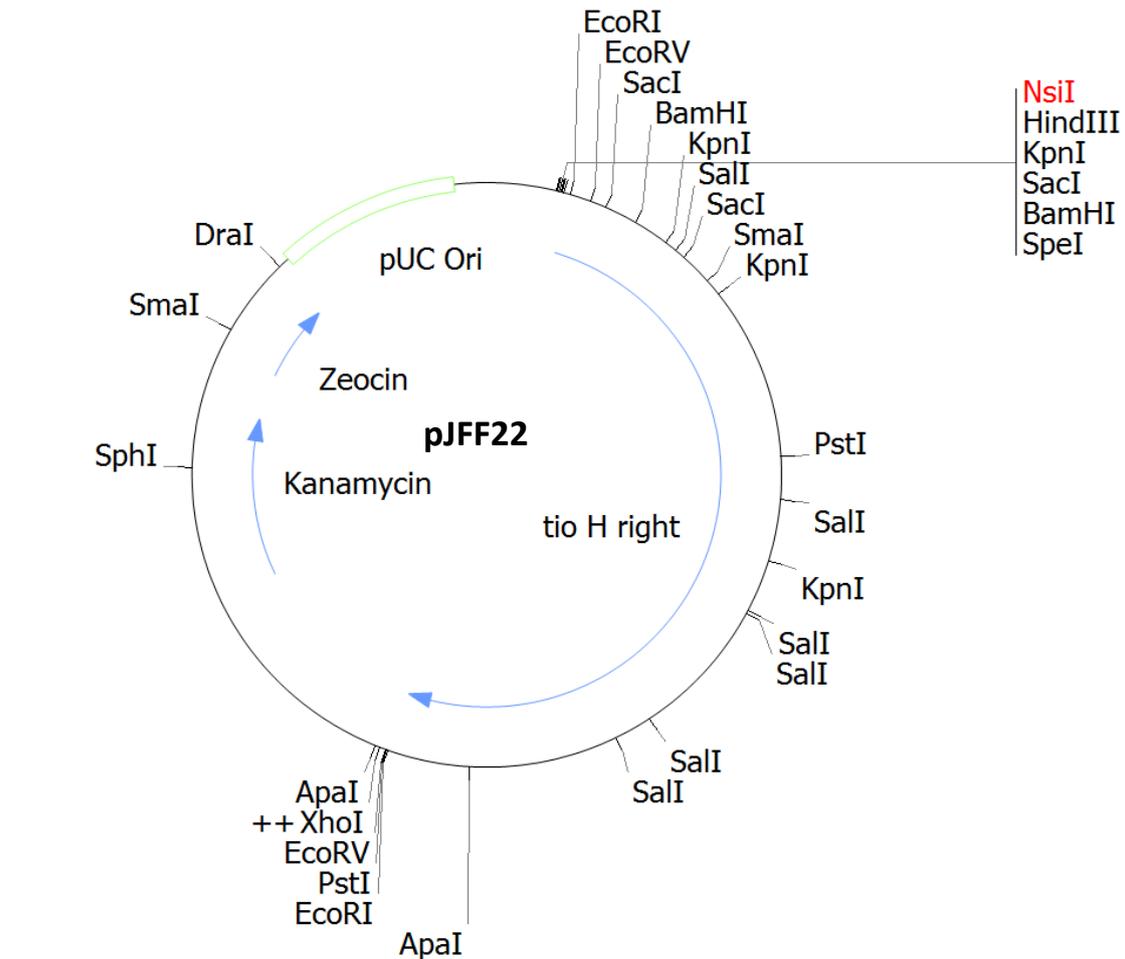


Figura 9: Plásmido pJFF22.

El fragmento *tioH-Left* (desde pJFF21) se subclonó en el plásmido pMAS13, que es un derivado del plásmido replicativo en *E. coli* pBluescriptSK que además contiene el promotor de la eritromicina y el gen de resistencia a tiorstreptona, y que se usa como marcador de selección de las colonias de protoplastos en el proceso de reemplazamiento génico. El fragmento *tioH-Left* clonado en pJFF21 fue obtenido mediante digestión con *Ecl136II* y clonado en el plásmido pMAS13 digerido con *SmaI* y defosforilado posteriormente con fosfatasa alcalina para evitar la religación del plásmido abierto, generándose la nueva construcción denominada pJFF23.

