



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”

**“Minería Genómica en Streptomyces sp. Tü6176
para la caracterización de la ruta de biosíntesis del
antitumoral nataxazol”**

TESIS DOCTORAL

**Carolina Cano Prieto
Lunes, 13 de abril de 2015**



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”

**“Minería Genómica en Streptomyces sp. Tü6176
para la caracterización de la ruta de biosíntesis del
antitumoral nataxazol”**

TESIS DOCTORAL

**Carolina Cano Prieto
Lunes, 13 de abril de 2015**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Minería genómica en <i>Streptomyces</i> sp. Tü6176 para la caracterización de la ruta de biosíntesis del antitumoral nataxazol	Inglés: Genome mining in <i>Streptomyces</i> sp. Tü6176 for the characterization of nataxazol biosynthesis pathway.
2.- Autor	
Nombre: CAROLINA CANO PRIETO	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cáncer	
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA	

RESUMEN (en español)

El nataxazol es producido por *Streptomyces* sp. Tü6176, cepa aislada de muestras de suelo obtenidas en Mata da Silva (Brasil) y descrita en 2009 por Sommer y colaboradores. Presenta actividad citotóxica frente a varias líneas celulares tumorales humanas (ej.: AGS). Por el contrario, no presenta actividad antibiótica, antivírica ni antifúngica. El nataxazol es un metabolito secundario perteneciente a la familia de los benzoxazoles presentando en su estructura dos motivos benzoxazol.

El primer objetivo de este trabajo fue la caracterización de la ruta de biosíntesis del nataxazol. Para ello, primero se secuenció en genoma de *Streptomyces* sp Tü6176. La secuenciación del genoma permitió la identificación de 38 potenciales agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios. La semejanza de algunos genes del *cluster* 3 con genes implicados en la biosíntesis del benzoxazol calcimicina permitió identificar dicho *cluster* como el más probable para la biosíntesis de nataxazol. El *cluster* 3 está constituido por 21 genes que codifican para 12 proteínas estructurales, 4 proteínas reguladoras, 4 proteínas posiblemente implicadas en el transporte del compuesto y una proteína hipotética de función desconocida.

La inactivación génica de *natPK* por interrupción génica permitió confirmar al *cluster* 3 como el encargado de la biosíntesis de nataxazol debido al no ser capaz el mutante obtenido de producir nataxazol. Además, permitió identificar un derivado hidroxilado del nataxazol y la presencia de otro benzoxazol, UK-1, que aumenta ligeramente su producción en el mutante. El nataxazol hidroxilado no mejora la actividad biológica del nataxazol. La expresión heteróloga de *natPK* en *S. albus* J1074 confirmó su función como el encargado de sintetizar el primer precursor, ácido 6-metilsalicílico. La inactivación de *natAN* por reemplazamiento génico permitió confirmar su función como uno de los genes implicados en la biosíntesis del segundo precursor, ácido 3-hidroxiantranílico, compuesto derivado del corismato. También, mostró su implicación en la biosíntesis del benzoxazol UK-1. La inactivación de *natAN* permitió el aumento de la producción del sideróforo enterobactina y de su precursor el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, también derivado del corismato. Esto mostró la relación de la ruta de biosíntesis de nataxazol con la ruta de biosíntesis de enterobactina a través de un precursor común. La inactivación de la salicilato sintasa del *cluster* 25 en la cepa Δ *natAN* permitió confirmar la combinación de genes del *cluster* 3 y del *cluster* 25, productor de compuesto semejante al zincóforo coelibactina, para dar lugar al benzoxazol UK-1.

La expresión heteróloga del *cluster* completo confirmó que el *cluster* no producía nataxazol sino el benzoxazol AJI9561, compuesto semejante al nataxazol pero que carece de un grupo metilo en el grupo carboxilo libre. Los ensayos de bioactividad de AJI9561 mostraron su actividad antibiótica por lo que la metilación que da lugar a nataxazol es probablemente un mecanismo de resistencia a AJI9561 en *Streptomyces* sp. Tü6176.

Finalmente, otro de los objetivos de este trabajo fue la mejora de producción de nataxazol. La sobreexpresión de los cuatro reguladores del *cluster* 3, *natR1*, *natR2*, *natR3* y *natR4*, permitió confirmar que *NatR1* y *NatR4* son reguladores positivos capaces de aumentar la producción en 1'3 y 1'7 veces. Por otro lado, la inactivación de *natR3*, codifica para un regulador negativo, permitió un aumento de la producción de nataxazol en 2'3 veces.



RESUMEN (en Inglés)

Nataxazole is produced by *Streptomyces* sp. Tü 6176 that was isolated from soil samples collected in Mata da Silva (Brasil) and described by Sommer *et al.* in 2009. It has cytotoxic activity against different tumour cell lines as AGS, however, it does not have antibiotic, antiviral and antifungal activity. Nataxazole is a secondary metabolite belonging to the benzoxazole family and present two benzoxazole motifs.

The first important aim in this work was the characterization of nataxazole biosynthesis pathway. To achieve this goal, we sequenced the genome of *Streptomyces* sp. Tü 6176. The genome sequence analysis allowed the identification of 38 putative secondary metabolites biosynthesis gene clusters. The similarity of some genes of cluster 3 with genes involved in the calcimycin biosynthesis pathway allowed identifying cluster 3 as the most probable for nataxazole biosynthesis. Cluster 3 is composed of 21 genes that codify for 12 structural proteins, 4 regulator proteins, 4 transporter proteins and an unknown protein.

The inactivation of *natPK* by gene disruption confirmed cluster 3 as the nataxazole biosynthesis gene cluster since the mutant strain was unable to produced nataxazole. Also this mutant allowed identifying novel benzoxazole 5-hydroxynataxazole which does not have biological activity, and another benzoxazole, UK-1, which slightly increases its production in this mutant. The heterologous expression of *natPK* in *S. albus* J1074 demonstrated that NatPK produced the first nataxazole precursor 6-MSA. The inactivation of *natAN* by gene replacement confirmed its function in the biosynthesis of second nataxazole precursor 3-hydroxyanthranilic acid, derived from chorismate. This experiment also demonstrated that *natAN* is involved in UK-1 biosynthesis and showed the increment of siderophore enterobactin production and its precursor 2,3-dihydroxybenzoic acid that is also a derivative chorismate. In addition, this experiment showed the crosstalk between nataxazole biosynthesis cluster and enterobactin biosynthesis cluster through common precursor chorismate. The inactivation of the salicylate synthase of cluster 25 in mutant Δ natAN demonstrated that this gene is involved in UK-1 biosynthesis. Expression of the salicylate synthase gene in *S. albus* J1074 demonstrated that it produces salicylic acid.

The heterologous expression of nataxazole biosynthesis gene cluster showed that this cluster produces the AJI9561 which is a nataxazole intermediary. Biological activity experiments demonstrated that AJI9561 has antibiotic activity and the methylation for producing nataxazole is a plausible resistance mechanism.

Finally, the last aim was the increment production of nataxazole. The overexpression of the four regulator genes of cluster 3, *natR1*, *natR2*, *natR3* and *natR4*, allowed confirming that NatR1 and NatR4 are positive regulatory proteins able to increase nataxazole production 1'3- and 1'7-fold, respectively. On other hand, the inactivation of *natR3*, codifying a negative regulatory protein, allowed an increment of nataxazole production 2'3-fold.

Escribir los agradecimientos seguramente sea una de las partes más complicadas de toda la tesis pues a lo largo de estos cuatro años ha habido muchas personas a mi lado apoyándome. Espero no olvidarme de nadie pero, por si acaso, Muchas Gracias a todos por todo.

Primero, tengo que darle las gracias al Prof. José Antonio Salas por darme la oportunidad de poder realizar esta tesis y permitirme formar parte de este gran grupo. A la Prof. Carmen Méndez por el apoyo y los consejos durante todo este tiempo. Para poder dar las gracias de forma adecuada al Dr. Carlos Olano necesitaría adquirir el don de la palabra pues no poseo las palabras que muestren convenientemente mi sincero agradecimiento por sus enseñanzas, su paciencia, sus consejos y por todo su apoyo: Muchas gracias.

Durante este tiempo he tenido la oportunidad de trabajar con muchos compañeros y poder aprender de cada uno de ellos. A todos los que cambiasteis de rumbo: Muchas gracias, fue un placer colaborar con todos vosotros y aprender algo nuevo de cada uno. Especialmente, tengo que agradecerle a la Dra. Cristina Gómez y a la Dra. Natalia M. Vior con quienes he compartido muchas horas de laboratorio y de quienes me guardo y guardaré siempre un cariño especial y a Patricia Oro por todo el cariño y el apoyo que me ha regalado durante todo este tiempo.

A los que continuáis remando en el barco pocas palabras puedo deciros que ya no os haya dicho. A mis coleguillas del Lab17, Leire, Arantxa, Adriana, Susana y Javi: Muchas Gracias por todos y cada uno de esos momentos divertidos llenos de risas. A mi "compis" de "labo"; Raúl: Gracias por todos los consejos, por esas conversaciones transcendentales en las interminables tardes y fin de semanas en el laboratorio que fueron siempre una gran ayuda. Armando, mi pequeño gran discípulo: espero que tengas mucha suerte en esta última etapa que te espera. Jorge: Espero que en este viaje que es hacer la tesis lo disfrutes y consigas grandes cosas. Mónica: Aunque nuestro tiempo de colaboración fue corto, fue magnífico. Creo haber encontrado a una amiga y ten de seguro que es lo que tú has encontrado en mí. Finalmente, a mi compañera de crucero, Suhui: Gracias

por estar ahí en los buenos y los malos momentos que han ido surgiendo. Gracias por tu amistad y por todos los momentos que hemos compartido. Muchas Gracias.

El llegar hasta aquí no hubiera sido posible sin mi extensa e incombustible familia. A mis tíos, tías y primos que habéis estado preocupándoos, animándome y apoyándome todos y cada uno de los años de mi vida solo deciros: GRACIAS. A mis abuelos Pedro y Salvador, que aunque os marchasteis en el transcurso de estos cuatro años, solo puedo deciros: Gracias por todos esos momentos que pase con vosotros y por vuestra interminable confianza en mí. A mi abuela María, aunque sé que el Alzheimer no te lo permite recordar: Gracias por imprimir tu sello y tu carácter en cada uno de nosotros y, sobretodo, en mí.

Para poder darles las gracias a mis padres y a mi hermana necesitaría reescribir El Quijote con sólo palabras de agradecimiento y de cariño pues sin ellos de seguro que no habría podido lograrlo, me hubiera perdido mucho antes: Gracias por enseñarme a dar cada paso, por estar a mi lado y por no dejar nunca que me rindiera.

No me puedo olvidar de mis amigos, pues sin ellos, cada centímetro recorrido hubiera sido tortuoso. A mi amiga Diana: Gracias por todo ese cariño que me has hecho llegar siempre y por escucharme durante largas horas. A mis tres "Analistas" que desde Panamá, Guatemala y París nunca habéis permitido que me sintiera sola y me habéis enviado vuestra fuerza y vuestra alegría de todas las formas posibles. Y, finalmente, a los cuatro de siempre: Gracias por eso, por ser los de siempre aunque la vida nos haya hecho vivir en puntos muy distantes y muy lejos de nuestra isla.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Abreviaturas	7
1. Introducción	9
1.1 El cáncer y su desarrollo	11
1.2 Diagnóstico	13
1.3 Tratamiento: Quimioterapia antitumoral	15
1.4 Actinomicetos	16
1.5 Identificación y caracterización de nuevos compuestos bioactivos: Metodología clásica <i>versus</i> Minería genómica	19
1.5.1 Actividades enzimáticas: PKSs y NRPSs	21
1.5.2 Minería genómica	22
1.6 Compuestos antitumorales: Los benzoxazoles	23
1.6.1 Benzoxazoles de origen natural	24
1.6.1.1 A33853	25
1.6.1.2 UK-1	26
1.6.1.2.1 DNA topoisomerasas tipo II	28
1.6.1.3 Calcimicina	29
1.6.1.4 AJI9561	31
1.6.1.5 Caboxamicina	31
1.6.1.6 Nataxazol	32
1.7 Objetivos	34
2. Material y Métodos	35
2.1 Microorganismos	37
2.2 Métodos microbiológicos	38
2.2.1 Medios de cultivo	38
2.2.1.1 Medios de cultivo para el crecimiento de <i>E.coli</i> y levaduras	38

2.2.1.2 Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Streptomyces</i> spp.	39
2.2.2 Condiciones de cultivo	41
2.2.3 Condiciones de conservación	42
2.3 Antibióticos	43
2.4 Enzimas	43
2.5 Vectores	44
2.6 Aislamiento de ADN	45
2.6.1 Minipreparaciones de ADN plásmidico en <i>E. coli</i>	45
2.6.2 Obtención de ADN plasmídico para secuenciación	45
2.6.3 Obtención de ADN cromosómico de <i>Streptomyces</i> spp.	46
2.7 Manipulación <i>in vitro</i> del ADN	47
2.7.1 Digestión enzimática	47
2.7.2 Generación de extremos romos	47
2.7.3 Desfosforilación de extremos 5' del ADN	47
2.7.4 Ligación de los fragmentos de ADN	48
2.8 Análisis de ADN	48
2.8.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	48
2.8.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	49
2.9 Transformación con ADN plasmídico	49
2.9.1 Preparación de competentes de <i>E. coli</i> y su transformación	49
2.9.2 Preparación de electrocompetentes de <i>E. coli</i> y su electroporación	49
2.10 Obtención de una genoteca de <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	50
2.11 Conjugación de <i>Streptomyces</i> spp.	52
2.11.1 Conjugación de micelio de <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	52
2.11.2 Conjugación de esporas de <i>S. albus</i> J1074	53
2.12 Transformación de protoplastos de <i>S. albus</i> J1074 y otros <i>Streptomyces</i> spp.	53

2.13 Técnicas de hibridación de ADN	54
2.13.1 Hibridación <i>in situ</i> de colonia	54
2.13.2 Southern blot	56
2.14 Amplificación de ADN por PCR	57
2.14.1 Oligonucleótidos cebadores	57
2.14.2 Condiciones de la reacción	61
2.14.3 Condiciones de programa de amplificación	61
2.15 Secuenciación de ADN	62
2.15.1 Secuenciación y análisis del genoma de <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	62
2.15.2 Secuenciación y análisis de las diferentes construcciones y de los cósmidos de la genoteca	63
2.16 Obtención de mutantes	63
2.16.1 Generación de mutantes por interrupción génica	63
2.16.1.1 Construcción de plásmidos para la interrupción génica	65
2.16.2 Generación de mutantes por reemplazamiento génico	67
2.16.2.1 Construcción de plásmidos para el reemplazamiento génico	70
2.17 Expresión de genes	73
2.17.1 Construcción de los vectores pSETec y pSETeTc	73
2.17.2 Construcción de plásmidos para la expresión de los diferentes genes	74
2.17.2.1 Construcción de plásmidos para la expresión de genes pertenecientes al <i>cluster</i> de nataxazol	75
2.17.2.2 Construcción de plásmidos para la sobreexpresión de genes reguladores de la ruta de nataxazol	78
2.17.2.3 Construcción de plásmidos para la sobreexpresión de genes no pertenecientes al <i>cluster</i> de nataxazol	81
2.17.3 Construcción de plásmidos para la expresión del agrupamiento génico completo de nataxazol	83
2.17.3.1 Construcción de los plásmidos pNATAR y pNATAR Δ AM	84

2.18 Complementación de mutantes	86
2.19 Análisis de compuestos	87
2.19.1 Producción y extracción de nataxazol y otros benzoxazoles	87
2.19.2 Comparación de la producción entre distintas cepas	87
2.19.2.1 Cuantificación del crecimiento por peso seco	88
2.19.3 Análisis por UPLC	88
2.19.4 Análisis por HPLC-MS	89
2.19.5 Purificación de compuestos	89
2.19.6 Caracterización estructural de compuestos	91
2.20 Bioconversiones	92
2.21 Análisis de la actividad biológica	92
2.21.1 Análisis de la actividad antibiótica	92
2.21.2 Análisis de la actividad citotóxica	93
3. Resultados	95
3.1 Análisis bioinformático del genoma de <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	97
3.1.1 Potenciales agrupamientos génicos de biosíntesis de metabolitos secundarios	97
3.1.2 Análisis de la secuencia para la localización del potencial <i>cluster</i> de biosíntesis de nataxazol	100
3.2 Caracterización de <i>cf54_07385</i>	102
3.2.1 Expresión heteróloga de <i>natPK</i> en <i>S. albus</i> J1074	105
3.2.2 Complementación del mutante Δ natPK	107
3.2.3 Caracterización estructural y bioactividad del compuesto 2	108
3.3 Aislamiento del agrupamiento génico responsable de la biosíntesis de nataxazol	110
3.3.1 Construcción de una genoteca a partir de ADN cromosómico	110
3.3.2 Análisis de la genoteca	110

3.4 <i>Cluster</i> 3: Agrupamiento génico implicado en la ruta de biosíntesis de nataxazol	113
3.5 Caracterización del compuesto 3	125
3.5.1 Mejora de la producción del compuesto 3	126
3.5.1.1 Mejora de la producción por adición de posibles precursores	126
3.5.1.2 Mejora de la producción del compuesto 3 por activación del <i>cluster</i> 25	128
3.5.2 Caracterización estructural del compuesto 3	133
3.5.3 Expresión heteróloga de la salicilato sintasa CF54_20720	134
3.6 Caracterización de <i>natAN</i> implicado en la biosíntesis del ácido 3-hidroxiantranílico	135
3.6.1 Complementación química del mutante Δ natAN	139
3.6.2 Caracterización de los compuestos 11, 12 y 13	140
3.6.3 Caracterización de la salicilato sintasa CF54_20720 implicada en la biosíntesis de UK-1	145
3.7 Implicación de <i>natAM</i> y <i>natL1</i> en la biosíntesis de nataxazol	149
3.7.1 Complementación del mutante Δ natAM-L1	151
3.8 Mejora de la producción de nataxazol usando genes reguladores específicos de ruta	154
3.8.1 Sobreexpresión de los reguladores en <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	154
3.8.2 Inactivación de <i>natR3</i> y <i>natR4</i>	159
3.8.3 Producción de AJI9561 por <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	162
3.9 Caracterización de <i>natX</i>	163
3.10 Expresión heteróloga del <i>cluster</i> de biosíntesis del nataxazol	165
3.10.1 Expresión secuencial del <i>cluster</i>	165
3.10.2 Expresión heteróloga del <i>cluster</i> completo	167
3.10.3 Expresión heteróloga de la ruta a través del plásmido integrativo pNATAR	169
3.10.4 Actividad antibiótica de AJI9561	172

3.11 Nataxazol y nataxazol hidroxilado	173
3.11.1 Expresión heterologa de <i>cf54_20690</i>	175
3.11.2 Sobreexpresión de <i>cf54_20695</i>	177
3.11.3 Sobreexpresión de <i>cf54_20685</i>	179
4. Discusión	181
5. Conclusiones	195
6. Bibliografía	199
7. Anexo I	213
8. Anexo II	

- 2,3-DHB:** Ácido 2, 3-dihidroxibenzoico
- 3-HAA:** Ácido 3-hidroxiantranílico
- 6-MSA:** Ácido 6-metisalicílico
- A:** dominio de adenilación
- C:** dominio de condensación
- PCP:** “Peptidyl Carrier protein”
- aa:** amino ácido
- ACP:** “Acyl Carrier Protein”
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AMP:** adenosina 5’-monofosfato
- Am^R:** resistencia a apramicina
- ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia
- AT:** dominio aciltransferasa
- ATP:** adenosina 5’-trifosfato
- bla:** gen de la β-lactamasa
- bp:** pares de bases
- CIP:** fosfatasa alcalina de intestino de ternera
- Cm^R:** resistencia a cloranfenicol
- CoA:** coenzima A
- cos:** cósmido
- DH:** dominio dehidratasa
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- ermE**p*:** promotor del gen de resistencia a eritromicina
- ermE:** gen de resistencia a eritromicina
- et al.:** “y otros”
- fw:** cebador directo
- HPLC-MS:** cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
- HTH:** Hélice-Giro-Hélice
- kb:** kilobases
- Km^R:** gen de resistencia a kanamicina
- KR:** dominio cetorreductasa
- KS:** dominio cetosintasa
- m/z:** relación masa/carga
- M:** molar
- MD:** medio definido
- min:** minutos
- mM:** milimolar
- MOPS:** ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico
- NCBI:** National Center for Biotechnology Institute
- NRPS:** sintetasa de péptidos no ribosomales
- OD:** densidad óptica
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- orf:** Pauta abierta de lectura
- ori:** origen de replicación
- oriT:** origen de transferencia
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PKS:** policétido sintasa
- RMN:** resonancia magnética nuclear
- ARNasa:** ribonucleasa
- rpm:** revoluciones por minuto
- rv:** cebador reverso
- S.:** *Streptomyces*
- SA:** Ácido salicílico
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- sp.:** especie
- spp.:** especies
- TAE:** tris-acetato sódico-EDTA
- TE buffer:** Tris-HCl-EDTA *buffer*
- TFA:** ácido trifluoroacético
- TH:** dominio tioester hidratasa
- TRIS:** tris-2-amino-2(hidroximetil)-1,3-
- TSB:** caldo de triptona soja
- tsr:** gen de resistencia a tioestreptona
- U:** unidad enzimática
- UPLC:** Cromatografía líquida
- UV:** ultravioleta
- WT:** cepa silvestre
- μM:** micromolar

INTRODUCCIÓN

El término cáncer se acuñó por primera vez en la antigua Grecia refiriéndose a él como *καρκινοζ* (karkinos), o traducido literalmente, cangrejo. Los médicos griegos denominaron así a la enfermedad debido a la apariencia de cangrejo que mostraban las venas que rodeaban a los órganos afectados por tumores, tal y como relata Ricardo Soca en su libro “*La fascinante historia de las palabras*” (Soca, 2012).