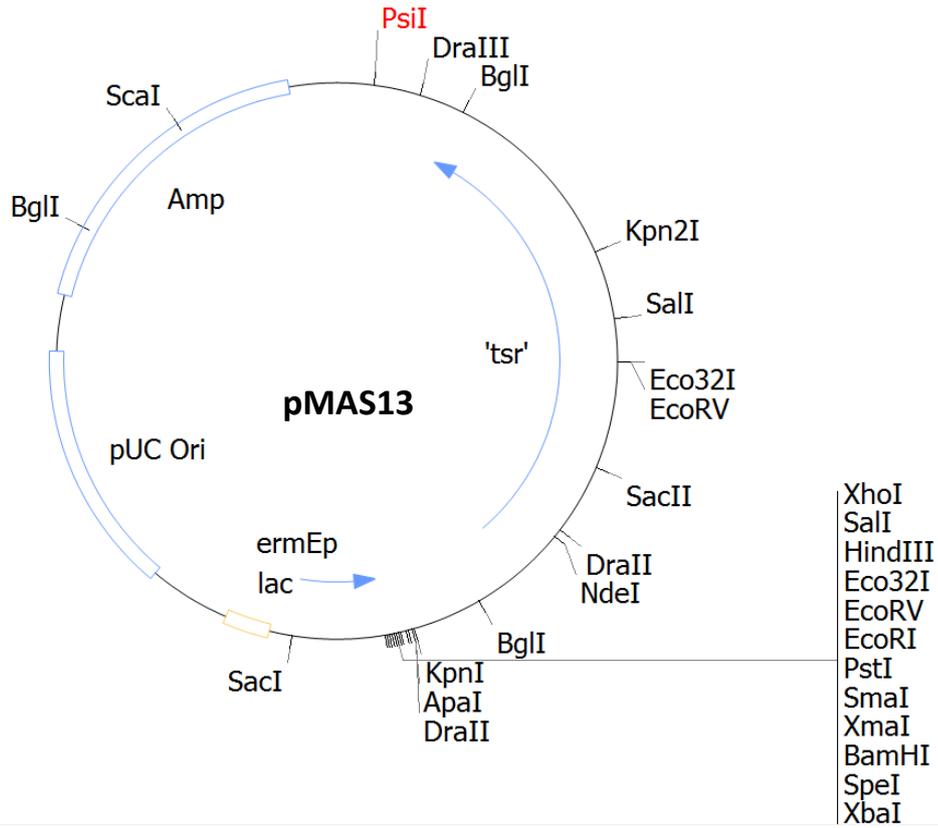


Figura 10: Plásmido pMAS13.

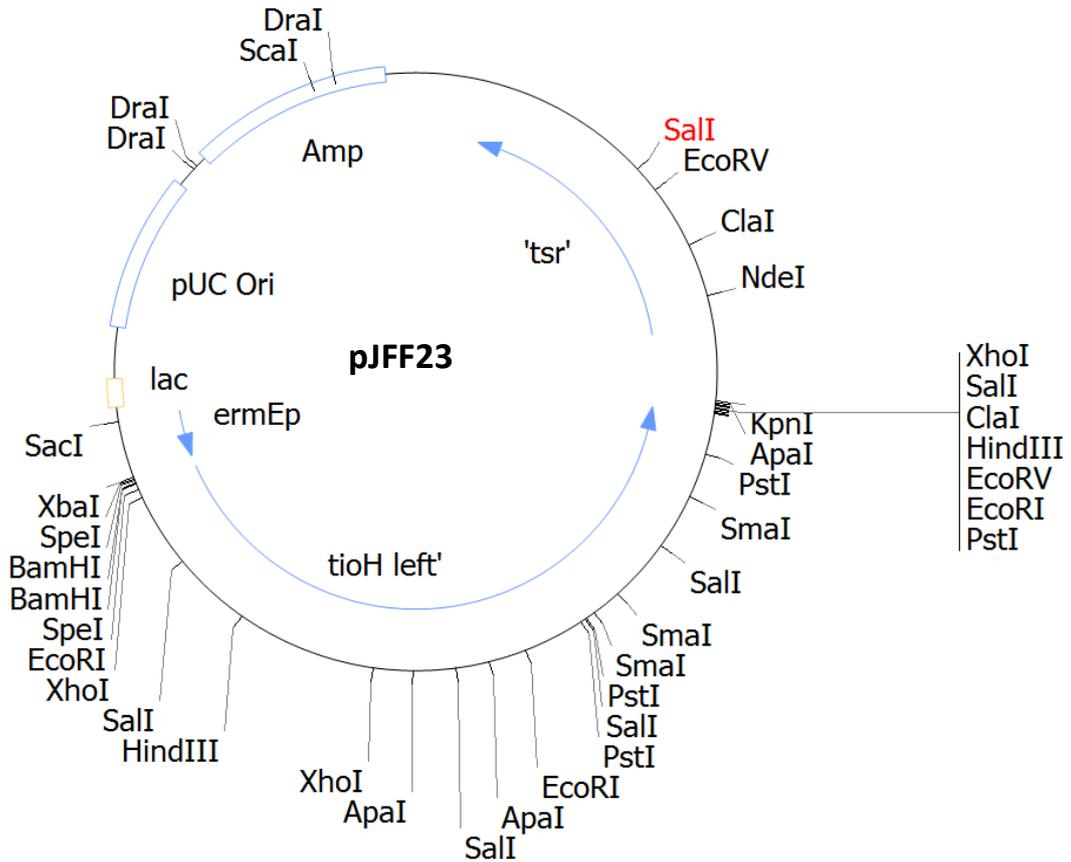


Figura 11: Plásmido pJFF23.