La realidad del cáncer es que es una enfermedad que afecta a los seres humanos desde la antigüedad hasta nuestros días. Es tal su incidencia en la población mundial que los últimos datos publicados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) nos muestran que en el año 2012 se llegaron a diagnosticar 14’1 millones de nuevos casos y murieron alrededor de 8’2 millones de personas de cáncer. Por lo que dicha organización estima que, hoy en día, conviven con la enfermedad alrededor de 32’6 millones de personas que han sido diagnosticadas (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Por ello, la propia OMS ha introducido al cáncer en su programa “Plan de Acción Global para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2030” con el objetivo de reducir las muertes prematuras por cáncer en un 25%.

1.1 El cáncer y su desarrollo

En las personas sanas, al igual que en el resto de organismos pluricelulares, la proliferación de las células que conforman sus tejidos y órganos se encuentran reguladas por dos procesos principalmente, el **ciclo celular** y la **apoptosis**. Mientras que en personas afectadas por algún tipo de neoplasia las células tumorales han perdido los sistemas de regulación por lo que dichas células proliferan incontroladamente y son inmortales (Lewin, 2004; Murray *et al.*, 2010).

El **ciclo celular** de una célula se encuentra dividido en cuatro fases (Fig. 1): **fase G1**, donde se produce la síntesis de proteínas y ARN preparando a la célula para la síntesis de ADN; **fase S**, en la que se produce la replicación del ADN comenzando por la formación de muescas producidas por la ADN topoisomerasa tipo II que permite el

desenrollado del ADN y la unión de la ADN polimerasa; **fase G₂**, en la cual la célula se prepara para entrar en la mitosis, y **fase M** o mitosis, donde las cromátidas hermanas se separan para dar lugar a dos células iguales. En condiciones normales tanto en la fase G₁ como en la fase G₂ hay puntos de control mediados por quinasas (CDK) (Lewin, 2004; Murray *et al.*, 2010).

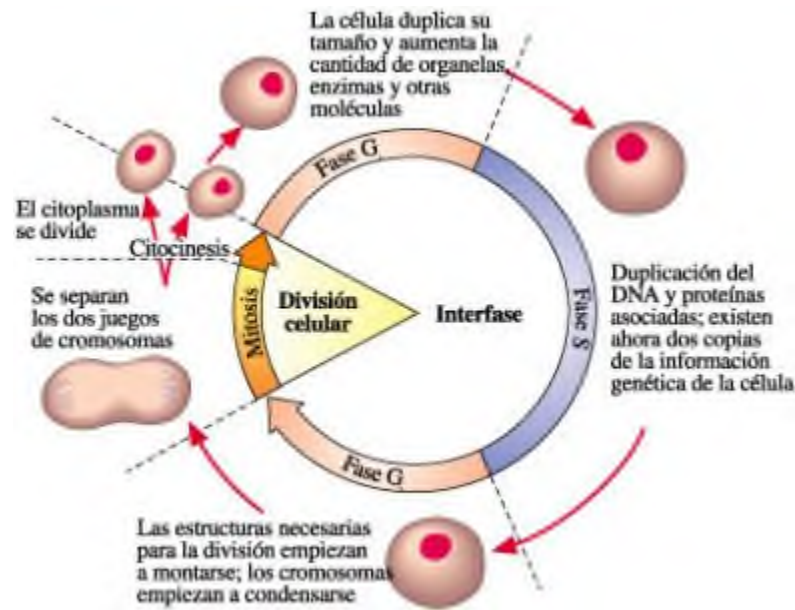


Figura 1. Ciclo celular

(http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_celular02.jpg)

La **apoptosis** o muerte celular programada es otro de los sistemas de control celular. En él se eliminan aquellas células que son defectuosas o se encuentran dañadas siendo este proceso mediado por caspasas. Ambos procesos en los tejidos sanos se encuentran coordinados entre sí para mantener el número de células del tejido u órgano. Sin embargo, las células tumorales han sufrido mutaciones puntuales que les han otorgado la capacidad de eludir estos controles convirtiéndose en células inmortales y con una alta proliferación (Lewin, 2004; Murray *et al.*, 2010).

Para la aparición de la primera célula tumoral debe producirse una serie de mutaciones puntuales que den lugar a una célula capaz de saltarse los citados mecanismos de control. Eso puede darse por factores genéticos y/o ambientales. Esta primera célula tumoral comienza a dividirse incontroladamente formando agregados de

células tumorales (Fig. 2). Estas células cancerosas se caracterizan por una serie de cambios fenotípicos: pierden la morfología de las células del tejido que las rodean, presentan una tasa metabólica elevada y adquieren, eventualmente, la capacidad de diseminarse por el organismo a través de los vasos sanguíneos, proceso denominado metástasis (Griffiths *et al.*, 2002; Lewin, 2004; Murray *et al.*, 2010).

Mecanismos de progresión tumoral.

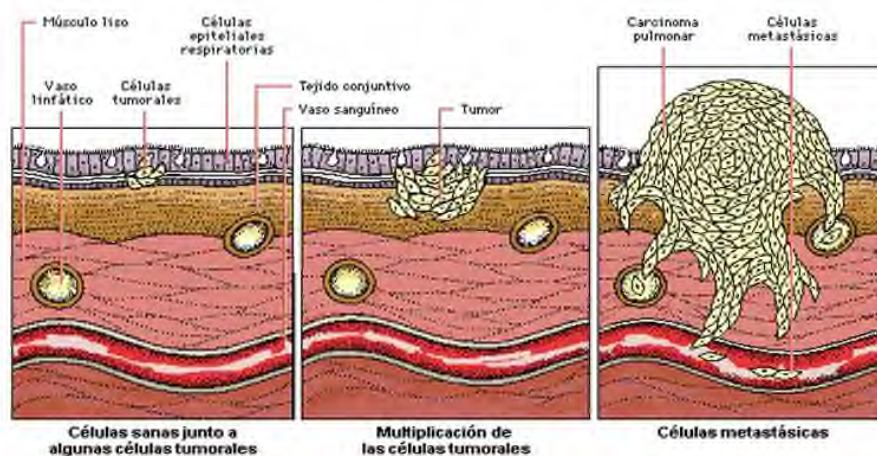


Figura 2. Proceso de formación de un tumor.
(http://www.monografias.com/trabajos65/cancer/cancer_image004.jpg)

1.2 Diagnóstico

En el cáncer, al igual que en otras enfermedades, para aumentar las probabilidades de éxito del tratamiento, el diagnóstico ha de ser precoz. En las primeras fases de la formación del cáncer, los pacientes son asintomáticos (OMS) o en algunos casos, aparecen síntomas comunes con otras enfermedades, como puede ser el caso de la fatiga que aparece en la gripe y en personas que sufren depresión (Akechi *et al.*, 1999; AECC). El historial clínico junto con los antecedentes familiares puede ayudar al facultativo para dirigir las pruebas diagnósticas más adecuadas.

Las pruebas de diagnóstico que se utilizan para la diagnosis del cáncer se pueden clasificar en tres grupos:

- a. **Pruebas analíticas**
- b. **Pruebas de imagen**
- c. **Estudio de tejidos**

Las **pruebas analíticas** son las pruebas de laboratorio donde se analizan los diferentes líquidos o exudados corporales (sangre, orina, heces, exudado nasofaríngeo, etc.). La más habitual es el análisis de sangre. En el hemograma durante el recuento celular se pueden observar leucopenia (descenso de leucocitos) que es sintomática en muchas neoplasias o la aparición de linfoblastos (precursores de los linfocitos) lo cual puede indicar la existencia de una leucemia linfocítica aguda. En el suero sanguíneo, también se encuentran marcadores tumorales como la alfafetoproteína (AFP) la cual es marcador del cáncer hepático. Los niveles de los marcadores tumorales se determinan a partir de muestras serológicas tanto en sangre como en orina u otros líquidos corporales (cefalorraquídeo, pleural, etc.) (American Cancer Society).

Las **pruebas de imagen** las podemos clasificar en dos grupos principales: las invasivas y las no invasivas (son la mayoría). Dentro de las no invasivas encontramos la radiografía, tomografía, resonancia magnética, la gammagrafía (se administra un radiofármaco al paciente y a través de detectores de imagen denominados gammacámaras detectan la imagen de los órganos o tejidos a los que se ha unido el radiofármaco) y ecografía. En las técnicas invasivas se encuentra principalmente la endoscopia, siendo una de las más conocidas la colonoscopia.

Los **estudios de tejidos** son técnicas invasivas por lo que su uso se realiza tras haber realizado las pruebas analíticas y las de imagen y así poder obtener un diagnóstico de certeza. Dentro de éstas pruebas la más habitual es la biopsia la cual se basa en la toma de trozo del tejido tumoral para realizar luego un análisis citológico (AECC).

Después de la localización y el diagnóstico del tumor comienza la fase del tratamiento.

1.3 Tratamiento: Quimioterapia antitumoral

En la actualidad el tratamiento frente al cáncer se aborda desde cuatro frentes de forma individual o combinada: la **cirugía** (extirpación del tumor), la **radioterapia** (utilización de compuestos radiactivos frente a las células cancerosas), **inmunoterapia** (utilización de anticuerpos monoclonales frente a dianas propias de las células antitumorales) y **quimioterapia antitumoral** (uso de compuestos con actividad citotóxica o citoestática).

Los compuestos quimioterápicos se llevan utilizando desde la antigüedad. Discorides (40-90 d. C.) recopiló una lista de hierbas y plantas que se usaban para el tratamiento frente a carcinomas (Papac, 2001). Sin embargo, la identificación de un compuesto como citotóxico se realizó en la Segunda Guerra Mundial cuando la utilización del gas mostaza como arma química permitió ver que los soldados expuestos presentaban un menor número de leucocitos. Más tarde se comenzó a usar frente a linfomas (DeVita, 1978). A partir de este momento, la identificación y caracterización de compuestos con actividad antitumoral incrementó significativamente (Awada *et al.*, 2004).

Los fármacos quimioterápicos existentes en la actualidad se pueden dividir en tres categorías principalmente:

- a. Fármacos citotóxicos, que a su vez se pueden subdividir en cuatro grupos:
 - *Compuestos alquilantes y derivados*. Actúan formando enlaces covalentes con el ADN e impiden su replicación.
 - *Antimetabolitos*. Interrumpen o bloquean una o varias vías metabólicas de síntesis de ADN.
 - *Derivados de plantas*. Compuestos extraídos de las plantas (alcaloides, taxanos, camptotecinas, etc.). La mayoría afectan a la formación del huso mitótico.

- **Antibióticos citotóxicos.** Compuestos de origen bacteriano que impiden la división de células de mamíferos.
- b. Hormonas, usadas frente a tumores derivados de tejidos sensibles a ellas.
- c. Otros fármacos: no encajan dentro de ninguna de las otras dos categorías.

En este grupo se encuentran los nuevos compuestos que atacan dianas específicas relacionadas con el tumor (Rang *et al.*, 2008).

Gracias a esta gran variedad de compuestos y a la combinación con los otros tratamientos anteriormente citados ha habido un gran avance en el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, los efectos secundarios derivados de la quimioterapia debidos a que estos compuestos, en muchas ocasiones éstos no actúan frente a dianas específicas de las células tumorales y pueden atacar también a células normales, junto a la aparición de resistencias de las células a estos fármacos, llevan a la búsqueda de nuevos compuestos quimioterápicos (Sporn, 1996; Balis, 2002; Rang *et al.*, 2008). Sin embargo, pocas nuevas estructuras químicas han sido descubiertas en los últimos años (Bérdy, 2012).

1.4 Actinomicetos

Los compuestos empleados en la quimioterapia referidos en el apartado anterior se pueden dividir en dos tipos: compuestos de síntesis química y compuestos de origen natural. Los compuestos de origen natural son aquellos producidos por organismos como plantas, bacterias, hongos, etc. Dentro de estos organismos capaces de producir compuestos con actividad antitumoral se encuentran las bacterias del grupo actinomicetos (Olano *et al.*, 2009a y 2009b). Estas bacterias, pertenecientes al filo *Actinobacteria*, se caracterizan por ser Gram positivas y tener un alto contenido en guanina y citosina (G+C) que pueden superar el 70% en algunos casos como el género *Streptomyces* (Ventura *et al.*, 2007).

Los actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas que forma hifas multinucleadas parecidas a la de los hongos. Tienen un ciclo de vida complejo (Fig. 3)

cuya primera etapa comienza con la germinación de una espора dando lugar al micelio substrato. Cuando los nutrientes del medio descienden se inicia la formación del micelio aéreo y se activa el metabolismo secundario. En la zona apical de las hifas que conforman el micelio aéreo la pared comienza a engrosar y las hifas se tabican dando lugar a cadenas de esporas. Finalmente, las esporas se dispersan y, cuando las condiciones ambientales son favorables, germinan volviendo a dar comienzo al ciclo. (Sambrook *et al.*, 1989; Ventura *et al.*, 2007).

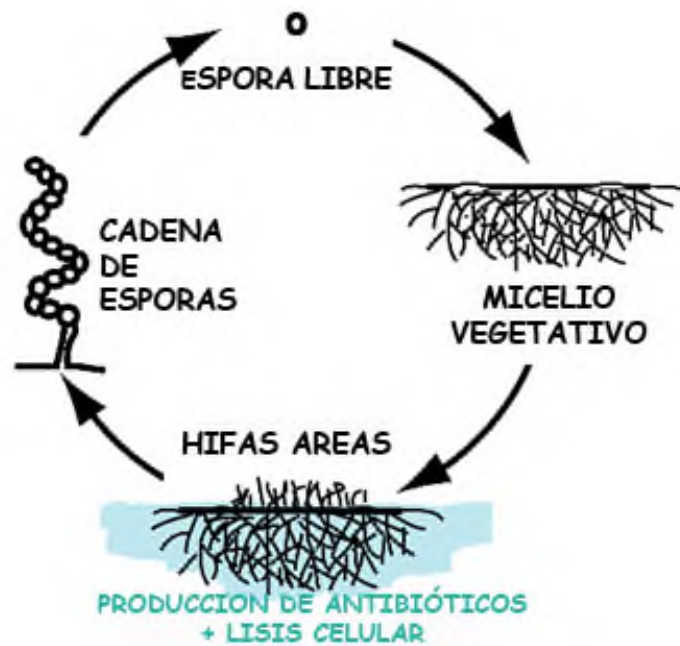


Figura 3. Ciclo de vida de los actinomicetos.

Este grupo de organismos se encuentra ampliamente distribuido tanto en ecosistemas terrestres como en ecosistemas acuáticos. Son importantes para los suelos donde se encargan de la biodegradación y la formación del humus, la descomposición y reciclaje de los polímeros de plantas, animales y hongos muertos a través de la secreción de enzimas extracelulares (Olano *et al.*, 2011). Además producen una gran variedad de metabolitos secundarios. Algunos de estos metabolitos secundarios presentan un interés biotecnológico debido a sus actividades antibiótica, antifúngica, antitumoral, inmunosupresora, neuroprotectora, etc. Es tal su importancia que los actinomicetos producen el 45% de los metabolitos secundarios bioactivos que se han

descubierto en microorganismos. Dentro de este orden, el mayor productor de metabolitos secundarios bioactivos es el género *Streptomyces* que produce hasta un 76% (Bérdy, 2005). Metabolitos secundarios obtenidos de diversos *Streptomyces* spp. con actividad antitumoral se están utilizando hoy en día como quimioterapéuticos en la lucha contra el cáncer: daunomicina y derivados, doxorubicina, mitramicina, bleomicinas A₂ y B₂, entre otros (Cragg *et al.*, 1999) (Fig. 4).

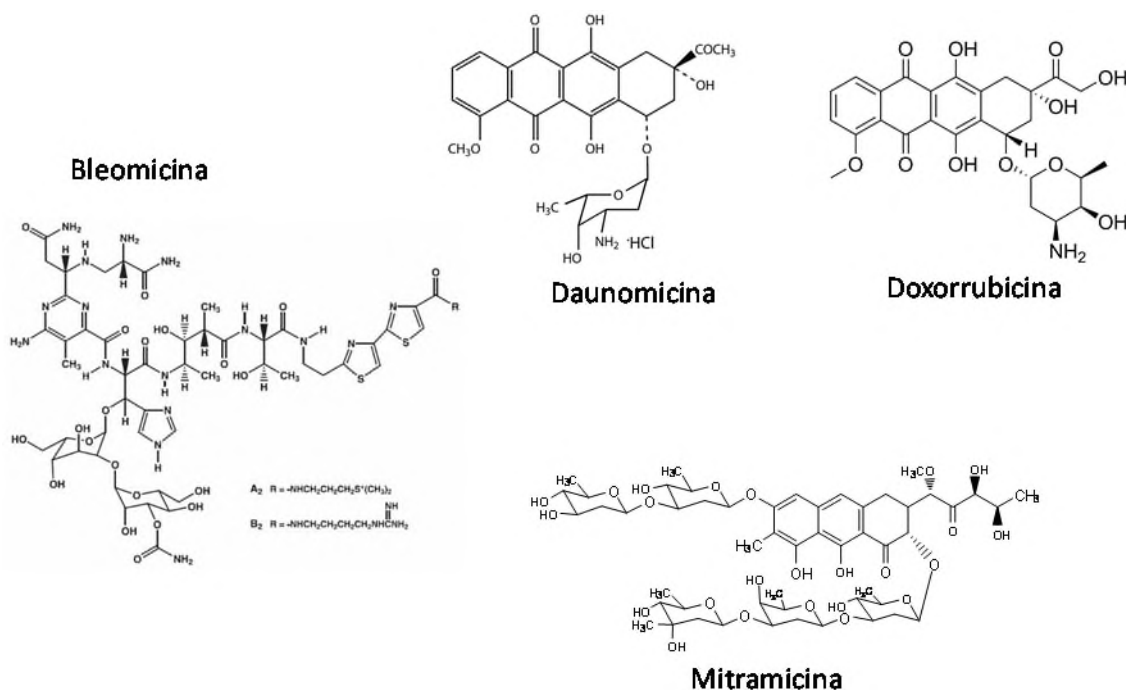


Figura 4. Distintos compuestos de uso farmacológico y origen natural producidos por *Streptomyces* spp.

Sin embargo, tras un aumento exponencial desde los años 40s del descubrimiento de compuestos bioactivos derivados de actinomicetos, principalmente de *Streptomyces* spp., en los últimos años se ha visto un descenso del número de nuevos compuestos encontrados (Bérdy, 2012), a pesar de que se siguen necesitando nuevos compuestos para hacer frente a la aparición de resistencias y de nuevas enfermedades infecciosas y tumores (Ochi y Hosaka, 2013).

1.5 Identificación y caracterización de nuevos compuestos bioactivos: Metodología clásica *versus* Minería genómica

Desde los años 70s la tasa de descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos ha ido descendiendo progresivamente (Ochi y Hosaka, 2013). La necesidad de compuestos nuevos y mejorados ha dado lugar a que los métodos clásicos de búsqueda sean insuficientes y haya sido necesario buscar alternativas. En la actualidad, podemos seguir distintas estrategias (Fig. 5) para la identificación y caracterización de nuevos compuestos bioactivos y sus agrupaciones génicas (*clusters*) (Olano *et al.*, 2011):

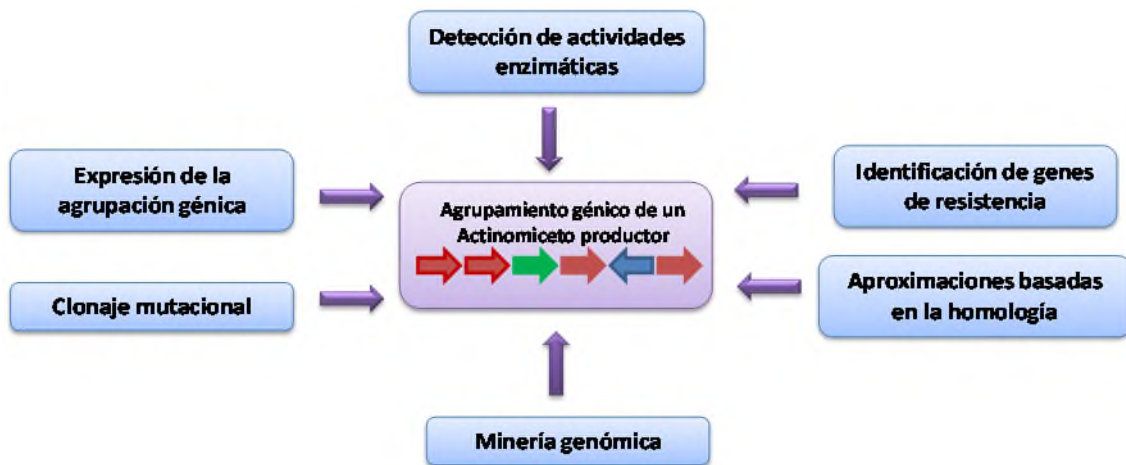


Figura 5. Esquema de las distintas estrategias para el aislamiento y caracterización de un agrupamiento génico. (Dibujo modificado de Olano *et al.*, 2011)

- I. **Identificación de genes de resistencia:** Esta estrategia implica el clonaje en un hospedador sensible de los genes de resistencia del *cluster* provocando que el huésped adquiera resistencia al compuesto bioactivo.
- II. **Aproximaciones basadas en la homología genética:** Este método se puede enfocar desde dos vías:
 - a. PCR con oligonucleótidos (*primers*) degenerados: para amplificar fragmentos de ADN usando *primers* degenerados diseñados a partir de secuencias proteicas conservadas ya conocidas.
 - b. Hibridación de ADN con sondas homólogas o heterólogas: En el caso del uso de sondas homólogas es necesario haber aislado previamente un gen implicado en la biosíntesis para la

localización y aislamiento del *cluster*. También se pueden utilizar como sondas homólogas los productos de PCR obtenidos a partir de los *primers* degenerados.

En el caso de las sondas heterólogas se usan como sondas genes implicados en rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios conocidos y relacionados para localizar nuevos agrupamientos génicos.

- III. **Clonaje mutacional:** Esta estrategia conlleva la inactivación de alguno de los genes implicados en la biosíntesis del metabolito secundario.
- IV. **Expresión del agrupamiento génico:** Para poder expresar el *cluster* es necesario introducir fragmentos de ADN que contengan los genes implicados en la biosíntesis del metabolito en un hospedador heterólogo y detectar la producción del compuesto, o alguno de sus intermediarios, en dicho hospedador.
- V. **Detección de actividades enzimáticas:** Algunos *clusters* pueden ser identificados por actividades enzimáticas específicas. La bibliografía muestra algunos ejemplos como es el caso de la biosíntesis de la rifamicina donde a través de una secuencia parcial aminoacídica se construyeron cebadores (*primers*) para clonar el gen de la ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (AHBA) sintasa implicado en la formación de AHBA (Kim *et al.*, 1998). En estreptomicetos gran parte de los *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios están asociados a dos familias de enzimas: las policétido sintasas (PKSs) y las sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs).
- VI. **Minería genómica:** Implica la secuenciación del genoma del organismo de interés y la predicción e identificación de los distintos *clusters* con la utilización de herramientas bioinformáticas.

1.5.1 Actividades enzimáticas: PKSs y NRPSs

Los metabolitos secundarios presentan una gran variedad de estructuras químicas (Jenke-Kodama *et al.*, 2006) lo cual se debe a la gran diversidad de familias enzimáticas implicadas. Una de las grandes familias de productos naturales son los policétidos catalizados por PKSs. La arquitectura de los policétidos va a depender de la clase de PKS involucrada en su biosíntesis (Jenke-Kodama *et al.*, 2006).

Las PKSs catalizan la condensación tipo Claisen de precursores acil-CoA (Olano *et al.*, 2010). El esqueleto de los policétidos va a ser generado mediante la incorporación sucesiva de diferentes precursores incorporados por la PKS que de este modo va alargando la cadena. Cada uno de estos precursores va a ser introducido por un módulo que está formado por diferentes dominios activos. El módulo de una PKS normalmente presenta tres dominios esenciales: cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT) y proteína transportadora de acilos (ACP). Un dominio adicional, tioesterasa (TE), se localiza generalmente en el último módulo de elongación. Además, cada módulo puede tener dominios auxiliares como son el cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (ER) (Schwarzer y Marahiel, 2001). Cada módulo cargará, condensará y modificará una molécula de acil-CoA para formar el esqueleto del policetídico.

Se han descrito en la bibliografía tres tipos principales de PKSs:

- *PKS tipo I*: enzimas multifuncionales, no iterativas y formadas por varios módulos. Cada módulo se encargará de catalizar un ciclo de condensación y elongación de la cadena del policétido.
- *PKS tipo II*: formadas por enzimas individuales que generan un único módulo iterativo y que dan lugar a policétidos aromáticos.
- *PKS tipo III*: también conocidas como chalcon sintasas. Son enzimas homodiméricas e iterativas.

Algunos policétidos aromáticos no son sintetizados por PKS tipo II sino por un tipo especial de PKS tipo I conocido como PKS tipo I iterativas (Shen, 2003). Estas

PKS tipo I iterativas se han descrito principalmente, en hongos, sin embargo, también se pueden encontrar en estreptomicetos como es el caso de ChIB1 de *Streptomyces antibioticus* DSM 40725. El producto de esta PKS es ácido 6-metilsalicílico y está implicada en la ruta de biosíntesis del antibiótico clorotricina (Shao *et al.*, 2006).

Otra de las grandes familias de productos naturales son los péptidos no ribosomales sintetizados por enzimas multimodulares denominadas sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPSs). Cada módulo tiene la capacidad de cargar un aminoácido para la elongación de la cadena peptídica. Al igual que las PKSs, los módulos de las NRPSs presentan unos dominios esenciales. El dominio que selecciona el aminoácido específico a cargar es el de adenilación (A), el dominio al que se une el aminoácido es la proteína transportadora de péptidos (PCP) y finalmente el dominio de condensación (C) que cataliza la formación de los enlaces peptídicos (Schwarzer y Marahiel, 2001).

1.5.2 Minería genómica

La entrada de la microbiología en la era de la genómica en 1995 con la secuenciación del primer genoma bacteriano, produjo una revolución en la genética y bioquímica de la biosíntesis de los compuestos naturales (Corre y Challis, 2009; Loman *et al.*, 2012). En la última década, la mejora de la secuenciación de genomas y la reducción de los costes ha permitido que hoy en día haya disponibles 5613 genomas bacterianos de los cuales 781 pertenecen a actinobacterias y de ellos 216 sean genomas de *Streptomyces* spp. (Olano *et al.*, 2014b; NCBI). Además de la mejora de las técnicas de secuenciación, también ha mejorado la anotación bioinformática de genomas y las herramientas de búsqueda y análisis de *clusters* de biosíntesis (Olano *et al.*, 2014b) lo que permite realizar comparaciones entre los distintos genomas.

Si en el apartado anterior se describía el enfoque clásico para la identificación, clonaje y caracterización del agrupamiento génico implicado en la biosíntesis de un metabolito secundario conocido, ese enfoque cambia con la secuenciación de genomas.

Con la secuenciación, se ha revelado que las especies de estreptomicetos presentan múltiples agrupaciones de genes con el potencial de sintetizar 20 o más metabolitos secundarios (Ochi y Hosaka, 2013). Sin embargo, muchos de estos *clusters* localizados a través de la secuenciación son crípticos (se desconoce *a priori* el metabolito que determinan) o bien además se encuentran silenciados en condiciones de laboratorio. De forma que hay que identificar el producto natural siguiendo otras estrategias, resumidas en el siguiente esquema (Fig. 6) (Corre y Challis, 2009):

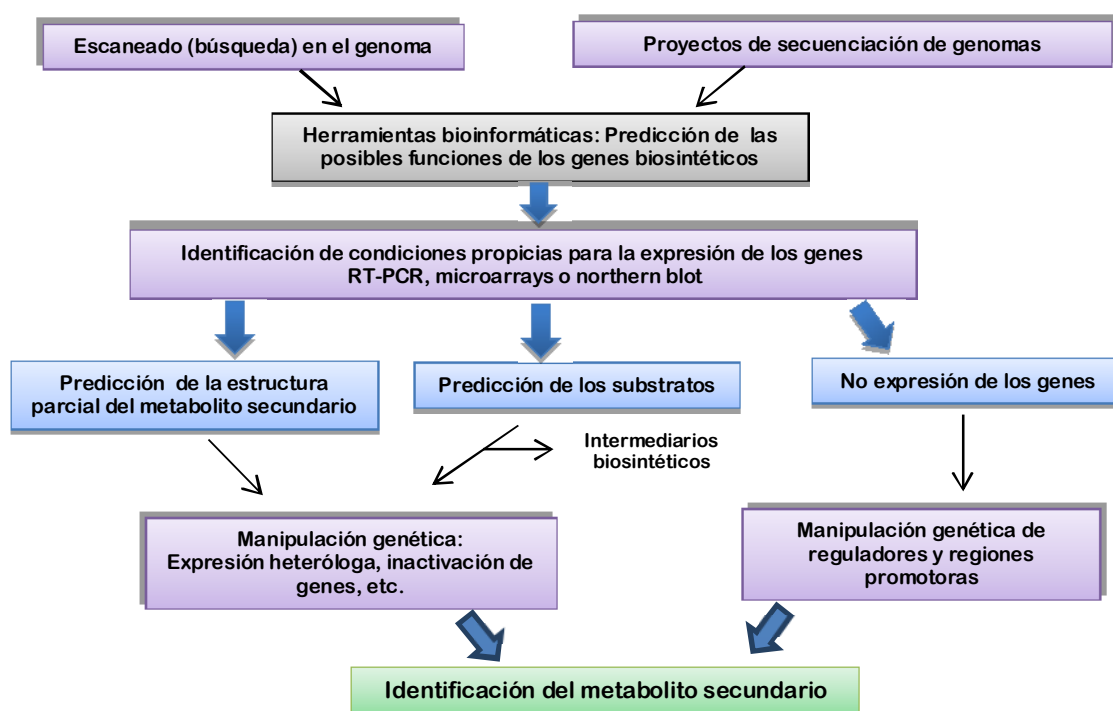


Figura 6. Estrategias para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales a través de la minería genómica. (Dibujo modificado de Corre y Challis, 2009)

A parte de utilizar la metodología clásica y la minería genómica por separado para la identificación de nuevos metabolitos secundarios con potencial actividad biológica, también se pueden combinar ambos métodos para identificar nuevos compuestos bioactivos y caracterizar los *clusters* involucrados en su biosíntesis.

1.6 Compuestos antitumorales: Los Benzoxazoles

Como se ha ido describiendo en los apartados anteriores, existe una necesidad de nuevos compuestos con actividad antitumoral y otras actividades biológicas. Una

familia de compuestos con gran interés farmacológico por su amplio espectro de actividades biológicas son los benzoxazoles (Gautam *et al.*, 2012).

Esta familia de compuestos presenta una estructura química particular formada por la unión de un anillo benceno y un anillo oxazol (Fig. 7) denominado domino benzoxazol.

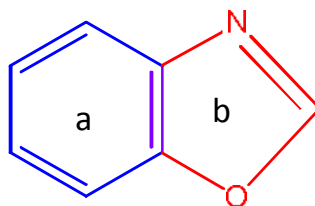


Figura 7. Motivo benzoxazol. a) anillo benceno. b) anillo oxazol.

Los compuestos de la familia de los benzoxazoles pueden presentar dos orígenes:

- **Origen sintético:** Tradicionalmente, se basa en la condensación de 2-aminofenol con ácido benzoico o derivados. Aunque, hoy en día, también se utiliza la salicilaldoxima a través de la reacción de Beckmann (Thomas *et al.*, 2009). Los benzoxazoles de origen sintético abarcan un amplio espectro de actividades biológicas: antidepresivo (Wang *et al.*, 2014), antifúngicos y antituberculosos (Arisoy *et al.*, 2013), antiparasitarios (Tipparaju *et al.*, 2008), inhibidores de la transcriptasa reversa del virus HIV-1 (Akabay *et al.*, 2003) y antitumorales (Abdelgawad *et al.*, 2013).
- **Origen natural:** Están descritos menos benzoxazoles que de origen sintético: A33853, UK-1, calcimicina, AJI9561, nataxazol y caboxamicina (Fig. 8).

1.6.1 Benzoxazoles de origen natural

Los benzoxazoles de origen natural, aparte de compartir el dominio benzoxazol, también comparten el hecho de que todos son producidos por diferentes cepas del género *Streptomyces*.

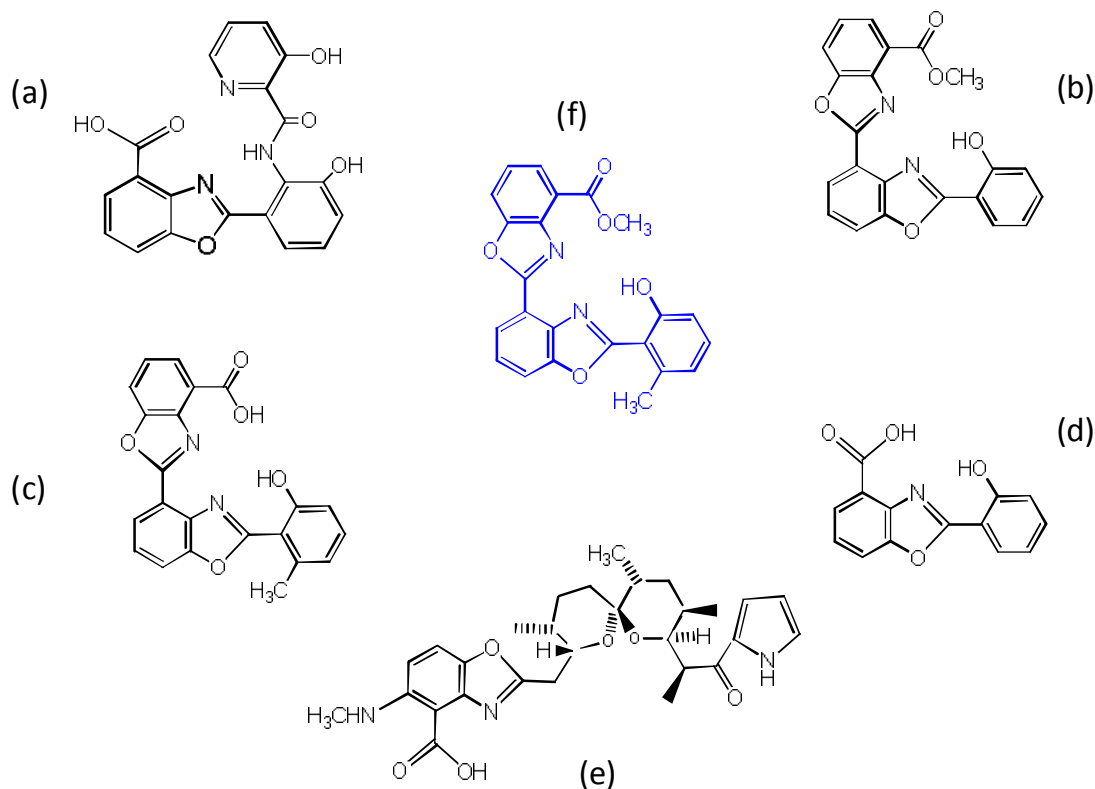


Figura 8. Benzoxazoles de origen natural conocidos. (a) A33853, (b) UK-1, (c) AJI9561, (d) caboxamicina, (e) calcimicina y (f) nataxazol.

1.6.1.1 A33853

A33853 fue uno de los primeros benzoxazoles en ser descritos (Fig. 8a). Se trata de un metabolito secundario producido por la cepa *Streptomyces* sp. NRRL 12068, aislada en una muestra de suelo de Alaska, y junto con el cual se identificó también un derivado denominado tetraacetil A33853 (Michel *et al.*, 1984).

Al A33853 se le realizaron distintas pruebas de actividad biológica viéndose que presentaba actividad antibacteriana (Tabla 1). En experimentos *in vitro*, se observó su actividad antivírica frente al virus de la polio III, del herpes tipo I y frente a diferentes cepas de la gripe, sin embargo, *in vivo* esa actividad no fue reproducible. Lo mismo ocurrió con su actividad antiparasitaria observada en experimentos *in vitro* pero no reproducible en modelos animales (Michel *et al.*, 1984).

Tabla 1. Actividad antibacteriana de A33853 (Michel *et al.*, 1984)

Organismo	MIC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> 3055*	2,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 3074**	2,0
<i>Streptococcus agalatiidae</i> 19F	6,25
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> 29C	1,56
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 55B	<0,78
<i>Mycoplasma hyorninis</i> 29E	1,56
<i>Mycoplasma synoviae</i> 40 ^a	1,56
<i>Aeromonas liquefaciens</i> 44B	3,12
<i>Bordetella bronchiseptica</i> 17D	>50
<i>Echerichia coli</i> 19B	>50
<i>Pasteuralla multocida</i> (bovina) 17E	1,56
<i>Pasteuralla multocida</i> (pavo) 60A	6,25
<i>Pseudomonas</i> sp. 61B	>50
<i>Salmonella dublin</i> 30F	>50
<i>Salmonella typhosa</i> SA12***	2,0

* sensible a benzilpenicilina, aislado clínico
 ** resistente a benzilpenicilina, aislado clínico
 *** aislado clínico

El A33853 fue sintetizado químicamente junto con algunos derivados por Tipparaju y colaboradores en busca de algún compuesto que tuviera más actividad frente al protozoo *Leshmania donovani*. El compuesto más activo fue el original, A33853 (Tipparaju *et al.*, 2008).

1.6.1.2 UK-1

El benzoxazol UK-1 (Fig. 8b) es producido por *Streptomyces* sp. 517-02. cepa aislada de muestras de suelo tomadas en la Universidad Ciudad de Osaka en Japón (Ueki *et al.*, 1993).

Su estructura química se caracteriza por tener dos dominios benzoxazol convirtiéndose en el primer bis-benzoxazol de origen natural descrito. Shibata y colaboradores durante la elucidación estructural del UK-1 propusieron que dos partes del UK-1 podían estar relacionadas con el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) y la tercera con el ácido salicílico (Shibata *et al.*, 1993). Basándose en esta hipótesis, DeLuca

y Kerwin utilizaron como precursor el 3-HAA para la síntesis química del UK-1 (DeLuca y Kerwin, 1997).

El UK-1 no presentan actividad antibacteriana ni antifúngica, sin embargo, presenta actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales como B16, HeLa y la línea control P388 (Ueki *et al.*, 1993). Más adelante se estudió frente a más líneas celulares demostrando que tenía una amplia actividad citotóxica (Tabla 2).

Tabla 2. Citotoxicidad del UK-1 frente a distintas líneas celulares (Kumar *et al.*, 2002)

Línea celular	IC ₅₀ (μM)	Línea celular	IC ₅₀ (μM)
MCF-7	1,6	SK-N-AS	24
HT-29	65	SK-N-D7	0,17
HL60	0,32	SK-N-F1	7
PC-3	0,4	SK-N-MC	1,1
MDA-231	0,5	SK-N-SH	7
BT-20	0,17	CHP-212	12
DU145	0,2	IMR-32	0,06
SKBR3	0,1	NGP	0,02
A549	1,9		

Del UK-1 y diversos derivados sintéticos se han hecho múltiples estudios para poder averiguar cuál es su mecanismo de acción como compuestos citotóxicos (Kumar *et al.*, 2002; McKee y Kerwin, 2008). Los primeros estudios realizados mostraron una alta afinidad del UK-1 por el catión divalente de magnesio (Mg⁺²) y por otros cationes divalentes como calcio (Ca⁺²), cobalto (Co⁺²), níquel (Ni⁺²) y zinc (Zn⁺²) (Kumar *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004), comportándose como un ionóforo. En pruebas de citotoxicidad del UK-1 frente a las líneas celulares MCF-7 y A549 se observó que en las muestras a las que se les añadía cloruro de cobre (CuCl₂) junto al UK-1 aumentaba la citotoxicidad (CuCl₂ no presenta por si solo actividad citotóxica). Se comprobó que la afinidad del UK-1 por los iones Cu⁺² era mayor que por los iones Mg⁺² (McKee y Kerwin, 2008).

Experimentos paralelos del UK-1 frente a la ADN topoisomerasa tipo II (implicada en el desenrollamiento del ADN durante la replicación) llevaron a sugerir que el UK-1 formaba un complejo con el Mg^{+2} , la topoisomerasa y el ADN inhibiendo la acción de la enzima durante el tiempo que está formado el complejo (Wang *et al.*, 2004).

1.6.1.2.1 ADN topoisomerasas tipo II

Para entender la sugerencia realizada por Wang y colaboradores primero hemos de saber qué tipo de enzimas son las ADN topoisomerasas tipo II.

Las ADN topoisomerasas son enzimas que se encuentran involucradas en el maquinaria de replicación celular. Su función recae en la introducción de roturas (o muescas) en una, o en ambas, de las cadenas de la doble hélice que comienza a desenrollarse, por acción de la helicasa, lo que permite el proceso de desenrollado. Esto se debe a que estas muescas alivian la tensión de torsión que se produce durante el desenrollamiento del ADN. Las roturas son rápidamente reparadas sin gasto energético (Murray *et al.*, 2010). Además, las topoisomerasas tienen la capacidad de desenrollar el ADN superenrollado, estructura que se puede encontrar en moléculas de ADN circular.