El gen de la resistencia a la eritromicina proveniente de pDSH se subclonó en pBSKT (derivado de pBluescriptSK con el gen de resistencia a tiorstreptona) tras la digestión de pDSH y pBSKT con *EcoRI*. El plásmido receptor digerido fue defosforilado con fosfatasa alcalina para evitar que religase, generándose pJFF24.

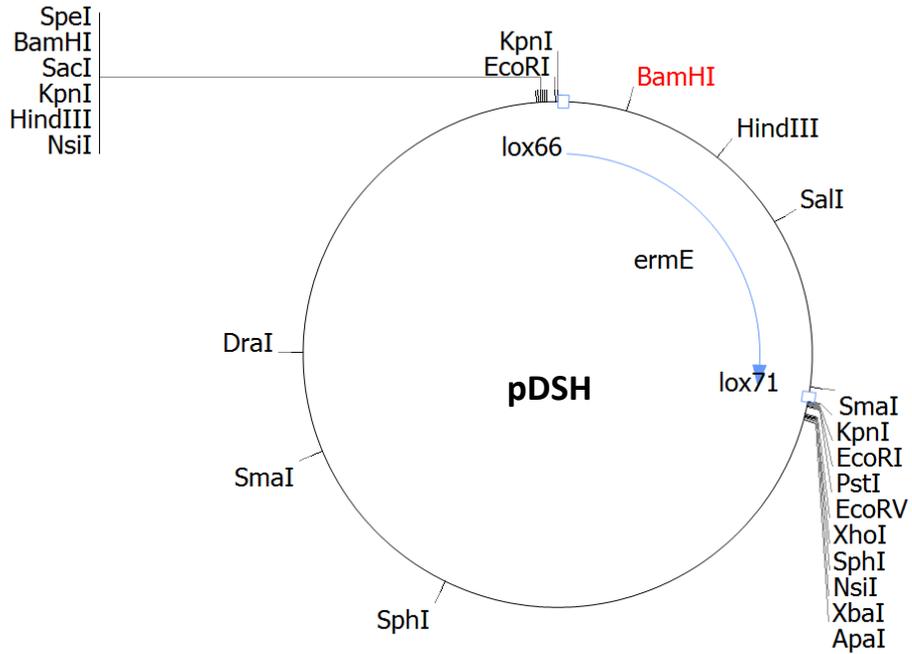


Figura 12: Plásmido pDSH.

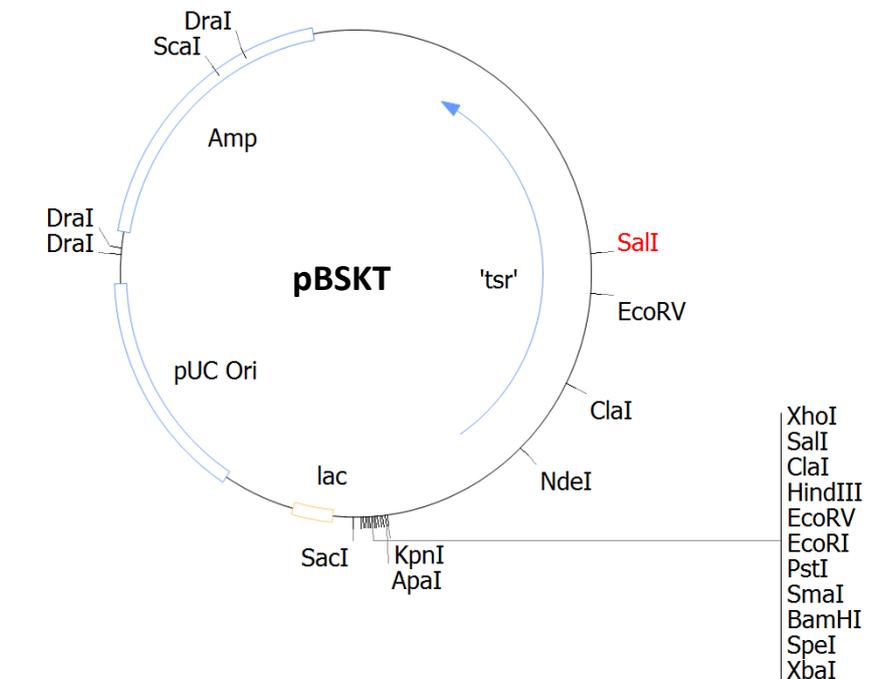


Figura 13: Plásmido pBSKT

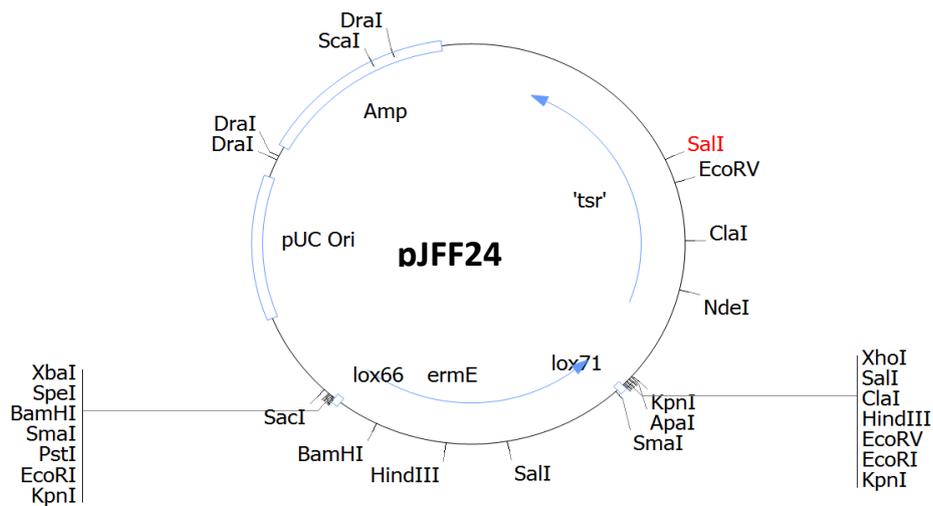


Figura 14: Plásmido pJFF24.

A continuación se extrajo el fragmento *tioH*-left y el promotor de la eritromicina desde el plásmido pJFF23 (Figura 11), digiriéndolo con *EcoRV* y *Ecl136II*; y se clonó en el plásmido pJFF24 (Figura 14) digerido previamente con *ApaI* y utilizando el enzima Klenow para transformar el corte cohesivo de *ApaI* en romo y poder ligarlo con el fragmento romo extraído de pJFF23. De esa ligación surgió pJFF26, un derivado de pBSKT que contiene el gen de la eritromicina, su promotor y el fragmento amplificado de *tioH*-left.

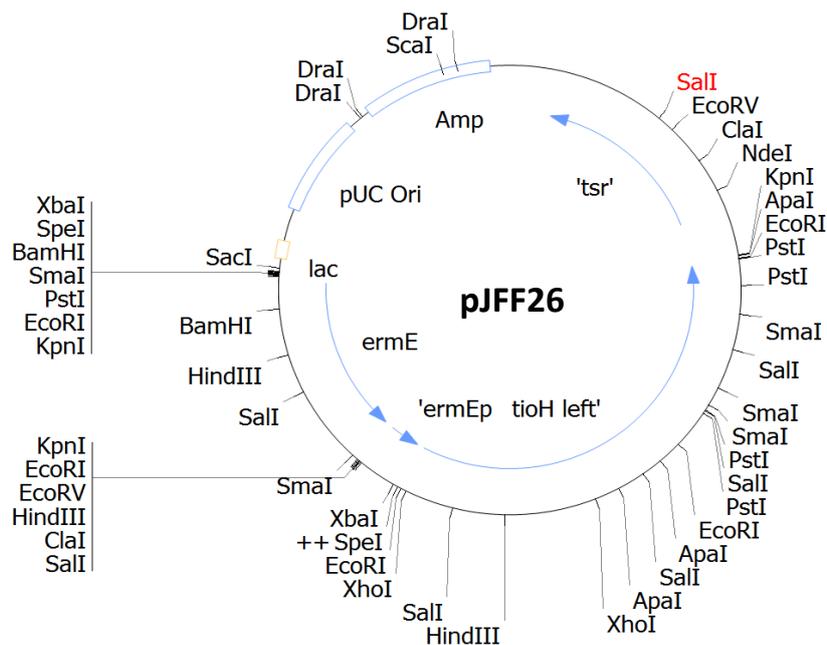


Figura 15: Plásmido pJFF26.