Las ADN topoisomerasas están clasificadas en dos grandes clases: las ADN topoisomerasas tipo I y las ADN topoisomerasas tipo II. Tanto en procariotas como en eucariotas podemos encontrar los dos tipos. Las topoisomerasas tipo I actúan haciendo una muesca en una de las hebras del ADN. Las topoisomerasas tipo II actúan haciendo la rotura en ambas hebras. Tanto en eucariotas como en procariotas hay principalmente dos tipos de ADN topoisomerasas tipo II: IIA (topo IIA) y IIB (topo IIB). Se caracterizan por ser enzimas multiméricas y ATP dependientes (Lewin, 2004; Forterre *et al.*, 2007). Se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía que para el dominio ATPasa que se encuentra en las topo IIA es necesario el uso de cationes divalentes (esencialmente Mg^{+2}) y además es necesario que la topo IIA tenga un sitio activo para la unión de cationes divalentes durante la formación de la muesca (Lee *et al.*, 2012).

1.6.1.3 Calcimicina

La calcimicina es producida por *Streptomyces chartreusis* NRRL 3881. Se trata del benzoxazol natural más complejo estructuralmente conocido hasta la fecha. Fue descubierto en 1972 y desde entonces ha sido ampliamente estudiado. El primer nombre que recibió esta molécula fue el de A23187. Durante la década de los 70s se publicaron múltiples artículos sobre el A23187 y sus propiedades como ionóforo de cationes divalentes con los que puede formar complejos diméricos para el transporte de éstos a través de la membrana celular (Abbott *et al.*, 1979).

Su estructura química consiste en tres unidades: α -cetopirrol, un motivo benzoxazol y un anillo espiroquetal (Zmijewski, 1980). Estudios realizados utilizando compuestos marcados con ^{13}C apuntaban que la biosíntesis del motivo benzoxazol tenía como precursor una molécula de ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) (David y Emadzadeh, 1982). Estudios posteriores sugirieron que el precursor 3-HAA podría obtenerse por la vía de la degradación del triptófano (David y Kergomard, 1982). Al adicionar ácido antranílico en los medios de cultivo se observó la inhibición de la producción de calcimicina y la aparición de un derivado denominado cezomicina (Fig. 9b) que también poseía la capacidad de quelar cationes divalentes (David y Kergomard, 1982).

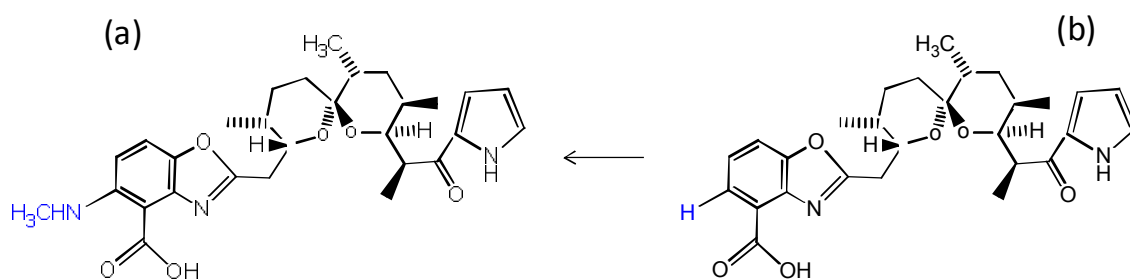


Figura 9. (a) Calcimicina. (b) Cezomicina, precursor de calcimicina.

En 2011 se identificó y caracterizó la agrupación génica encargada de la biosíntesis de calcimicina, el cual presenta un tamaño de 64 kb (Wu *et al.*, 2011). En él se describe como el motivo benzoxazol tiene como precursor 3-HAA formado por la

acción de los productos de cuatro genes: *calB1*, *calB2*, *calB3* y *calB4* (Wu *et al.*, 2011). El 3-HAA se formaría siguiendo la ruta de biosíntesis del sikimato (Knaggs, 1999). Se partiría de una molécula de eritrosa 4-fosfato la cual, por la acción inicial de la aldolasa CalB4 (3-deoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato sintasa) y otras reacciones posteriores de la ruta del sikimato, daría lugar a corismato. El corismato sería modificado por CalB1 (antranilato sintasa) hasta 2-amino-2-deoxiisocorismato (ADIC). ADIC se modificaría para dar ácido *trans*-2,3-dihidro-3-hidroxiantranílico (DHHA) por CalB2 (isocoriamatasa) y, finalmente, CalB3 (2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dehidrogenasa) terminaría el proceso introduciendo un doble enlace final para dar el ácido 3-hidroxiantranílico (Wu *et al.*, 2011).

La formación final del dominio benzoxazol se produciría por el ataque de una molécula de 3-HAA a la estructura policetónica condensada por una PKS tipo I multimodular (CalA1-CalA5) dando lugar al heterociclo que conformará el motivo benzoxazol (Fig. 10). Durante la caracterización de esta ruta de biosíntesis se vio que la cezomicina era un precursor de la calcimicina.

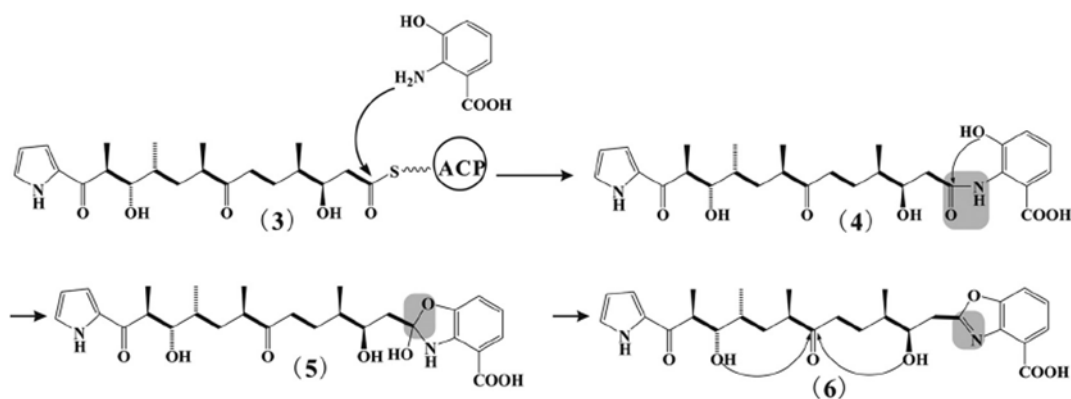


Figura 10. Ataque de 3-HAA a la estructura policetónica para formar el motivo benzoxazol de la calcimicina (Wu *et al.*, 2011).

La calcimicina presenta diversas actividades biológicas. Inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos e inhibe a la ATPasa y desacopla la desfosforilación oxidativa en las células de mamíferos. También induce la apoptosis en cultivos celulares activando señales intracelulares (Wu *et al.*, 2011).

1.6.1.4 AJI9561

Otro de los benzoxazoles de origen natural es AJI9561 (Fig.8c), un bis-benzoxazol producido por *Streptomyces* sp. AJ9561, estreptomiceto aislado de una muestra de suelo de la prefectura de Chiba en Japón por la empresa farmacéutica japonesa Ajinimoto Pharmaceutical Co. No se sabe mucho sobre este benzoxazol a excepción de que presenta actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares (Sato *et al.*, 2001).

1.6.1.5 Caboxamicina

La caboxamicina es el benzoxazol de origen natural más simple conocido (Fig.8d). El productor de la caboxamicina es la cepa *Streptomyces* sp. NTK 937 la cual fue aislada de la de los fondos marinos próximos a las costas orientales de las Islas Canarias (Hohmann *et al.*, 2009). El genoma de *Streptomyces* sp. NTK 937 fue secuenciado (Olano *et al.*, 2014a) por secuenciación de ADN a tiempo real a través de la plataforma PacBio RS II, obteniéndose un genoma de alrededor de 7'5 Mb. A continuación, se utilizó la herramienta bioinformática de predicción de *clusters* implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios antiSMASH 2.0 (Blin *et al.*, 2013) obteniendo como resultado un total de 35 agrupaciones génicas de biosíntesis de metabolitos secundarios potenciales (Olano *et al.*, 2014a).

La caboxamicina se ha propuesto que deriva de ácido 3-hidroxiantranílico y ácido salicílico, ambos producidos a partir de corismato (Hohmann *et al.*, 2009).

Finalmente, la caboxamicina presenta una actividad biológica variada siendo activa frente a bacterias Gram positivas y frente a levaduras. Su actividad citotóxica fue analizada frente a diferentes líneas celulares mostrando una inhibición del crecimiento moderada (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad citotóxica de caboxamicina

Línea celular	IG ₅₀ (µg/ml)	TGI (µg/ml)
AGS	7'5	>10
Hep G2	7'4	>10
MCF-7	7'3	>10

1.6.1.6 Nataxazol

Streptomyces sp. Tü 6176 es una cepa aislada de una muestra de suelo de la región de Natal en la provincia de Rio Grande do Norte en Brasil. La secuenciación parcial del ARN ribosómico (rARN) 16S muestra una similitud de un 97'6% con *Streptomyces coelicolor* DSM 40144 (Sommer *et al.*, 2008).

Durante la fermentación de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se vio que producía un compuesto con un espectro particular (Fig. 11). Tras su purificación y caracterización por NMR se le agrupo dentro de la familia de los benzoxazoles y se le denominó nataxazol (Fig.8f).

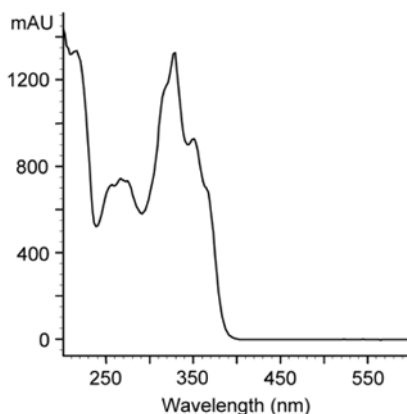


Figura 11. Espectro en UV-visible de nataxazol (Sommer *et al.*, 2009)

El nataxazol, al igual que el UK-1 y AJI9561, presenta dos dominios benzoxazol por lo que pertenecería a los bis-benzoxazoles (Fig. 8).

Se estudió su actividad citotóxica comparándola con la actividad citotóxica del UK-1 (Tabla 4) viéndose que el nataxazol presenta una mayor actividad citotóxica frente a las líneas celulares ensayadas. A continuación, se realizó un análisis del ciclo

celular y reveló que el nataxazol provoca una acumulación de células en la fase S del ciclo (Sommer *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha observado que presente actividad antibacteriana, antivírica o antifúngica (frente levaduras y hongos filamentosos) (Sommer *et al.*, 2008).

Tabla 4. Actividad citotóxica de nataxazol y UK-1 (Sommer *et al.*, 2008)

Línea celular	Nataxazol		UK-1	
	IG ₅₀ (µg/ml)	TGI (µg/ml)	IG ₅₀ (µg/ml)	TGI (µg/ml)
AGS	0,4	2,5	0,8	1,9
Hep G2	0,06	0,4	0,085	3,5
MCF-7	0,68	1,7	0,65	2,4

Tras comprobar que de los benzoxazoles de origen natural como el nataxazol presentan, en general, una mejor actividad antitumoral que aquellos de origen sintético derivados del UK-1, se hace interesante el estudio de su vía de biosíntesis y la posibilidad de obtener nuevos derivados con una actividad antitumoral mejorada.

1.7 Objetivos

En el presente trabajo vamos a estudiar la biosíntesis del benzoxazol citotóxico nataxazol. Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- I. Identificación del agrupamiento génico a través de minería genómica.
- II. Caracterización del agrupamiento génico y de la ruta de biosíntesis a través del estudio de los genes estructurales y de los precursores biosintéticos de nataxazol.
- III. Mejora de la producción del nataxazol en el organismo productor *Streptomyces* sp. Tü 6176 a partir de la identificación y caracterización de los genes reguladores.
- IV. Obtención de nuevos derivados que puedan mejorar la actividad biológica, en especial la citotóxica, de nataxazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos

A continuación en la tabla 5, se muestran los microorganismos que se han utilizado a lo largo de este trabajo:

Tabla 5. Microorganismos utilizados

Organismo	Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	<i>F</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-, mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M 15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara,$ <i>leu)7697</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ^- , <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	ET12567 (pUB307)	<i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201::Tn10</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtli</i> , <i>glnV44</i> , <i>F</i>	Kieser <i>et al.</i> , 2000
<i>Escherichia coli</i>	LE392MP	<i>F</i> ⁻ , <i>e14</i> ⁻ , (<i>McrA</i> ⁻) $\Delta(mcrC-mrr)$ (<i>Tet</i> ^R), <i>hsdR514</i> , <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacY1</i> , <i>o</i> $\Delta(lacIZY)6$, <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> , λ^- .	Epicentre
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VL6-48	<i>MAT alpha</i> , <i>his3-D200</i> , <i>trp1-D1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2</i> , <i>ade2-101</i> , <i>met14</i> , <i>psi+cir</i> ⁰	Yamanaka <i>et al.</i> , 2014
<i>Streptomyces sp.</i>	Tü 6176	Productor de nataxazol	Sommer <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces sp.</i>	NTK 937	Productor de caboxamicina	Hohmann <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces albus</i>	J1074	<i>ihv-1</i> , <i>sal-2 RM-</i>	Chater y Wilde, 1980
<i>Streptomyces argillaceus</i>	ATCC 12956	Productor de mitramicina	Colección americana de cultivos tipo
<i>Streptomyces lividans</i>	JT46	<i>Bld</i> ⁺ , <i>Arg</i> ⁺ , <i>rec</i> ⁻	Tsai y Chen 1987

2.2 Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos utilizados para el cultivo de las distintas cepas son principalmente los descritos por Sambrook *et al.* (2001) y Hopwood *et al.* (1985).

2.2.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivos utilizados durante el presente trabajo fueron autoclavados para su esterilización a 121°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Los medios de cultivo se describirán en su versión de caldo (líquido), excepto aquellos que se hayan usado exclusivamente en sólido. Para obtener esos mismos medios en forma sólida se procedió a añadirle un 2% de agar. Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada, a no ser que se indique lo contrario.

2.2.1.1 Medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli* y levaduras

- **Medio 2xTY** (Sambrook *et al.*, 2001): En forma sólida se utilizó para seleccionar clones que contuvieran el ADN plasmídico deseado. En forma líquida se usó para obtener masa de las cepas de *E. coli* DH10B y ET12567 y así poder extraer el ADN plasmídico introducido.
 - Composición: Triptona (16 g/l), extracto de levadura (10 g/l) y NaCl (5 g/l).
- **Medio Luria Broth (LB)** (Epicentre): Medio líquido utilizado para obtener masa de *E. coli* DH10B para extraer el ADN plasmídico destinado a la secuenciación. En forma sólida (LA) se usó para la obtención de la genoteca utilizando la cepa *E. coli* LE392MP.
 - Composición: Bacto-Triptona (10 g/l), Bacto-extracto de levadura (5 g/l) y NaCl (10 g/l). pH 7
- **Medio SuperBroth (SB)** (Atlas, 2010): Tanto en líquido como en sólido se usó para clonar el *cluster* de nataxazol usando la cepa *E. coli* LE392MP.
 - Composición: Triptona (32-35 g/l), extracto de levadura (20 g/l) y NaCl (5 g/l). pH 7 - 7.5.

- **Medio Agar Saboureaud** (Sigma-Aldrich): Medio sólido utilizado para en crecimiento de levaduras durante la realización de los bioensayos.
 - Composición: Glucosa (dextrosa) (40 g/l), peptona micológica (10 g/l) y Agar (15 g/l). pH 5'6.
- **Medio YPD** (Sigma-Aldrich): Medio líquido para el crecimiento de levaduras.
 - Composición: Glucosa (20 g/l), extracto de levadura (10 g/l), peptona (10 g/l) y adenina (100 mg/l).
- **Medio YNB/sorbitol** (Kouprina y Larinov, 2008): Medio sólido utilizado para el crecimiento de levaduras.
 - Composición: Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (170 mg/l), medio sintético suplementado sin triptófano (190 mg/l), 1 M sorbitol, 100 mg/l adenina (20 g/l) y agar (20 g/l).

2.2.1.2 Medios de cultivo para el crecimiento de *Streptomyces* spp.

- **Medio TSB** (Tryptone Soya Broth, Merck): Medio de cultivo comercial utilizado para la obtención de masa de *Streptomyces* spp. con el objetivo de poder obtener ADN cromosómico o poder inocular los diferentes medios de interés.
 - **Medio TSA ½**: Al medio TSB se le adiciona un 1 % de agar para poder realizar los ensayos de actividad biológica de los distintos compuestos ya que así pueden difundir de una manera más eficaz.
- **Medio A (MA)** (Fernández *et al.*, 1998): Medio sólido utilizado para la esporulación de *Streptomyces* sp. Tü 6176, *Streptomyces* sp. NTK 937 y *S. albus* J1074 y para el proceso de conjugación de las tres cepas.

- Composición: MOPS (21 g/l), Glucosa (5 g/l), Extracto de levadura (0'5 g/l), extracto de carne (0'5 g/l), casaaminoácidos (1 g/l). pH: 7 (ajustar con KOH). Agar (22 g/l).
- **Medio YEME 17%** (Kieser *et al.*, 2000, modificado): Medio líquido utilizado para obtener protoplastos de *Streptomyces* spp. La modificación consiste en una reducción de la concentración de sacarosa del 34% al 17%.
 - Composición: Glucosa (10 g/l), extracto de levadura (3 g/l), extracto de Malta (3 g/l), bactopectona (5 g/l) y sacarosa (170 g/l). Tras autoclavar se suplementa con glicina 20% (25 ml/l) y MgCl₂ 1M (5 ml/l).
- **Medio R5A** (Fernández *et al.*, 1998): Medio utilizado para la producción de los metabolitos secundarios y la purificación.
 - Composición: Sacarosa (103 g/l), MOPS (21 g/l), glucosa (10 g/l), casaaminoácidos (0'1 g/l), extracto de levadura (5 g/l), K₂SO₄ (0,25 g/l), MgCl₂.6H₂O (10,12 g/l), oligoelementos (2 ml) [Composición: ZnCl₂ (0,04 g/l), FeCl₃.6H₂O (0,2 g/l), CuCl₂.2H₂O, MnCl₂.4H₂O (0,01 g/l), Na₂B₄O₇.10 H₂O (0,01 g/l), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,01 g/l)]. pH 6'8 (ajustar con KOH). Para obtener su forma sólida se añade 25 g/l de agar.
- **Medio R5** (Kieser *et al.*, 2000): Medio sólido utilizado para regenerar protoplastos de *Streptomyces* spp.
 - 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 (5,73g/l), 2 ml de una solución de oligoelementos [los mismo del R5A], y 25 g/l de agar. Tras autoclavar, se suplementa con 10 ml/l de KH₂PO₄ 0,5%, 4ml/l de CaCl₂.2H₂O 5M, 15ml/l de L-prolina 20% y 7ml/l de NaOH 1M.

- **Medio SNA 0'5%**: Es un medio utilizado para añadir una sobrecapa conteniendo los antibióticos de selección al medio de cultivo donde se está realizando la conjugación.
 - Composición: Caldo Nutritivo (8 g/l). Agar (5 g/l)
- **Medio GHSA** (Alfredo F. Braña, no publicado): Este medio se utilizó siempre sólido. Se utilizó para la purificación de nataxazol.
 - Composición: MOPS (21 g/l), glucosa (10 g/l), extracto de levadura (0'5 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,6 g/l), harina de soja (10 g/l), oligoelementos (2ml) [los mismo del R5A]. pH 6'75.
- **Medio definido (MD)** (Vior *et al.*, 2014): Este medio siempre se utilizó líquido y fue modificado eliminando alguno de los metales que lo componen para la obtención de los metabolitos enterobactina y UK-1.
 - Composición general: MOPS (21 g/l), glucosa (10 g/l), asparagina (2 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,6 g/l), MOPS (21 g/l); glucosa (10 g/l); K₂HPO₄ (3,5 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,6 g/l); MnCl₂·4H₂O (5 mg/l), ZnSO₄·H₂O (1 mg/l), CaCl₂ (1mg/l). pH 6'8. Suplementar tras el autoclavado con FeSO₄ (5mg/ml)

2.2.2 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* DH10B y ET12567 (pUB307) se cultivaron en los medios 2xTY sólido o LA a 37°C obteniéndose colonias aisladas a las 24 horas. Para obtener masa se partió de colonias aisladas y se incubó a 37°C 12 horas en agitación de 200 rpm. En todos los casos añadiendo el o los antibióticos de selección necesarios.

La cepa de *E. coli* LE392MP para la obtención de la genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se cultivó en medio LA a 30°C durante 24 horas para obtener los clones aislados y posteriormente en LB durante 12 horas a 30°C en agitación a 250 rpm para obtener masa y aislar los cósmidos correspondientes. Para clonar el *cluster* del

nataxazol y poder introducirlo en *Streptomyces* spp. en el plásmido pEBZ333 (Eberz *et al.*, 2007) se cultivó en SB a 30°C durante 36 horas. Para obtener masa se cultivó a 30°C en agitación a 250 rpm durante 12 horas. En ambos casos se adicionó el o los antibióticos de selección necesarios.