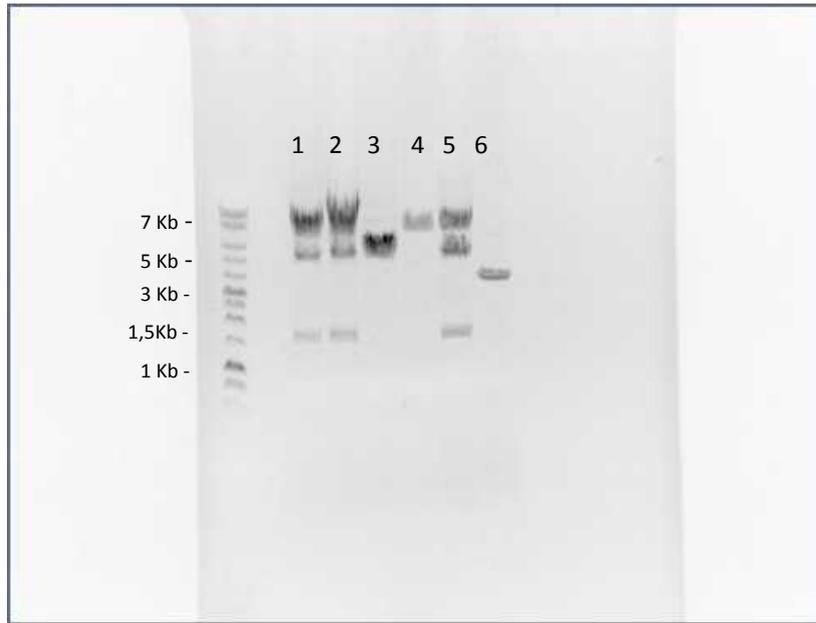


Figura 17: Digestión con EcoRV de los clones pJFF27 en gel de agarosa.

Los clones 1, 2 y 5 muestran un patrón de restricción correcto.

En el gel se puede ver que los clones 1, 2 y 5 tienen el sentido adecuado, por lo que la construcción final es correcta en dichos clones.

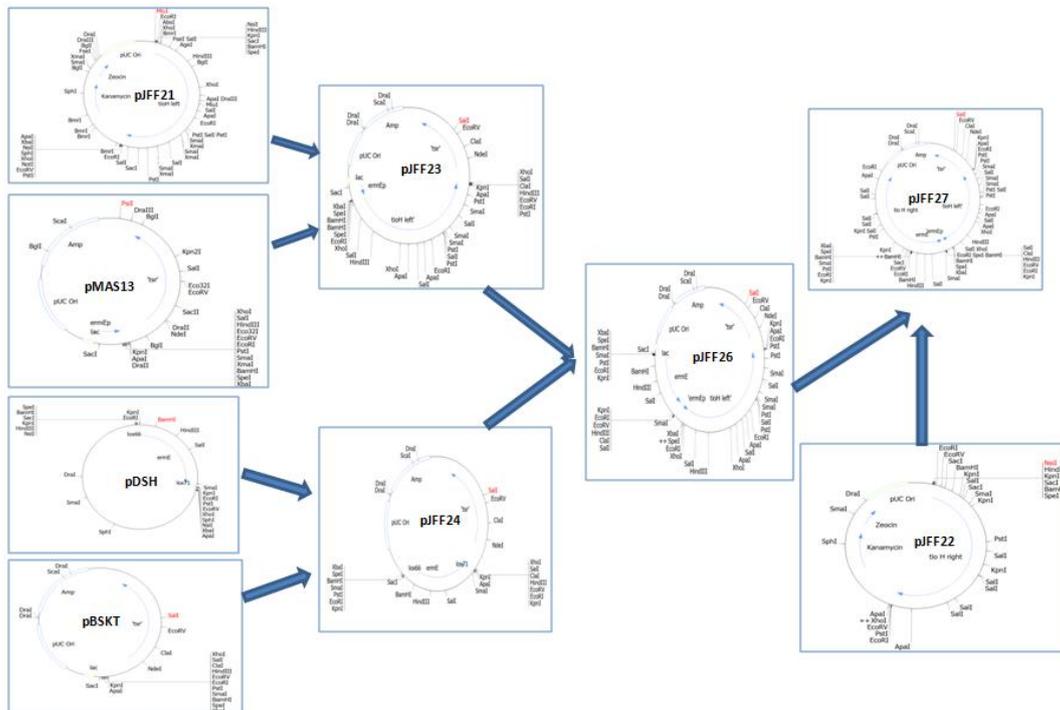


Figura 18: Plan de clonación para realizar la construcción final para el reemplazamiento genético de *tioH*.

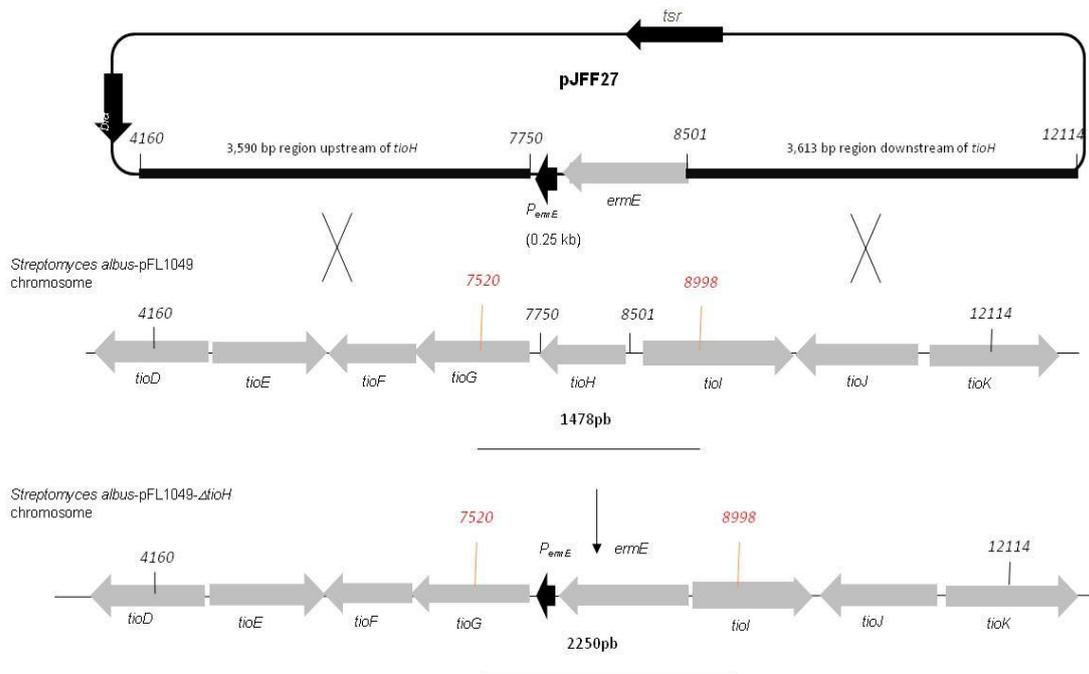


Figura 19: Generación del mutante *tioH* por reemplazamiento génico. Los números en negro indican los fragmentos amplificados de *tioH*-left y *tioH*-right. Los números en rojo corresponden a la amplificación de comprobación del mutante.

5.2. Comprobación del mutante *tioH*.

Los transformantes se cultivaron en placas de medio R5 a las que se les añadió tras 24 horas de incubación a 30° C una solución de agua destilada con eritromicina y apramicina. Las colonias de protoplastos resistentes fueron las seleccionadas como positivas al poseer al menos un sobrecruzamiento a uno de los lados del gen *tioH*. Posteriormente las siete colonias obtenidas fueron crecidas en medio sólido con tioestreptona y eritromicina y apramicina, para distinguir las que habían sufrido un sobrecruzamiento (crecen en los tres antibióticos) de las que habían sufrido dos (crecen sólo en eritromicina más apramicina, y son el mutante correcto). Las dos colonias correctas se incubaron luego en medio Bennet con apramicina y eritromicina hasta su esporulación. Las esporas se recogieron en glicerol al 20% y se han guardado a -20° C.

Con estas esporas se ha realizado un inóculo de 100µl en un matraz de 250 ml con 25 ml de medio TSB suplementado con 5 µg/ml de tioestreptona, 0,75% de glicina y 5 mM de MgCl₂.

El matraz se incubará 96 h a 30° C y 250 rpm, y el micelio producido se someterá a centrifugación (8000 rpm), utilizando el

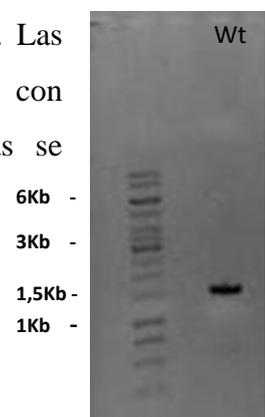


Figura 20: PCR de comprobación de la cepa productora de tiocoralina.

pellet para obtener ADN genómico de la cepa mutante *S. albus*-pFL1049- Δ *tioH* usando el protocolo salting-out (Kieser et al 2000). Este ADN genómico se utilizará para comprobar si estas dos colonias mutantes son correctas, realizando una reacción de PCR con los dos oligonucleótidos seleccionados (apartado 4.7.2 de material y métodos).

Se espera que en esta amplificación la cepa silvestre *S. albus*-pFL1049 genere una banda de 1.478 pb, mientras que el mutante realizado por doble sobrecruzamiento, al tener sustituido el gen *tioH* por el de la eritromicina y su promotor, generaría una banda de 2.250 pb.

En la actualidad sólo se ha podido realizar la PCR para la cepa silvestre productora de tiocoralina.