Las cepas de *Streptomyces* spp. se sembraron en MA para obtener esporas incubándolas a 30°C durante 7 días. Partiendo de las esporas se cultivaron en TSB durante el tiempo indicado en la Tabla 6 a 30°C con una agitación de 250 rpm para extraer el ADN cromosómico o para obtener pre-inoculo para posteriores propagaciones.

Tabla 6. Tiempo de incubación en TSB de las distintas cepas de *Streptomyces* spp.

Cepa de <i>Streptomyces</i> spp.	Tiempo de incubación
<i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	12-16 horas
<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	48 horas
<i>S. albus</i> J1074	24 horas

2.2.3 Condiciones de conservación

Para la conservación de células de *E. coli*, se procedió a centrifugar 1'5 ml de cultivo, se eliminó todo el sobrenadante, a continuación se añadió 100 µl 2xTY líquido y se terminó de resuspender en 1 ml de glicerol al 50%. La suspensión se conservó a -20°C.

Para la conservación de esporas *Streptomyces* spp. recogidas de un medio sólido, se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 50% y se conservaron a -20°C. Para la conservación del micelio de *Streptomyces* sp. Tü 6176, de un cultivo crecido en TSB durante 12 horas a 30°C a 250 rpm, se centrifugó 5 ml, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se lavó 2 veces con sacarosa al 10'3%. Finalmente, se resuspendió en 5 ml de sacarosa 10'3%. La suspensión de micelio se guardó a -20°C.

2.3 Antibióticos

Los antibióticos utilizados para la selección de los diferentes clones tanto de *E. coli* como de *Streptomyces* spp. fueron los mostrados en la tabla 7:

Tabla 7. Antibióticos utilizados durante este trabajo.

Antibiótico	Solventes	Concentración en stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Ácido nalidíxico (Roche)	NaOH 0'5N	25	25
Ampicilina (Roche)	Agua destilada	100	100
Apramacina* (Sigma)	Agua destilada	200	100/25
Cloranfenicol (Sigma)	Etanol 100%	50	25
Eritromicina (AppliChem)	Metanol 100%	200	200
Higromicina (Roche)	PBS	50	200
Kanamicina (Roche)	Agua destilada	50	50
Tetraciclina (Sigma)	Etanol 70%	25	10
Tioestreptona (Sigma)	DMSO	25	25

*La concentración de apramicina en *E. coli* es de 100 µg/ml mientras que para *Streptomyces* spp. es de 25 µg/ml

2.4 Enzimas

Las enzimas de restricción, la fosfatasa alcalina, la ADN ligasa del fago T4, las diferentes polimerasas (pfx, Taq, Klenow, Herculasa) y lisozima utilizadas fueron suministradas por Amershan Pharmacia, Takara, Invitrogen, Promega, Fermentas y Roche.

La solución de ARNasa (Sigma) se preparó a una concentración final de 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl 15 mM, calentando a 90°C durante 15 minutos y

permitiendo que se enfriara lentamente a temperatura ambiente. La solución se conservó a -20°C.

2.5 Vectores

A continuación se presentara una relación de plásmidos utilizados a lo largo de este trabajo (Tabla 8):

Tabla 8. Vectores utilizados a lo largo de este trabajo

Vector	Tamaño (Kb)	Resistencia	Huésped	Referencia
pAGe-1	5'12	Ampicilina	<i>E. coli</i>	A. González (datos no publicados)
pCR®-blunt	3'5	Kanamicina	<i>E. coli</i>	Invitrogen
pCAP01	9'01	Kanamicina	Levaduras/ <i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Yamanaka <i>et al.</i> , 2014
pCXJ18	5'8	Ampicilina	Levaduras/ <i>E. coli</i>	Chen, 1996
pEBZ333	13'6	Apramicina / Cloranfenicol	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Eberz <i>et al.</i> , 2007
pEFBAoriT	5'42	Apramicina / Ampicilina	<i>E. coli</i>	Horna <i>et al.</i> , 2011
pEM4T	8'7	Ampicilina	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Menéndez <i>et al.</i> , 2006
pHZ1358	10'7	Ampicilina / Tioestreptona	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Sun <i>et al.</i> , 2009
pOJ260	3'5	Apramicina	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pSET152	5'5	Apramicina	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> spp.	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pSL1180	3'42	Ampicilina	<i>E. coli</i>	Amersham
pWE15	8'13	Ampicilina / Kanamicina	<i>E. coli</i>	Stratagene

2.6 Aislamiento de ADN

Los métodos para la obtención del ADN, tanto plasmídico en *E. coli* como cromosómico de *Streptomyces* spp., se basaron en los descritos por Sambrook *et al.* (2001) y Kieser *et al.* (2000).

2.6.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico en *E. coli*.

Para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó a través del método de lisis alcalina descrito por Bimboin *et al.* (1979) con algunas modificaciones. Las soluciones y productos utilizados fueron los enumerados a continuación:

- a. Solución I: 50 mM glucosa, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA.
- b. Solución II: 1% SDS y 0,2 N de NaOH.
- c. Solución III: Acetato potásico 5M y ácido acético glacial hasta pH 8.
- d. Isopropanol
- e. Etanol 70%
- f. TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8

2.6.2 Obtención de ADN plasmídico para secuenciación.

Para la obtención de ADN de plásmidos recombinantes que se habían obtenido de *E. coli* DH10B, se cultivó durante toda una noche 5 ml de células en 2xTY o LB. Seguidamente, se extrajo y se purificó el ADN plasmídico utilizando el Kit comercial “*StrataPrep Plasmid Miniprep Kit*” (Stratagene).

Para la obtención de los cósmidos de *E. coli* LE392MP se realizó una minipreparación descrita en el apartado anterior con algunas modificaciones. Para ello se utilizaron las siguientes soluciones:

- a. Solución I: 50 mM glucosa, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA.
- b. Solución II: 1% SDS y 0,2 N de NaOH.
- c. Solución III: Acetato potásico 5M y ácido acético glacial hasta pH 8.

- d. Fenol-(Cloroformo-Isoamílico) (1:1)
- e. Cloroformo
- f. Isopropanol
- g. Etanol 70%
- h. TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8

2.6.3 Obtención de ADN cromosómico de *Streptomyces* spp.

Para la obtención ADN cromosómico de las distintas cepas de *Streptomyces* spp. se siguió el método descrito por Hopwood *et al.* (1985) con algunas modificaciones en el procedimiento, de tal forma que el ADN obtenido no solo estuviera poco fragmentado sino que también estuviera altamente limpio. De esta manera, el ADN cromosómico nos sirve para realizar la PCR, Southern Blot, obtención de genotecas y secuenciación del genoma completo. A continuación, se describirá el protocolo y sus modificaciones.

Tras haber crecido *Streptomyces* spp. se centrifuga el cultivo para eliminar el caldo. Se lava el micelio tres veces con sacarosa 10'3%. Al finalizar el último lavado, se elimina el sobrenadante para seguidamente resuspender el micelio en 5 ml de SET Buffer obteniendo una solución homogénea. A continuación, se añade 100 µl de lisozima [50 mg/ml] y se incuba durante una hora a 37°C con una agitación leve. Posteriormente se añade 140 µl de proteinasa K [20 mg/ml] y 600 µl de SDS 10% incubándolo sin agitación durante 2 horas a 55°C. Tras este periodo se añade 200 µl de NaCl 5M y 20 ml de H₂O MiliQ estéril mezclándolo todo cuidadosamente. A continuación se añade un volumen de fenol:cloroformo (25 ml). Se mezcla por inversión hasta obtener una solución homogénea de color blanco. Se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos a 10°C y se recoge la fase superior pipeteando con un tip de un mililitro con la punta cortada para evitar la rotura del ADN por cizalla. A continuación, se le añade 200 µl de ARNasa [5 mg/ml] incubándose durante una hora a 37°C sin agitación. Terminado el periodo de incubación, se le vuelve a añadir un volumen de fenol:cloroformo y se centrifuga. Tras la centrifugación, se recoge la fase superior y se

le añade un volumen de cloroformo-isoamílico. Los lavados se repiten dos veces sustituyendo en el último lavado el cloroformo-isoamílico por cloroformo.

Para precipitar el ADN se añade 0'6 volúmenes de isopropanol mezclando por inversión la solución cuidadosamente hasta observar el ovillo de ADN. Con una punta de pipeta se recoge y se añade a un eppendorf con 500 µl de etanol absoluto. Se centrifuga a 11000 rpm durante 2 minutos, se elimina el sobrenadante, se añade 500 µl de etanol 70% y se vuelve a centrifugar. Se elimina totalmente el etanol y se deja secar durante 5 minutos. Finalmente, se añade el volumen adecuado de TE buffer.

2.7 Manipulación *in vitro* del ADN

2.7.1 Digestión enzimática.

Las digestiones enzimáticas se realizaron utilizando endonucleasas de restricción tal y como se describe en Sambrook *et al.* (2001). Los tampones y las condiciones de la reacción que se siguieron fueron las establecidas por las casas comerciales para cada enzima.

2.7.2 Generación de extremos romos.

En ocasiones los extremos obtenidos por digestión enzimática de diferentes ADNs para su posterior ligación no eran compatibles, de modo que se procedió a la realización de extremos romos utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa tal y como se describe en Sambrook *et al.* (1989).

2.7.3 Desfosforilación de extremos 5' del ADN.

Para evitar que los vectores utilizados a lo largo de este trabajo se religaran, se procedió a eliminar los grupos fosfatos de sus extremos 5'. Para ello, se adicionó la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera, CIP (New England Biolabs), al ADN utilizando el tampón adecuado (Tris-HCl 50mM pH 8, Na₂-EDTA 0,1mM) y la concentración establecida por la casa comercial (1 unidad de CIP por cada 100 µg de ADN). Se incubó durante una hora a 37°C y, finalmente, se purificó el ADN utilizando

el kit comercial “*GFX PCR DNA and Gel Band Purificación Kit*” de Amersham Biosciences.

2.7.4 Ligación de fragmentos de ADN.

Para el proceso de ligación se siguieron los pasos descritos por Sambrook *et al.* (2001). Se utilizó la enzima ligasa de ADN del fago T4 que puede ligar tanto extremos cohesivos como extremos romos. La proporción molar utilizada habitualmente fue de uno del vector frente al menos cuatro del fragmento a clonar. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora y un máximo de 20 horas.

2.8 Análisis del ADN

2.8.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las muestras de ADN para realización de la electroforesis en geles de agarosa se cargaron añadiéndoles tampón de carga constituido por 100 mM de EDTA, 43% glicerol y 0,5% azul de bromofenol. El tampón de carga actúa como densificante. Además, habitualmente, se utilizó como marcador de peso molecular el ADN del fago λ digerido PstI con una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Los geles de agarosa utilizados para la electroforesis se hicieron a una concentración de 0,7% o 1,5%, según el tamaño del fragmento de ADN. Para la preparación de los geles se utilizó, a parte del agar, TAE [1x] (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales que contenían TAE [1x] a un voltaje de 90 V.

Para la visualización de los fragmentos de ADN tras la electroforesis se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sambrook *et al.*, 2001) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta.

Para la observación del ADN cromosómico destinado a la realización de genotecas algunos de los parámetros fueron variados. Además, del ADN del fago λ digerido PstI, también se utilizó el ADN del fago λ digerido HindIII como marcador de

peso molecular, ambos a la misma concentración. Los geles de agarosa tuvieron una concentración de 0'5% y el voltaje de la electroforesis fue de 30 V.

2.8.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN que presentaban un interés para la realización del trabajo, tras terminar la electroforesis y su visualización se recortaron y se purificaron utilizando el kit comercial “*GFX PCR DNA and Gel Band Purificación Kit*” de Amersham Biosciences.

2.9 Transformación con ADN plasmídico.

2.9.1 Preparación de competentes de *E. coli* y su transformación.

Para la obtención de células competentes de *E. coli* (DH10B y LE392MP) se partió de cultivos en fase exponencial que presentaran una densidad óptica (OD) de entre 0'4 y 0'6 a 600 nm. La competencia fue inducida siguiendo el método del cloruro de calcio descrito por Sambrook *et al.* (2001). La transformación por choque térmico de las células para la introducción del ADN plasmídico se realizó siguiendo los pasos descritos por Sambrook *et al.* (2001).

Tras la transformación, las células se sembraron en 2xTY sólido, LA o TSB sólido junto con el antibiótico o los antibióticos de selección pertinentes. En los casos donde el ADN plasmídico contuviera el gen *lacZ* (codifica una β -galactosidasa), al medio también se le añadió X-gal [40 μ g/ml] e IPTG [12,5 μ g/ml] para facilitar la identificación de las células transformadas.

2.9.2 Preparación de electrocompetentes de *E. coli* y su electroporación.

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* ET12567 (pUB307) se partió de cultivos en fase exponencial (preferiblemente con una OD₆₀₀ de 0'6). La electrocompetencia fue inducida siguiendo los pasos descritos por MacNeil *et al.* (1992) utilizando glicerol al 10% a 4°C.

La transformación se realizó con electroporador *Micro pulser* de BioRad. Las células transformadas se sembraron en 2xTY sólido o LA con los antibióticos de selección.

2.10 Obtención de una genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176.

Para la generación de la librería genómica de *Streptomyces* sp. Tü 6176 utilizó el cósmido pWE15 (Tabla 8, Fig.12) debido a que es un vector que admite una gran cantidad de ADN, alrededor de 40 kb. Las cepa de *E. coli* elegida para la generación de la genoteca fue *E. coli* LE392MP.

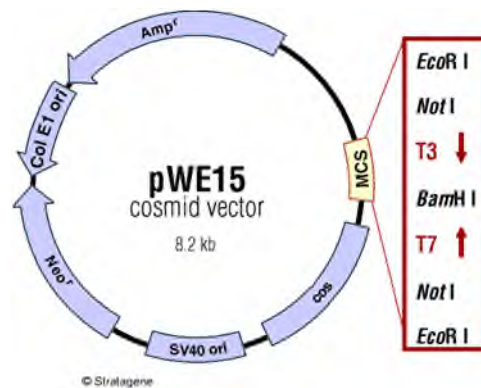


Figura 12. Mapa del cósmido pWE15 (Stratagene)

El primer paso fue digerir el vector con la enzima BamHI que posteriormente se desfosforiló con fosfatasa alcalina para evitar el religado del vector; se comprobó por electroforesis que la digestión había sido correcta y se purificó el plásmido digerido y desfosforilado con el kit comercial “*GFX PCR DNA and Gel Band Purificación Kit*” (Amershan Biosciences). A continuación se digirió el ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. Tü 6176 con el enzima Sau3AI. Esta enzima corta en múltiples sitios dentro del genoma de la bacteria y deja extremos cohesivos compatibles con los extremos de BamHI. Se intentó obtener fragmentos que tuvieran un tamaño de alrededor de 40 kb, para ello las digestiones fueron incubada a 37°C entre 30 y 40 segundos.

Seguidamente, se procedió a la ligación del vector con los fragmentos ADN cromosómico. Para ello, se utilizó una proporción de vector-fragmento de 1:2 obteniendo un volumen final de la ligación de 100 μ l. La ligación se dejó durante 20

horas a temperatura ambiente. Tras la ligación, se procedió al empaquetamiento *in vitro* de las construcciones obtenidas utilizando el kit comercial “MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts” (Epicentre). Los fagos obtenidos se mezclaron con un cultivo de *E. coli* LE392MP OD₆₀₀ de 0’8 para proceder a la infección. Se cultivaron en medio LA con ampicilina, marcador de selección del vector, a 37°C durante 24 horas.

El número de clones obtenidos debe ser lo suficientemente grande para que el genoma de la bacteria se encuentre representado. En el caso de la genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176, tras la infección, se obtuvieron 1622 clones lo cual corresponde a una representación de 7’6 veces del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 (Fig. 13). Se inocularon placas de microtiter de 96 pocillos con 100 µl LB y ampicilina, en cada pocillo se cultivó cada clon individualmente. Para su conservación, a cada pocillo se le adicionó 100 µl de glicerol 50% y se guardaron las 17 placas microtiter a -70°C.

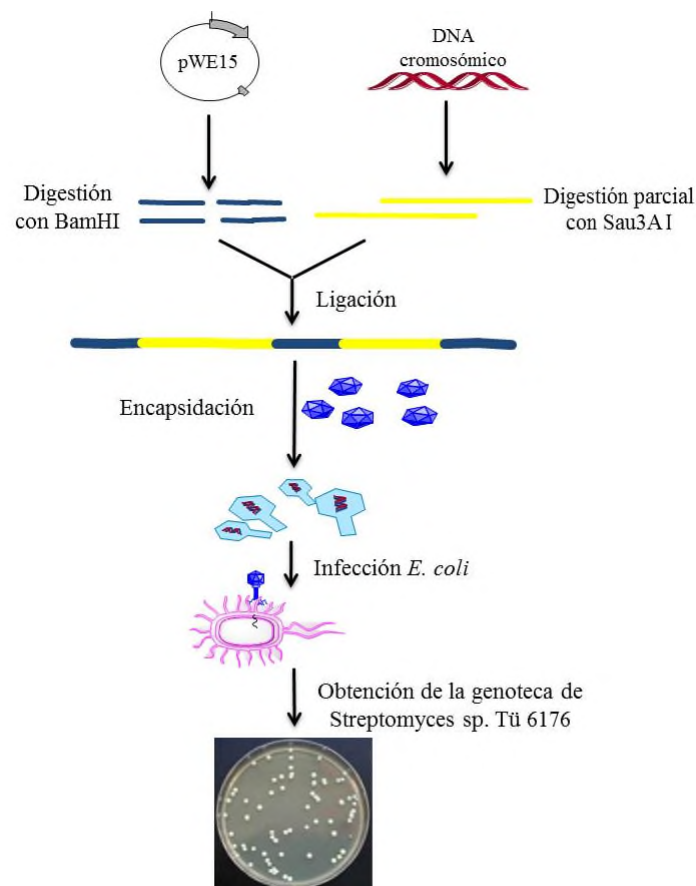


Figura 13. Esquema de la obtención de la genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176.

2.11 Conjugación de *Streptomyces* spp.

2.11.1 Conjugación de micelio de *Streptomyces* sp. Tü 6176

Para realizar el proceso de conjugación interespecífica entre las células *E. coli* ET12567 (pUB307) y *Streptomyces* sp. Tü 6176, primero, se procedió a obtener micelio de *Streptomyces* sp. Tü 6176. Para ello, se inoculó esporas de *Streptomyces* sp. Tü 6176 en 50 ml de TSB dejándolo crecer a 30°C durante 12 horas a 250 rpm. A continuación, se centrifugó el micelio durante 10 minutos a 4400 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en el mismo volumen de sacarosa 10'3%. Este proceso se repitió dos veces más. Tras la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el micelio en sacarosa 10'3% hasta obtener una OD₆₀₀ de entre 0'35 – 0'5. Se repartió el micelio en tubos eppendorf añadiendo 150 µl de volumen en cada uno de ellos. El micelio que no fue utilizado inmediatamente para conjugar se guardó a -20°C.

Para el proceso de conjugación se centrifugó el micelio (150µl) durante 5 minutos a 11000 rpm para eliminar la sacarosa, se añadió 1 ml de 2xTY líquido resuspendiendo el micelio. Se centrifugó 5 minutos a 11000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió dos veces. Tras el último lavado, el micelio se resuspendió en 200 µl de 2xTY líquido. Paralelamente se procedió a crecer células de *E. coli* ET12567 en 10 ml de 2xTY líquido que contenían construcciones derivadas de los plásmidos pOJ260, pHZ1358 o pSETec para la interrupción génica, el reemplazamiento génico y la sobreexpresión génica, respectivamente, hasta obtener el cultivo en fase exponencial con una OD₆₀₀ de entre 0'4 y 0'6. Las células de *E. coli* se centrifugaron 5 minutos a 4400 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 2xTY. Se volvieron a centrifugar y se repitió el proceso de lavado dos veces. Tras los lavados se resuspendieron las células de *E. coli* en 800 µl de 2xTY. Finalmente se mezclaron en un mismo eppendorf los 800 µl de células de *E. coli* y los 200 µl micelio de *Streptomyces* sp. Tü 6176. A continuación, distribuyó en 4 placas de MA sin antibiótico y se incubó a 30°C durante un periodo de entre 20 y 22 horas. Finalmente, se añadió 3 ml de medio SNA 0'5% con los antibióticos ácido nalidíxico y apramicina necesarios para obtener

los transconjugantes deseados. La incubación se realizó a 30°C durante un periodo de entre 15 y 20 días para la obtención de transconjugantes que hayan sufrido una interrupción o reemplazamiento génico y de entre 5 y 7 días para la sobreexpresión génica utilizando vectores replicativos o integrativos.

2.11.2 Conjugación de esporas de *S. albus* J1074

Para el proceso de conjugación de *S. albus* J1074 y *E. coli* ET12567 (pUB307) se procedió a crecer durante toda la noche 1'5 ml de células *E. coli* ET12567 con las construcciones derivadas de pSETec y pEM4T. El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 11000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 2xTY líquido y se volvió a centrifugar. Se repitieron los lavados dos veces. Tras finalizar los lavados se resuspendieron las células en 900 µl de 2xTY líquido. Por otro lado, de una suspensión de esporas de *S. albus* se tomaron 50 µl añadiéndole 1 ml de 2xTY líquido para proceder a realizar dos lavados. Tras ello se resuspendieron en 100 µl de 2xTY líquido y se incubaron a 50°C 10 minutos para estimular la germinación de las esporas. Para proceder a la conjugación se mezclaron la suspensión de *E. coli* con las esporas. Se sembró 250 µl de la suspensión por placa de medio MA y se incubó a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente, se añadió al cultivo 3 ml de SNA 0'5% con los antibióticos ácido nalidíxico y apramicina o tioestreptona. Se dejó incubando a 30°C entre 5 y 7 días.