5.3. Análisis de la producción de tiocoralina por el mutante *S. albus*-pFL1049- Δ *tioH*

Actualmente no se ha podido comprobar la producción de tiocoralina en el mutante realizado, debido a falta de tiempo para terminar su cultivo y extracción.

Para determinar si el mutante *tioH* es capaz de producir tiocoralina, se han inoculado 100 μ l de esporas de cada uno de estos dos clones en un matraz de 250 ml con 25 ml de medio RSA suplementado con eritromicina y apramicina. Se incubarán estos cultivos a 30° C, 250 rpm durante 4 días, y cada cultivo se extraerá con dos volúmenes de acetato de etilo (50 ml) y la fase orgánica se deshidratará y secará en el Speed-Vac.

Sí se ha realizado el mismo proceso con la cepa silvestre *S. albus*-pFL1049, productora de tiocoralina, y su extracto fue analizado mediante HPLC. En la cepa *S. albus*-pFL1049 se apreció claramente un pico de retención de 29,1 min y un espectro de absorción característicos de tiocoralina.

Por el contrario, en *S. albus*-pFL1049- Δ *tioH*, se espera que no aparezca dicho pico o que aparezca un nuevo pico desplazado respecto al patrón normal de la tiocoralina, que indicaría que el nuevo cromóforo con un hidroxilo más respecto al ácido 3-hidroxiquináldico es totalmente viable y forma una molécula similar a tiocoralina, que potencialmente podría tener una actividad diferente a la de tiocoralina.

Streptomyces albus-pFL1049

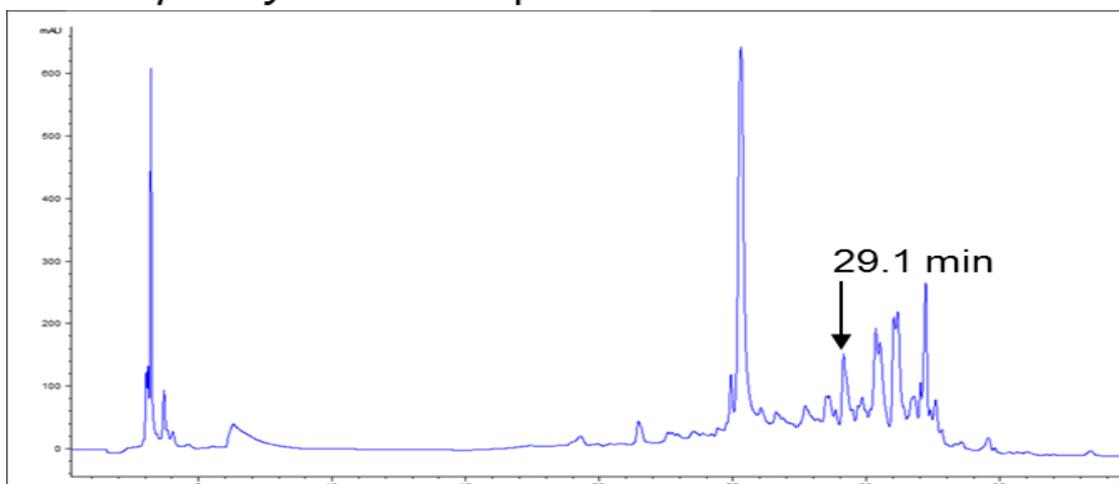


Figura 21: Análisis por HPLC en la cepa silvestre *S. albus*-pFL1049, donde se observa la producción de tiocoralina con un pico cuya retención es de 29,1 minutos.

La secuencia de la enzima traducida a partir del gen *tioH* muestra similitud con muchas NAD⁺ y NADPH⁺ óxidorreductasas. Es la única óxidorreductasa identificada en el agrupamiento génico de la tiocoralina y podría por tanto actuar como una quinaldato-4-óxidorreductasa y eliminar el grupo 4-hidroxilo del ácido kinurénico (3,4-dihidroxi.quinaldato, el producto de *tioG*), y formar así el ácido 3-hidroxi-quináldico. Enzimas con esta función se han purificado y caracterizado en diversas especies del género *Pseudomonas* y *Serratia*.

La transformación de β -hydroxykynurenina en 3HQA ocurriría así tras la ciclación producida por la kinurenina-aminotransferasa (resultado de la acción de *TioG*) y la eliminación final del residuo 4-hidroxilo llevada a cabo por *TioH* (Lombó F., et al 2006).