2.12 Transformación de protoplastos de *S. albus* J1074 y otros *Streptomyces* spp.

Los protoplastos de *S. albus* J1074 y otros *Streptomyces* spp. se obtuvieron siguiendo la técnica descrita por Kieser *et al.* (2000) con la modificación de que el medio de cultivo empleado fue YEME más 17% sacarosa.

La transformación de protoplastos se realizó siguiendo los pasos descritos por Kieser *et al.* (2000) utilizando polietilenglicol (PEG) 6000 a una concentración de 0'25 mg/ml. Los protoplastos se cultivaron en medio R5 para permitir su regeneración cultivándose durante toda una noche a 30°C. Al día siguiente, se añadió una sobrecapa

de SNA 0'5% con el antibiótico de selección del plásmido utilizado para transformar los protoplastos. Finalmente, se incubaron entre 5 y 7 días a 30°C.

2.13 Técnicas de hibridación de ADN

Durante la realización de este trabajo se hizo uso de dos técnicas de hibridación de ADN: hibridación *in situ* de colonias y Southern blot.

2.13.1 Hibridación *in situ* de colonia

Es una técnica rápida de búsqueda y selección de clones positivos que contengan un determinado fragmento de ADN. En nuestro caso, se utilizó para el análisis de la genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176.

Primero, las colonias transformadas que se desean analizar y que previamente se han ordenado en placas de microtiter se cultivan en placas de TSA, haciendo siempre una réplica de cada placa. Se dejan crecer 24 horas a 30°C para luego transferirlas a una membrana de nailon siguiendo los pasos descritos por Sambrook *et al.* (2001). En el presente trabajo, para la transferencia se utilizó membranas de nailon cargadas positivamente Hybond-N⁺ (Amersham) para facilitar que se una el ADN. A continuación, se desnaturalizaron las colonias transferidas para liberar el ADN que se unirá a la membrana. Para ello, se utilizaron las soluciones: SDS 10%, solución desnaturalizante (NaOH 0'5M, NaCl 1M) y solución neutralizante (Tris-HCl 0'5M, NaCl 3M, pH 7'5). La fijación de ADN a la membrana se realizó con pulsos cortos de 1 minuto de luz ultravioleta.

Tras fijar el ADN de las colonias a la membrana se procedió a la hibridación utilizando una o varias sondas de ADN específicas y marcadas. Las sondas se obtuvieron mediante la amplificación por PCR del fragmento de ADN correspondiente al fragmento utilizado para la interrupción génica de la policétido sintasa (PKS) tipo I iterativa de *Streptomyces* sp. Tü 6176 implicada en la biosíntesis del ácido 6-metilsalicílico, precursor del nataxazol (Tabla 9). Los oligonucleótidos utilizados para la

realización de la PCR se diseñaron utilizando la secuencia del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para obtener el fragmento de ADN utilizado como sonda en la hibridación *in situ* de colonia.

Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
PKS1Ta	TGAATTCGTCCTCGAACAGGCGCCG
PKS1b	AAAAAGCTTGGCGACGACCTCGGTGATCG

Para el marcaje de la sonda de ADN se usó el kit comercial “*DIG DNA Labeling and Detection kit*” (Roche) el cual utilizada DIG-11-dUTP. La sonda es marcada con dioxigenina generándose a partir de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como iniciadores de la síntesis utilizando el ADN molde desnaturalizado. Para este proceso se utilizó como enzima el fragmento Klenow de la ADN polimerasa tipo I de *E. coli*.

A continuación, se procedió a la hibridación entre el ADN de la membrana con la sonda. Para realizar este proceso, primero se incubaron las membranas en solución de hibridación “*Rapid hyb buffer*” (Amersham-Pharmacia) (5x SSC, N-laurilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, reactivo de bloqueo 1%). Después del periodo de pre-hibridación de hora y media a 68°C, se elimina la solución anterior y se añade nueva solución de hibridación conteniendo la sonda marcada. La nueva solución se incuba durante 12 horas a 68°C. Tras concluir la hibridación, se procede a eliminar la sonda unida inespecíficamente lavando las membranas, primero, con una solución de baja astringencia (2xSSC y 0'1% SDS) y, por último, de alta astringencia (0'2xSSC y 0'1% SDS).

Finalmente, se procede al revelado por colorimetría donde, primero, se añaden anticuerpos frente a la dioxigenina unidos a fosfatasa alcalina los cuales se unirán a la sonda marcada. Para revelar donde se encuentra la sonda unida al ADN se añade el substrato de la fosfatasa alcalina, nitroazul de tetrazolio (NBT/BCIP) lo que dará lugar a un precipitado azul intenso.

2.13.2 Southern blot

Esta técnica está basada en la descrita por Southern (1975). En este trabajo se ha utilizado para la identificación genotípica de los clones recombinantes obtenidos durante los procesos de interrupción y reemplazamiento génico.

Se han utilizado sondas obtenidas por PCR y fragmentos generados por digestión con enzimas de restricción del ADN recombinante los cuales se separaron por electroforesis. El ADN se transfirió desde los geles de agarosa a membranas Hybond-N⁺, utilizando la variante “en seco” del proceso descrito por Southern (1975), durante un mínimo de 6 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN transferido a la membrana se fijó con luz ultravioleta durante 3 minutos. A continuación, se siguieron los mismos pasos de marcaje de la sonda, hibridación y revelado descritos en el apartado anterior. Las sondas utilizadas son las descritas en la tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos y fragmentos de restricción utilizados para obtener ADN utilizado como sonda en los Southern blot.

Sondas obtenidas por PCR				
Sonda	Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'		
<i>natPK</i>	PKS1Ta	TGAATTCGTCCTCGAACAGGCGCCG		
	PKST1b	AAAAAGCTTGGCGACGACCTCGGTGATCG		
<i>natAN</i>	COA1547	TTTAAGCTTGGTGTCTCGGCGTCGAT		
	COA318D	AGAATTCGTCACCGGCGAGGGCCGT		
SS-1	RESS-1	TGAACTAGTGGATCGTGGTGCTGGAGA		
	RESS-2	AGTATGCATCAGAGGTCCCAGGTGTTCC		
SS	SSTUfw	AAGGATCCTCCTTCTGGGAGCGGCG		
	SSTUrv	AGAATTCCTCGACCGTGGATCTCGGC		
REAM-L1	READHL-1	GTCGATATCTGTGGTGGTTCGTAGCCGC		
	READHL-2	ATAGGATCCAGGCACTGCGCGGTTTCA		
Sondas obtenidas por digestión				
Sonda	Plásmido	Gen	Digestión	Tamaño

Apramicina	pEFBAorit	Cassette de resistencia a apramicina	EcoRI	1'5 Kb
Eritromicina	pAGE	Cassette de resistencia a eritromicina	KpnI	1'7 kb

2.14 Amplificación de ADN por PCR

2.14.1 Oligonucleótidos cebadores

Para la obtención de los oligonucleótidos cebadores que permitirían la amplificación de fragmentos específicos de ADN, se utilizó la secuencia nucleotídica obtenida tras la secuenciación del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 por la empresa Lifesequencing SL (Valencia). Para la obtención de unos cebadores óptimos se tuvo en cuenta la cantidad de G+C, la temperatura de anillamiento, evitar la formación de apareamientos intercatenarios entre un mismo cebador o con el otro miembro de la pareja y, además, la formación de horquillas intracatenarias.

A continuación, se presenta una tabla con todos los cebadores utilizados en este trabajo para la obtención de los distintos mutantes de los genes de la ruta y para la expresión de dichos genes (Tabla 11).

Tabla 11. Cebadores utilizados en el presente trabajo.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Construcción	Función
Mutantes en los genes estructurales del <i>cluster</i> de nataxazol			
REAS-1	TGT <u>GATATC</u> TTGAGGTACGCCTCCTTGA		
REAS-2	AAGGATCCATCCTGGACGATCTGGTC	pΔnatAN	Mutante por reemplazamiento de <i>natAN</i>
REAS-3	TGT <u>ATGCATT</u> TACGGGGGTGTCATGAGG		
REAS-4	TG <u>ACTAGT</u> CACGACAACAGGCACGAC		
READHL-1	GTCGATATCTGTGGTGGTCGTAGCCGC		
READHL-2	ATAGGATCCAGGCACTGCGGGTTTCA	pΔnatAM-L1	Mutante por reemplazamiento de <i>natAM</i> , <i>natAC1</i> y <i>natL1</i>
REAMPL-3	GTCATGCATAGCGAGAAGACCAGCTTG		

REAMPL-4	AGGACTAGTGGTTGAGTACCGCCTACT C		
PKS1Ta	TGAATTCGTCCTCGAACAGGCGCCG	p Δ natPK	Disrupción de <i>natPK</i>
PKS1Tb	AAAAAGCTTGGCGACGACCTCGGTGAT CG		
Expresión de genes estructurales del <i>cluster</i> de nataxazol			
1519fw	AAGGAATTCTAGACCGTTCACCAGGTAGGCG	pnatAM-AC1t	Expresión conjunta de <i>natAM</i> y <i>natAC1</i>
ACP _{rv}	AATGATATCTCCGAGCAGGAAGGCTGA	pnatAM-L1-S ϵ	
PAMAC _{rp}	ATAGGATCCAATTGCCATTCGCCAGGACAC G	pnatAC1-St	Expresión conjunta de <i>natAC1</i> , <i>natL1</i> y <i>natS</i>
PAMAC _{cp}	TGTGAATTCTAGAGTCGGCGGTGTAGACGGT	pnatAM-L1-S ϵ	
COA318F	TGAATTCCTCGGCCGCAAGCACAGCACC	pnatL2-X	Expresión conjunta de <i>natL2</i> y <i>natX</i>
COA1126A	AAAAAGCTTCTCCCGCGACTGCGCGCG		
1525fw	AAAGGATCCAGGACGAGGACTGGGACAAG	pnatX	Expresión de <i>natX</i>
1525rv	AGTGAATTCGATGACGGCGATGGGTTC		
PKSCOMP1	AAGGATCCGTCCCGTTCGTTCCAC	pnatPK	Expresión de <i>natPK</i>
PKSCOMP2	CGAATTCCTGTACCTCCAGCCGAAC		
1524-PKSfw	TTAGGATCCGGCACACACGAGGGAGAT	pnatL2-PK	Expresión conjunta de <i>natL2</i> , <i>natX</i> y <i>natPK</i>
Expresión heteróloga del <i>cluster</i> 3			
NATAR1	TATAACTAGTGCGGCTACATCGCCTACTT	pNATAR	Expresión heteróloga del <i>cluster</i> 3
NATAR2	TATAGGATCCACGAGTACCCGGTGACCA		
NATAR3	TATAGGATCCACACGACGTCAGTCGGACAC	pNATAR	Expresión heteróloga del <i>cluster</i> 3
NATAR4	TATACTCGAGTCACCATTCCGATCCTCTC		
mutAMd	CAGTACCGGGTCGACCGCTTCCGCGGGAAC GCGCAGGGCGCGGGTATGCCATGTACCTC TCAGC	pNATAR Δ AM	Expresión heteróloga del <i>cluster</i> 3
mutAMrv	CTCGCTGCGCACCTCCGCGCCGACCGCGCC CGGAGCGGCGTGATGGTCGCTTCCTTCAA TTCCA		

Mutantes en los genes reguladores del *cluster* de nataxazol

RETetR27-1	AGAGGATCCGGCGTCGATGATCTTCTCTG		
RETetR27-2	AGAGATATCCTCCCTGGCAATGAGTGAAT	p Δ natR3	Mutante por reemplazamiento de <i>natR3</i>
RETetR27-3	AGA <u>ACTAGT</u> GTGGTCTGGCAGCCCTTC		
RETetR27-4	AGAATGCATGCAGGAGACGGAGTTCTTCC		
RESARP29-1	TATAGATCTCTTCGGCTGTCAGGGCT		
RESARP29-2	ATAGATATCGTCGGATTCCTGCGAAGAGT	p Δ natR4	Mutante por reemplazamiento de <i>natR4</i>
RESARP29-3	AAA <u>ACTAGT</u> ACTGGGGCGCTGTTCCGT		
RESARP29-4	AAAATGCATGGCGGGCGACCTCTTCTCCT		

Expresión de los reguladores de la ruta de nataxazol

SARP04fw	ATAGGATCCATCACCTCGGAGTGCGGC	pSETeSARP04	Expresión de <i>orf-4</i>
SARP04rv	ATAGAATTCACAGTCCGTGAGCACCTTCC		
LuxR09-2fw	AAAGAATTCACGAGAAGGTGTTTCGGCGG	pnatR1	Expresión de <i>natR1</i>
LuxR09-2rv	AAAGATATCAGAACCAAGGCGGCACGT		
TetR14afw	ATGAGATCTGCATGGTCGGTTCTGACA	pnatR2	Expresión de <i>natR2</i>
TetR14arv	ATGGAATTCGGCACTTCAGCCTGTTC		
TetR27fw	TAAGAATTCGGTTCGGCTGGAGGTACA	pnatR3	Expresión de <i>natR3</i>
TetR27rv	TGAGGATCCAGTGTTGACCATGCCTTGC		
SARP29fw	AAGAGATCTGCGTGCGGTAGAGATTCTG	pnatR4	Expresión de <i>natR4</i>
SARP29rv	AATGAATTCGGAGGCGGGTAATACTGA		

Mutantes en el *cluster* 25 “coelibactina” y *cluster* 10 de enterobactina

RESS-1	TGA <u>ACTAGT</u> GGATCGTGGTGCTGGAGA		
RESS-2	AGTATGCATCAGAGGTCCCAGGTGTTCC	p Δ SS	Mutante por reemplazamiento de <i>cf54_20720</i>
RESS-3	AGTGGATCCTGTGCTGCGTACGGTCAT		

RESS-4	ATAG <u>ATATCC</u> GACCTCGACGAGCACAT		
COA724	TGA <u>ATTCG</u> TACCGCACGGCGACGAT	pΔICS-entb	Disrupción de <i>cf54_12675</i>
COA188C	AAAA <u>AGCTT</u> CACGACCCACTCGCCGTC		
Expresión de genes del cluster 25 “coelibactina”			
SSTUfw	AAGGATCCTCCTTCTGGGAGCGGCG	pCoe-SS	Expresión de <i>cf54_20720</i>
SSTUrv	AGAATTCCTCGACCGTGGATCTCGGC		
4263MTfw	ATAG <u>GATCC</u> AGGCTGGACCCGTCGCTG	pCoe-MT	Expresión de <i>cf54_20690</i>
4263MTrv	AAAGA <u>ATTCG</u> GCGATGAACGGCACCAC		
4258boxifw	AAA <u>AGATCT</u> GCAGCACGAGGAGGGGAT	pCoe-Oxi	Expresión de <i>cf54_20685</i>
4258boxirv	AAAGA <u>ATTCG</u> GTGTCGGGGCTTGTCAT		
4259P450fw	ATAG <u>GATCC</u> CGCCACCCCTCTCCTCCC	pCoe-citp450	Expresión de <i>cf54_20695</i>
4259P450rv	ATAGA <u>ATTCT</u> CCACGGGCTGTCCGGCAC		
Otros cebadores utilizados			
ACPsintfw	AAAGAATTCCGCCAGATGCCCTGCTCG		<i>natS</i>
ACPsintrv	AAACAATTGCCCCACCTCTTCCCCCA		
Tsrfw	AGTCTAGAAATACTTCATATGCGGGGATC	pSETeTe	Gen de resistencia ala tiostreptona
Tsrrv	TATCTAGAAACAGAGGGCGCTTATCGG		
M13fw	GTAAAACGACGGCCAG		Primers universales
M13rv	CAGGAAACAGCTATGAC		
Aprafw	TCATCGGTCTCAGCTTCTCAACC		<i>Cassette</i> de resistencia a apramicina
Aprarv	ATGCAGGAAGATCAACGGATCT		
ApraCfw	AAGTGCTTGACATTGGGG		<i>Cassette</i> de resistencia a apramicina hacia fuera
ApraCrv	TCATTCTGTGGGCCGTAC		
pWE15fw	ACCGCATTAAAGCTTATCG		Cósmido pWE15

2.14.2 Condiciones de la reacción

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa que se siguieron fueron iguales para todas las reacciones realizadas, manteniendo las condiciones óptimas recomendadas por la casa comercial de las polimerasas utilizadas. Todas las reacciones tuvieron un volumen final de 50 μl donde se utilizó 1 μl de ADN molde con una concentración inicial de 400 – 500 ng/ μl y 2'5 μl de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la amplificación de los fragmentos que darán lugar a las construcciones para realizar los diferentes mutantes y para las expresiones de los diferentes genes se utilizó la polimerasa “*Herculase II Fusion DNA Polymerase*” (Aligent Technologies). Las condiciones de la reacción fueron las recomendadas por la casa comercial: dNTPs 0'5 μl de una solución inicial de 100 mM, 1'25 μl de cada cebador partiendo de una solución con una concentración de 10 μM y finalmente, 1 μl de polimerasa (2 u/ μl).

Para la comprobación de los mutantes resultantes se utilizó la polimerasa “*DreamTaq ADN Polymerase*” (Thermo Scientific). Las condiciones de la reacción también fueron las recomendadas por la casa comercial para una óptima reacción: 5 μl de dNTPs a una concentración de 2 mM, 1 μl de cada cebador partiendo de una concentración de 20 μM y 1 μl de polimerasa (1'25 u/ μl).

2.14.3 Condiciones del programa de amplificación

El programa de amplificación utilizado para la amplificación de los distintos fragmentos de ADN es el que a continuación se muestra:

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	5 minutos
Amplificación: 40 ciclos		
Desnaturalización	98°C	60 segundos

Anillamiento*	57°C - 64°C	30 segundos
Extensión**	72°C	Lo recomendado para cada polimerasa y para cada tamaño del fragmento.
Extensión final**	72°C	Lo recomendado para cada polimerasa

*Cada pareja de cebadores diseñados tienen unas temperaturas de anillamiento de entre 57 y 64°C. En cada ocasión se utilizó la temperatura de anillamiento adecuada.

** La *Herculase II Fusion DNA Polymerase* amplifica 1 kb cada 30 segundos y la *DreamTaq ADN Polymerase* amplifica 1 kb por minuto.

2.15 Secuenciación de ADN

2.15.1 Secuenciación y análisis del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176

La secuenciación del genoma completo de *Streptomyces* sp. Tü 6176 fue realizado por *Lifesequencing* S.L (Valencia). El ADN empleado se obtuvo sin apenas fragmentación, con una pureza superior a 1'8 en la tasa ADN/proteína y una cantidad total de 300 ng. La secuenciación se realizó por pirosecuenciación a través de la plataforma “*Science-Roche*”. Para el ensamblaje *de novo* se utilizó el programa bioinformático “*Newbler assembler*” versión 2.8 (Margulies *et al.*, 2005). La anotación de la secuencia fue realizada por el sistema PGAAP (Prokaryotic Genomes Automatic Anotation Pipeline) (Angiuoli *et al.*, 2008). La secuencia del genoma completo de *Streptomyces* sp. Tü 6176 fue depositada en DDBJ/EMBL/GenBank, número de acceso JFJQ01000000 que está constituida por las siguientes secuencias: JFJQ01000001 hasta JFJQ01001265. El análisis de estas secuencias se realizó utilizando el programa de predicción de agrupamientos génicos de metabolitos secundarios antiSMASH 2.0 (Blin *et al.*, 2013) en combinación con el programa BLAST SEARCH del NCBI (Altschul *et al.*, 1997).

Por otro lado, para el análisis de los dominios y módulos que conforman las PKSs y las NRPSs se utilizó el software online: PKS/NRPS Analysis (<http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>)

2.15.2 Secuenciación y análisis de las diferentes construcciones y de los cósmidos de la genoteca.

La secuenciación de los extremos de los cósmidos de la genoteca de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se realizó a través de *Macrogen* utilizando un secuenciador automático capilar. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) y el programa BLAST SEARCH del NCBI.

La secuenciación de los productos de PCR así como de las construcciones se realizaron en la Unidad de Secuenciación de la Universidad de Oviedo que utiliza un secuenciador automático capilar de ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems) y la empresa *Macrogen*. El análisis de las secuencias se realizó igual que la de los cósmidos.

El cósmido 6E8 se secuenció a través de la empresa *Macrogen* obteniendo la secuencia completa. La secuencia del cos6E8 fue depositada en DDBJ/EMBL/GenBank, número de acceso LN713864.

2.16 Obtención de los mutantes

Para la obtención de mutantes, se describe en la literatura distintas estrategias a seguir. En el trabajo que aquí se presenta se siguieron dos estrategias diferentes: generación de mutantes por reemplazamiento génico y generación de mutantes por interrupción (o *disrupción*: término derivado del inglés *disruption*) génica.

2.16.1 Generación de mutantes por interrupción génica.

Esta estrategia se basa en interrumpir el gen con un plásmido evitando de este modo su correcta expresión. Para ello, se amplifica un fragmento interno del gen que se quiere interrumpir. Este fragmento se clona en un plásmido replicativo en *E. coli* pero no en *Streptomyces* spp. y que presente una marca de selección para *Streptomyces* spp., en este caso será el gen de resistencia al antibiótico apramicina. La construcción obtenida se transfiere a *Streptomyces* spp. por el método de conjugación. Se produce una recombinación homóloga entre el fragmento de la construcción y el gen, de modo

que tras la recombinación, el plásmido queda inserto dentro del genoma interrumpiendo el gen y evitando su expresión (Fig. 14).

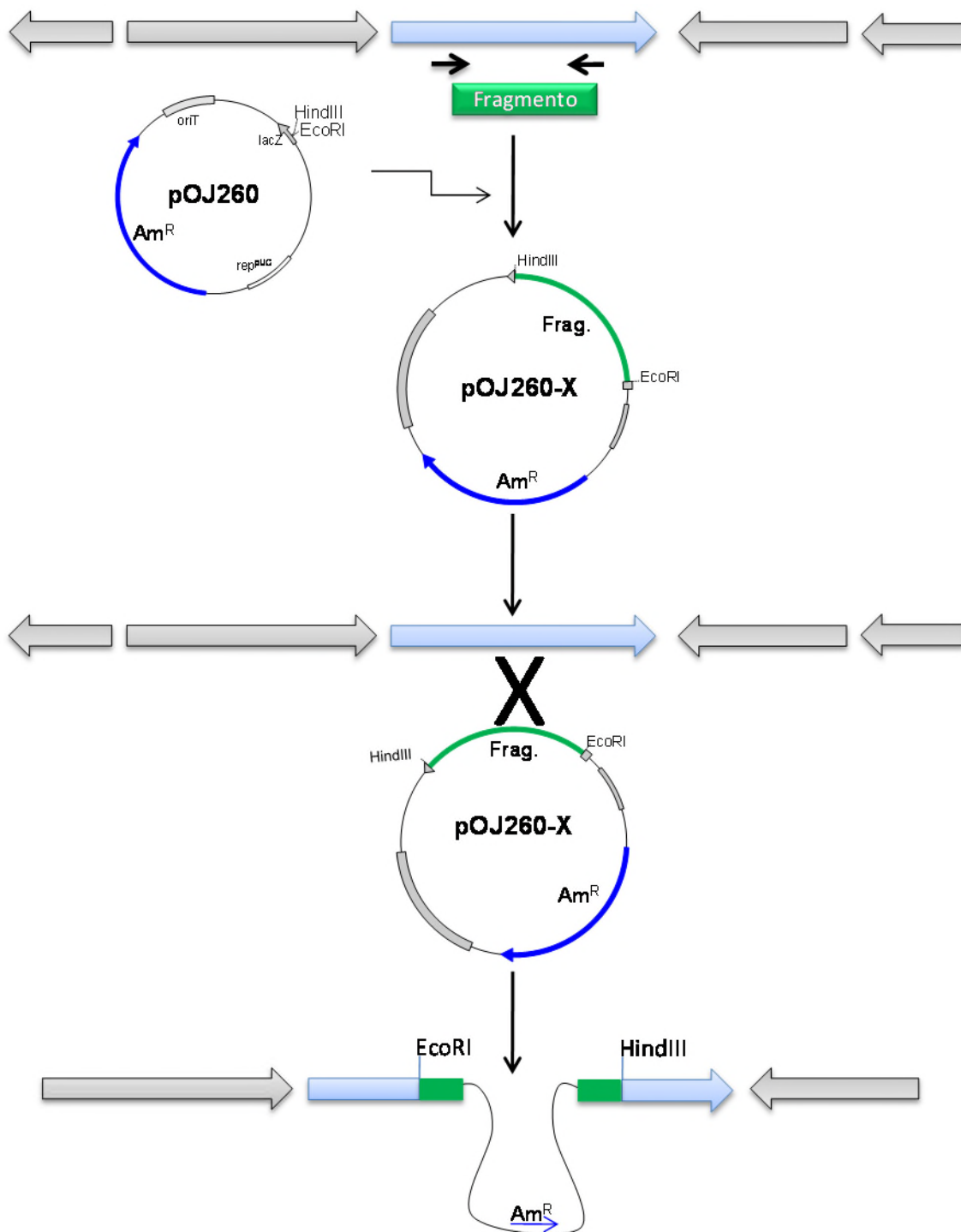


Figura 14. Esquema del proceso de interrupción-disrupción génica.

2.16.1.1 Construcción de plásmidos para interrupción génica

Para la generación de estos plásmidos se clonaron directamente en el plásmido suicida pOJ260 (Tabla 8 y Fig. 14 y 15b) utilizando las dianas HindIII y EcoRI. Las construcciones se secuenciaron para verificar que los fragmentos no presentaban errores en su secuencia y poder obtener los mutantes por interrupción. A continuación, se describen cada una de las diferentes construcciones.

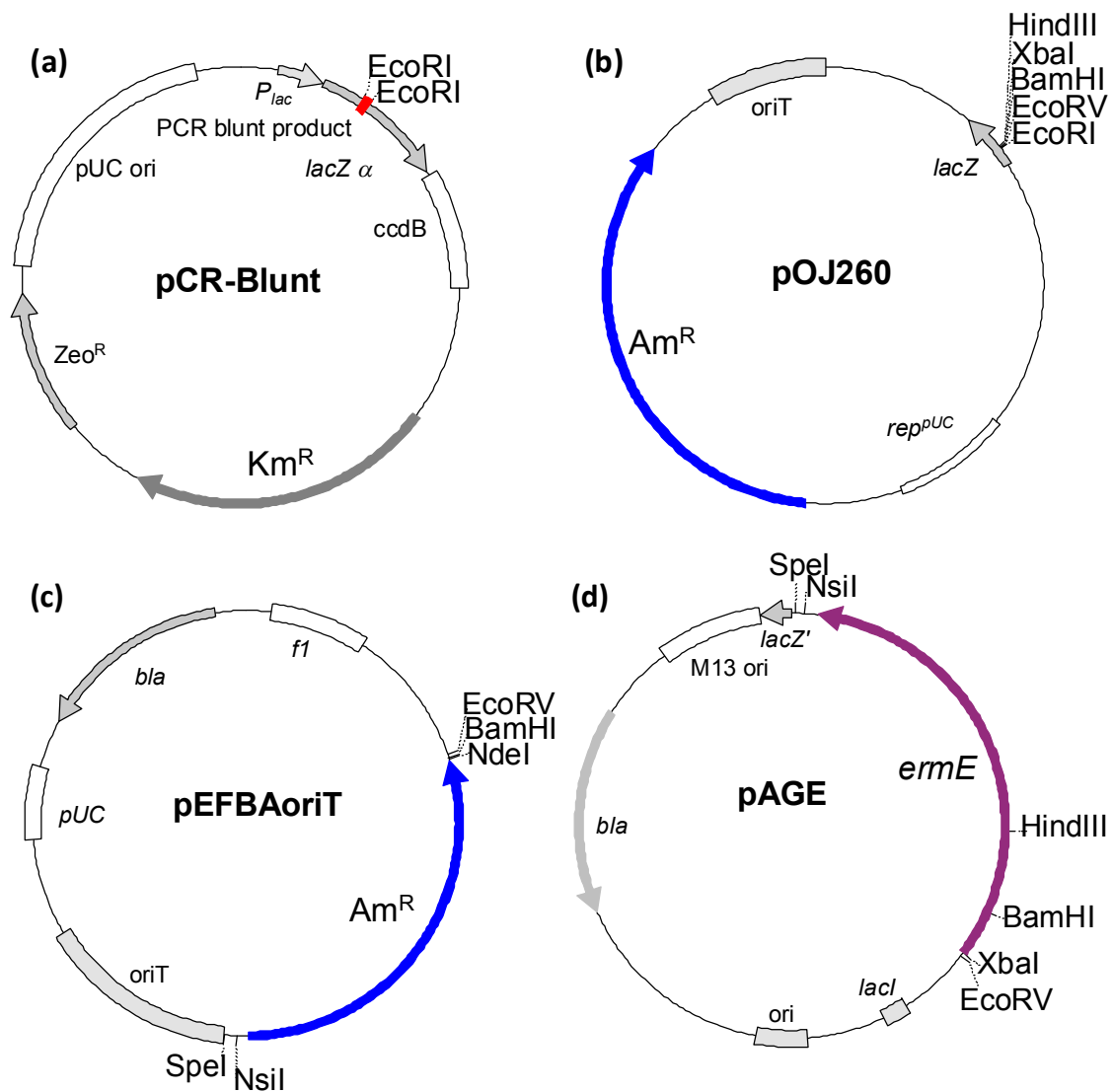


Figura 15. Vectores: a) pCR-Blunt, b) pOJ260, c) pEFBAoriT, d) pAGE,

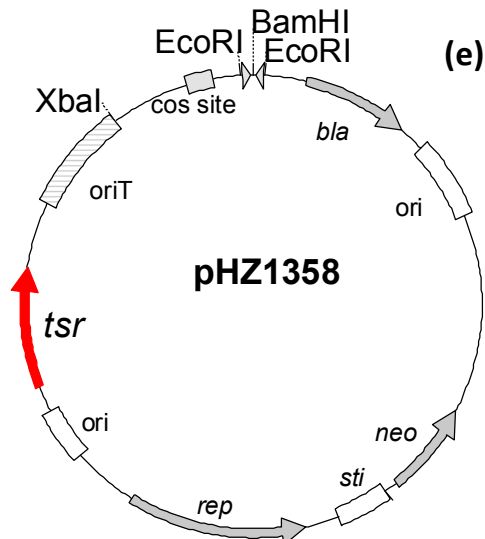


Figura 15 (continuación). e) pHZ1358

a) Plásmido para la interrupción de *natPK*, p Δ natPK

Para la interrupción de la poliketido sintasa tipo I iterativa del agrupamiento génico del nataxazol, se construyó el plásmido **p Δ natPK** (Fig. 16a). Para ello se amplificó un fragmento interno del gen *natPK* de 1100 pares de bases (bp) utilizando los cebadores PKS1ta y PKS1Tb (Tabla 11) y ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. Tü 6176 como molde. De esta forma se obtuvo el mutante Δ natPK.

b) Plásmido para la interrupción de una isocorismato sintasa, p Δ ICS-entb

Por otro lado, se obtuvo el plásmido **p Δ ICS-entb** (Fig. 16b) con el fin de interrumpir la isocorismato sintasa (*cf54_12675*) del agrupamiento génico 10 el cual presenta una alta homología con el cluster de biosíntesis de enterobactina descrito en otros microorganismos incluyendo *Streptomyces* spp. Dicho plásmido se construyó amplificando un fragmento interno al gen con los *primers* COA724 y COA188C obteniéndose un fragmento de 900 bp. De esta forma se pudo obtener el mutante Δ ICS.

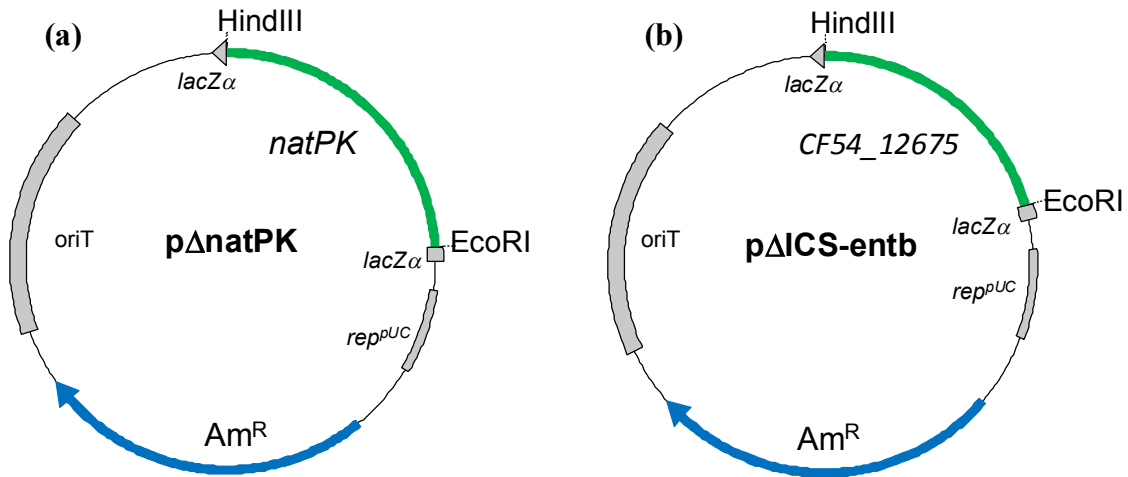


Figura 16. a) Plásmido pΔnatPK y b) Plásmido pΔICS-entb.

2.16.2 Generación de mutantes por reemplazamiento génico.

El reemplazamiento génico se basa en la sustitución de un fragmento de ADN o de un gen completo por un fragmento de ADN que le confiera a la cepa recombinante un fenotipo diferente tal como resistencia a un antibiótico, síntesis de algún aminoácido, etc. Para que este proceso ocurra primero hay que amplificar dos fragmentos de ADN adyacentes al fragmento que se desea reemplazar. Estos fragmentos se clonan en un plásmido flanqueando al fragmento de ADN sustitutivo, en nuestro caso un marcador de resistencia. A continuación, se transforma la cepa original con el plásmido para que ocurra una doble recombinación que permita la sustitución del gen de interés por el fragmento deseado (Fig. 17).

En el presente trabajo para realizar este proceso se utilizaron varios plásmidos. En primer lugar, los fragmentos amplificados tienen un tamaño de alrededor de 2000 bp. En todos los casos, los fragmentos utilizados contienen entre 70 y 100 bp que corresponden al gen que se desea reemplazar. Tras la amplificación, se clonaron en el plásmido comercial pCR-Blunt (Fig. 15) para secuenciar el fragmento. A continuación, los fragmentos se clonaron en los plásmidos pEFBAoriT (Fig. 15), en caso de que se quisiera reemplazar un gen por el gen de resistencia a apramicina, o en el pAGE (Fig. 15), en caso de que se deseará utilizar el gen de resistencia a eritromicina.

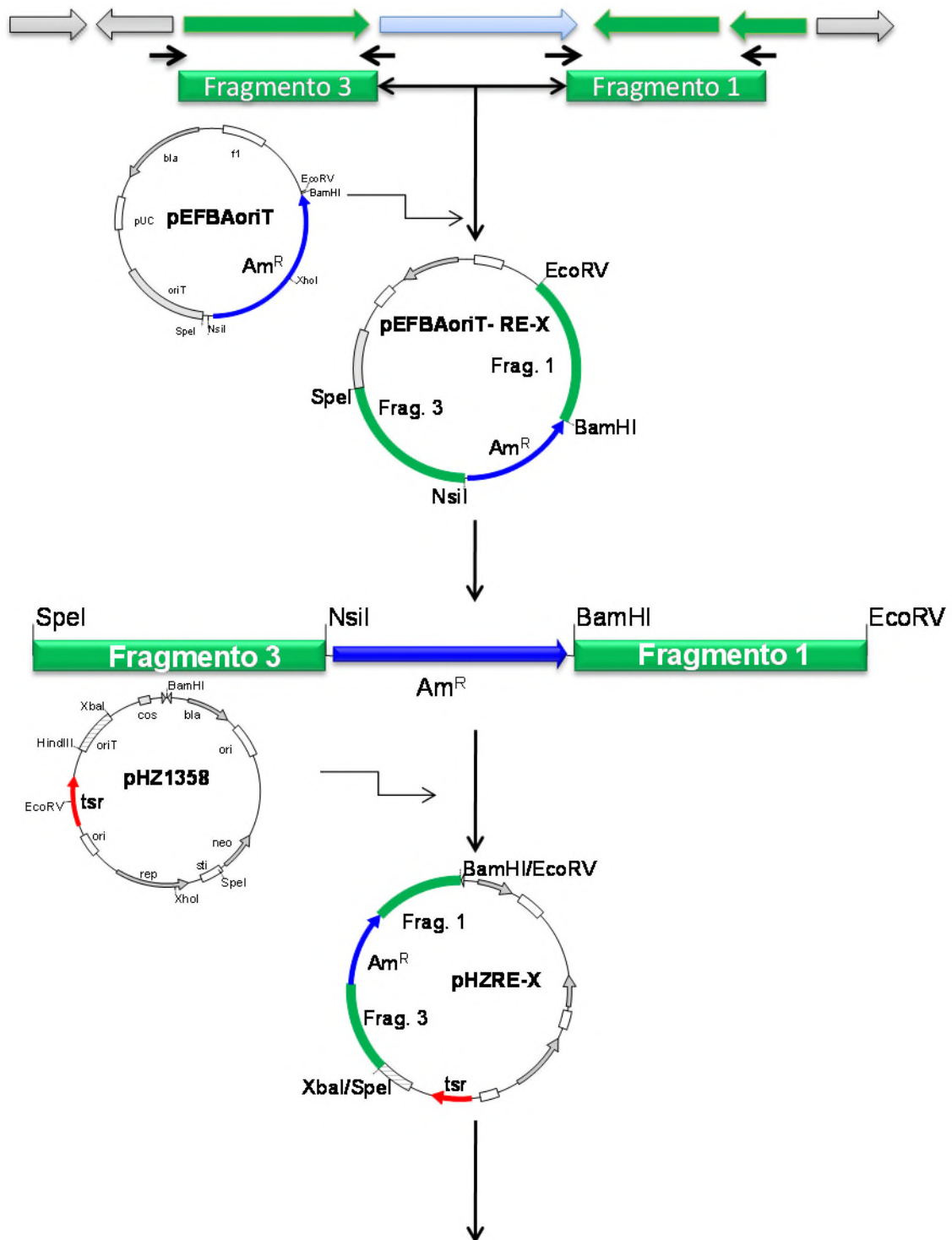


Figura 17. Esquema del proceso de reemplazamiento génico realizado en este trabajo.

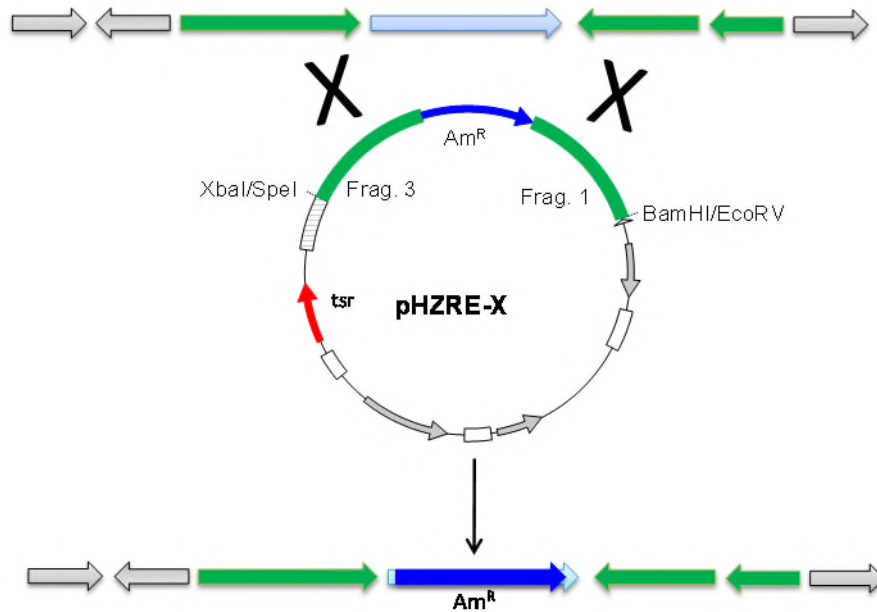


Figura 17 (continuación). Esquema del proceso de reemplazamiento génico realizado en este trabajo.

En todos los casos, el fragmento que se inserta delante del gen de resistencia se clona utilizando las dianas SpeI-NsiI mientras que el fragmento que se inserta detrás del gen de resistencia se clonó con las dianas EcoRV-BamHI (o NdeI). Tras obtener estas construcciones, se digirió el plásmido SpeI-EcoRV obteniendo un fragmento de un tamaño de alrededor 6000 bp que contuviera el gen de resistencia flanqueado por ambos fragmentos. Este fragmento se introdujo en el plásmido pHZ1358 (Fig. 15) el cual se digiere primero BamHI y se trata para obtener extremos romos de tal forma que sea compatible con EcoRV, y posteriormente se digirió XbaI para dejar el otro extremo compatible con SpeI. Se utilizó este plásmido porque presenta una segunda marca de resistencia (gen de resistencia a tioestreptona) que nos permite saber si ha ocurrido un sobrecruzamiento o los dos deseados. Esta resistencia desaparece cuando han ocurrido ambas recombinaciones homologas y se ha producido el reemplazamiento. Tras obtener la construcción, se procedió a transformar la cepa de *E. coli* ET12567 (pUB307) a través de la cual se procedió a realizar la conjugación para obtener el mutante deseado en *Streptomyces* sp. Tü 6176.