Finalmente sobre el cromóforo 3HQA se producen el resto de pasos hasta la formación de tiocoralina, mediante la adición secuencial de los aminoácidos correspondientes, tal como se ha descrito en la introducción.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados en este trabajo se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha realizado una sustitución génica en el gen que codifica probablemente una de las últimas etapas de síntesis del cromóforo de tiocoralina, reemplazando el gen *tioH* por un antibiótico de selección, para comprobar su implicación en dicha ruta de biosíntesis.
2. Se ha propuesto a *tioH* como una quinaldato-4-óxidorreductasa ya que elimina el grupo 4-hidroxilo del ácido kinurénico para formar así el ácido 3-hidroxi-quináldico.
3. En trabajos posteriores se comprobará la producción de tiocoralina en las dos colonias posiblemente mutantes conseguidas; se espera que sea una cepa no productora de tiocoralina y que incluso produzca un nuevo compuesto bioactivo.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Amador ML, Jimeno J, et al. (2003). `` Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources.`` Ann Oncol. **14**(11):1607-15

Bérdy J. (2005). `` Bioactive microbial metabolites.`` J Antibiot (Tokyo). **58**(1):1-26.

Bernan VS., Greenstein M., et al. (1997). `` Marine microorganisms as a source of new natural products.`` Adv Appl Microbiol. **43**:57-90

Biswas, T., O. E. Zolova, et al. (2010). ``A new scaffold of an old protein fold ensures binding to bisintercalator thiocoraline.`` J Mol Biol **397** (2): 495-507.

Blunt JW, Copp BR, et al. (2006). `` Marine natural products`` Nat Prod Rep. **23**(1):26-78

Blunt JW, Copp BR, et al. (2007). `` Marine natural products`` Nat Prod Rep. **24**(1):31-86

Dawson, S., J. P. Malkinson, et al. (2007). ``Bisintercalator natural products with potential therapeutic applications: isolation, structure determination, synthetic and biological Studies.`` Nat Prod Rep **24** (1): 109-126.

Denny WA., (2001). `` Prodrug strategies in cancer therapy.`` Eur J Med Chem. **36** (7-8):577-95.

Hirsch P., Mevs U., et al. (2004). `` Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932.`` Syst Appl Microbiol. **27** (2):166-74

Igarashi Y., Trujillo ME., et al. (2007). ``Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov.`` Bioorg Med Chem Lett. **1**;17(13):3702-5

Jongrungruangchok S., Tanasupawat S., et al. (2008). ``*Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand.`` J Gen Appl Microbiol. **54** (2):127-33.

Kasai H., Ezaki T., et al. (2000). ``Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences.`` J Clin Microbiol. **38**(1):301-8

Kibbe WA. (2007). ``OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator.`` Nucleic Acids Res. **35** (Web Server issue):W43-6.

Kieser, T., et al. (2000). ``Practical *Streptomyces* Genetics.`` England: John Innes Centre.

Lazzarini A., Cavaletti L., et al. (2000). ``Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.`` Antonie Van Leeuwenhoek. **78** (3-4):399-405.

Lee SD., Goodfellow M., et al. (1999). ``A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. Nov.`` FEMS Microbiol Lett. **15**;178(2):349-54

Lombo, F., A. Velasco, et al. (2006). ``Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species``. ChemBiochem **7** (2): 366-376.

Mady, A. S., O. E. Zolova, et al. (2011). ``Characterization of TioQ a type II thioesterase from the thiocoraline biosynthetic cluster.`` Mol Biosyst **7** (6): 1999-2011.

Negri, A., E. Marco, et al. (2007). ``Antitumor activity, X-ray cristal structure, and DNA binding properties of thiocoraline A, a natural bisintercalating thiodepsipeptide.`` J Med Chem **50** (14): 3322-3333.

Olano C., Mendez C., et al. (2011). `` Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes`` Microb Biotechnol. **4** (2):144-64

Sambrook, J., Russell, D.W., (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sheoran, A., A. King, et al. (2008). ``Characterization of Tifo, a tryptophan 2,3 dioxygenase involved in 3-hydroxyquinalic acid formation during thiocoraline biosíntesis.`` Mol Biosyst **4** (6): 622-628.

Thawai C., Tanasupawat S., et al. (2007). `` Micromonospora narathiwatensis sp. nov., from Thai peat swamp forest soils.`` J Gen Appl Microbiol. **53** (5):287-93.

Trujillo ME., Fernández-Molinero C., et al. (2005). `` Micromonospora mirobrigensis sp. nov.`` Int J Syst Evol Microbiol. **55**(Pt 2):877-80.

Tse WC, Boger DL. (2004). `` A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity.`` Acc Chem Res. **37** (1):61-9.

Ventura, Canchaya, et al. (2007). `` Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum.`` Microbiol Mol Biol Rev. **71**(3):495-548.

Zhang H., Lee YK., et al. (2006). `` Culturable actinobacteria from the marine sponge Hymeniacidon perleve: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis.`` Antonie Van Leeuwenhoek. **90** (2):159-69.

Zolova, O. E., A. S. Mady, et al. (2010). ``Recent developments in bisintercalator natural products.`` Biopolymers **93** (9): 777-790.