2.16.2.1 Construcción de plásmidos para el reemplazamiento génico

a) Plásmido para el reemplazamiento del gen *natAN*: p Δ natAN

Para construir el plásmido **p Δ natAN** (Fig. 18a), y así poder sustituir la antranilato sintasa del agrupamiento génico de biosíntesis de nataxazol, se amplificaron dos fragmentos a partir de cos6E8. Para la amplificación del fragmento REAS-1 con un tamaño de 2000 bp se utilizaron los cebadores REAS-1 y REAS-2 (Tabla 11). Este fragmento incluye el gen *natAL* y parte del gen *natP*. Mientras que para amplificar el segundo fragmento denominado REAS-3 de 1843 bp se utilizaron los *primers* REAS-3 y REAS-4 (Tabla 11). Este fragmento contiene los genes *natIS* y *natDB*. En esta ocasión, como en todos los mutantes de los genes pertenecientes al agrupamiento génico del nataxazol, se clonaron flanqueando el gen de resistencia a apramicina en el pEFBAoriT y de ahí, se siguieron los pasos descritos anteriormente para así obtener la construcción p Δ natAN y finalmente el mutante Δ natAN. Este mutante es resistente a apramicina y tiene delecionado el gen correspondiente a la antranilato sintasa *natAN*.

b) Plásmido para el reemplazamiento de los genes *natAM*, *natACI* y *natL1*: p Δ natAM-L1

Para obtener el plásmido **p Δ natAM-L1** (Fig. 18b), primero se amplificó un fragmento de 2139 bp utilizando los oligonucleótidos READHL-1 y READHL-2 el cual se clonó en pEFBAoriT digerido EcoRV-BamHI. Este fragmento contiene el gen *natDB* y parte del gen *natIS*. Por otro lado, para la amplificación del segundo fragmento con un tamaño de 1644 bp se utilizaron los oligonucleótidos REAMPL-3 y REAMPL-4 clonándose en la construcción anterior digerida SpeI-NsiI. Este fragmento comprende el gen *natS* y parte de la región intergénica que se encuentra entre *natS* y *natL2*. Tras clonarse ambos fragmentos en pEFBAoriT se siguieron los pasos anteriormente descritos para la obtención del mutante Δ natAM-L1 con las *orfs* *natAM*, *natACI* y *natL1* delecionadas.

c) Plásmido para el reemplazamiento del gen regulador *natR3*: p Δ natR3

El plásmido **p Δ natR3** (Fig. 18c) se construyó para la obtención del mutante Δ natR3 siguiendo los mismos pasos que los casos anteriores. En la amplificación del fragmento 1 con un tamaño de 2079 bp se utilizaron los cebadores RETetR27-1 y RETetR27-2, que se clonó EcoRV-BamHI y comprende todo el gen *natT4*. Para amplificar el fragmento 3 se utilizaron RETetR27-3 y RETetR27-4, se clonó SpeI-NsiI y corresponde a 2087 bp de *natPK* que codifica la PKS tipo I iterativa implicada en la biosíntesis de nataxazol.

d) Plásmido para el reemplazamiento del gen regulador *natR4*: p Δ natR4

El plásmido **p Δ natR4** (Fig. 18d) se construyó amplificando el primer fragmento de un tamaño de 2102 bp con los cebadores RESARP29-1 y RESARP29-2 el cual comprende *natAC2* y parte del gen *orf+1* que codifica una sintasa de ácidos grasos poliinsaturados. Para amplificar el fragmento 3 de 2179 bp, el cual contiene el gen *natT4*, se utilizaron RESARP29-3 y RESARP29-4.

e) Plásmido para el reemplazamiento génico de *cf54_20720* del *cluster 25*: p Δ SS

A diferencia de en los cuatro casos anteriores para la construcción del plásmido **p Δ SS** (Fig. 18e) el ADN molde utilizado fue el ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. Tü6176. El ADN sustitutivo en este caso corresponde al gen de resistencia a eritromicina en vez de apramicina por lo que se utilizó el vector pAGE. Se clonó el primer fragmento SpeI-NsiI después de haber amplificado 2053 bp usando los *primers* RESS-1 y RESS-2. El segundo fragmento, 2337 bp amplificadas con RESS-3 y RESS-4, se clonó en el pOJ260 digerido EcoRV-BamHI. A continuación, se subclonó un fragmento XbaI-EcoRV adyacente al gen de resistencia a eritromicina en el vector pAGE utilizando las mismas dianas. Tras esto, se rescató un fragmento SpeI-EcoRV y se prosiguió de la misma forma que en los casos anteriores para obtener el mutante Δ SS.

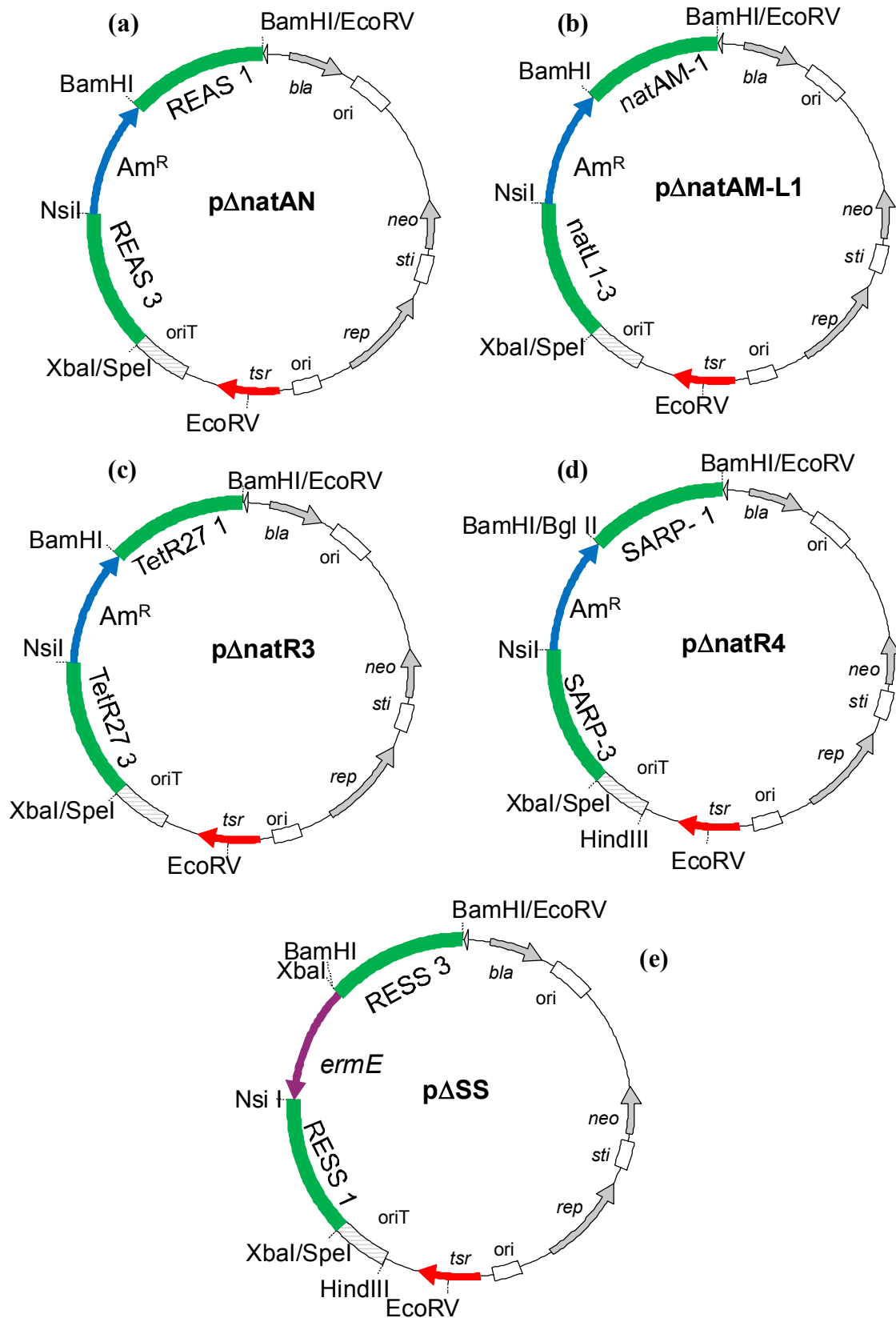


Figura 18. Plásmidos: a) p Δ natAS, b) p Δ AM-L1, c) p Δ natR3, d) p Δ natR4, e) p Δ SS

2.17 Expresión de genes

Durante el presente trabajo se ha llevado a cabo la expresión heteróloga o sobreexpresión de diferentes genes. La sobreexpresión de un gen se basa en la introducción de una o varias copias extra de dicho gen en el organismo silvestre mientras que la expresión heteróloga, tal y como describieron Hopwood y colaboradores en 1985, se basa en la expresión de un gen o de varios genes de una ruta biosintética de un organismo en otro organismo no productor.

Para ello, se han utilizado tres plásmidos. Uno de ellos es el vector pEM4T (Fig. 19a), un plásmido bifuncional y de alto número de copias. Los otros dos plásmidos, **pSETec** (Fig. 19d) y **pSETeTc** (Fig. 19c), son derivados del vector integrativo pSET152 (Fig. 19b) y han sido construidos específicamente para este trabajo.

2.17.1 Construcción de los vectores pSETec y pSETeTc

La diferencia existente entre el vector pSET152 y pSETec radica en la presencia del promotor del gen de resistencia a eritromicina (*ermE**p) lo que permite la expresión de genes bajo el control de un promotor constitutivo. Para clonar dicho promotor en el plásmido se linearizó pSET152 digiriéndolo con la diana única XbaI. En este vector se subclonó un fragmento con el promotor obtenido del vector pEM4T con una digestión NheI-XbaI, obteniéndose de esta manera pSETec el cual mantiene las mismas dianas únicas que el vector pSET152.

Con respecto a la construcción del vector pSETeTc se clonó el gen de resistencia a tiosstreptona en el plásmido pSETec. Para ello, se diseñaron una pareja de cebadores denominada Tsrfw y Tsrrv (Tabla 11) en cuyos extremos 5' añadimos la diana XbaI para poder realizar una clonación dirigida. Se utilizó como ADN molde pEM4T y el fragmento de 950 bp obtenido se clonó en el vector pOJ260 (Fig. 15b). A partir de esta construcción se obtuvo el fragmento que contiene el gen de resistencia a tiosstreptona con una digestión XbaI que fue posteriormente subclonado en pSETec digerido NheI, obteniéndose finalmente pSETeTc.

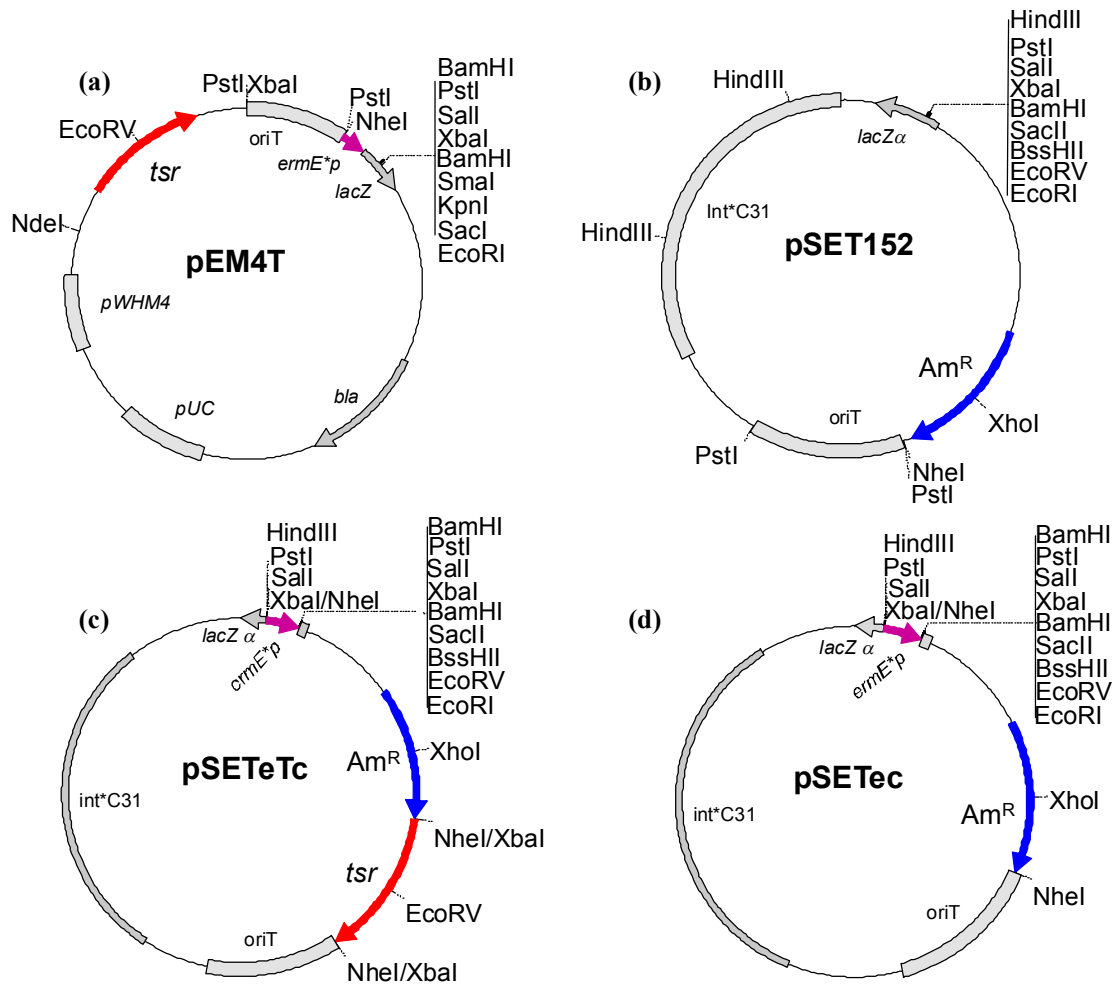


Figura 19. Vector: a) pEM4T, b) pSET152, c) pSETeTc, d) pSETec.

2.17.2 Construcción de plásmidos para la expresión de los diferentes genes.

En este trabajo tanto para la expresión de un gen en solitario o de varios genes juntos se siguió siempre la misma estrategia.

Primero, se diseñaron *primers* que flanqueaban el gen (o el conjunto de genes) añadiéndole al extremo 5' una diana de restricción para poder realizar la clonación dirigida. Normalmente, la diana del cebador diseñado al inicio del gen fue BamHI mientras que la del cebador diseñado al final EcoRI.

A continuación, se clonó el fragmento en pEM4T, pSETec y/o pSETeTc, bajo el control del promotor de gen de resistencia a eritromicina (*ermE**p). Seguidamente, se secuenció el gen para verificar que no hubiera ningún error en la secuencia que pudiera impedir la expresión del gen.

Posteriormente, se introdujo la construcción en la cepa de *E. coli* ET12567 (pUB307) para, finalmente, proceder a realizar la conjugación con la cepa de *Streptomyces* correspondiente.

2.17.2.1 Construcción de plásmidos para la expresión de genes pertenecientes al *cluster* del nataxazol.

En el presente trabajo la mayoría de los genes en solitario o en conjunto pertenecientes al agrupamiento génico del nataxazol se amplificaron utilizando el cósmido cos6E8 el cual contiene todo el agrupamiento génico.

a) Plásmido pnatX

natX es una posible *orf* que no presenta homología con ningún gen conocido por lo que no se le puede asignar una posible función. Para poder determinar su función se procedió a su expresión heteróloga en *S. albus* J1074 y *Streptomyces* sp. NTK 974. Para ello, se amplificó por PCR un fragmento de 600 bp con los primers 1525fw y 1525rv y se clonó en el vector pEM4T digerido BamHI-EcoRI obteniéndose el plásmido **pnatX** (Fig. 20a).

b) Plásmido pnatL2-X

natL2 codifica una AMP sintetasa-ligasa y se procedió a su expresión heteróloga junto con *natX* en *S. albus* J1074 y en *Streptomyces* sp. NTK937 amplificando un fragmento de 2511 bp con los cebadores COA1126A y COA318F. A continuación, se digirió el fragmento BamHI-EcoRI y se clonó en el plásmido pEM4T, digerido con los mismos enzimas, dando lugar al plásmido **pnatL2-X** (Fig. 20b).

c) Plásmido pnatPK

La PKS tipo I iterativa implicada en la biosíntesis de nataxazol, *natPK*, no solo se inactivo sino que también se procedió a su expresión heteróloga en *S. albus* J1074 y a su sobreexpresión en *Streptomyces* sp. Tü 6176. Para su expresión se procedió a amplificar las 6000 bp que conforman el gen con los *primers* PKSCOMP-1 y PKSCOMP-2 utilizando como ADN molde el ADN cromosómico. A continuación se digirió el

producto de la PCR BamHI-EcoRI y se clonó en el plásmido pEM4T dando lugar al plásmido **pnatPK** (Fig. 20c).

d) Plásmido pnatL2-PK

Para la expresión de conjunta de *natL2*, *natX* y *natPK* se amplificó un fragmento de 8000 bp que contiene el operón con los cebadores 1524-PKSfw y PKSCOMP-2. Este fragmento se digirió BamHI- EcoRI y se clonó en el plásmido pEM4T dando lugar al plásmido **pnatL2-PK** (Fig. 20d).

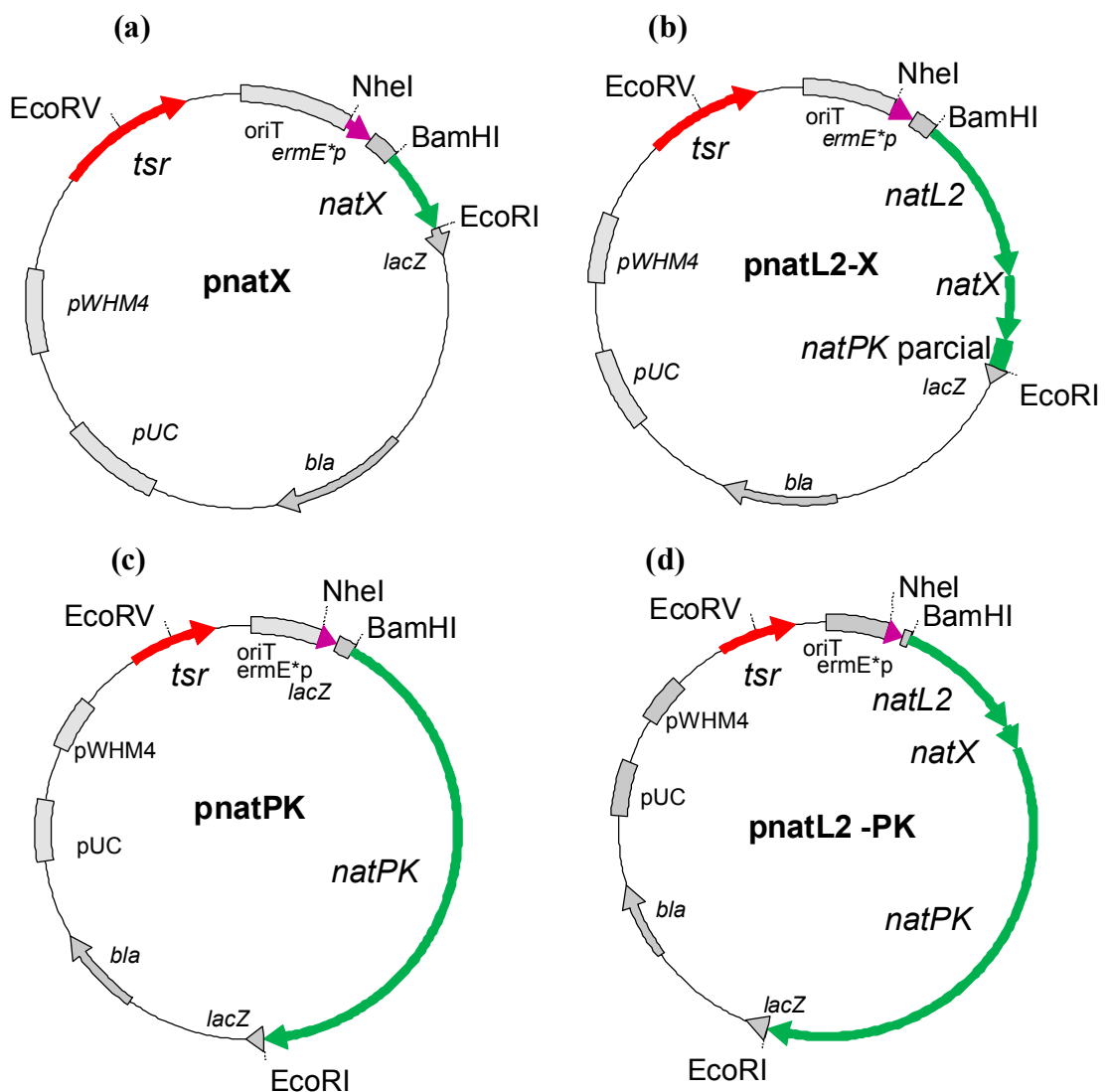


Figura 20. Plásmidos: a) pnatX, b) pnatL2-X, c) pnatPK, d) pnatL2-PK.

e) Plásmido pnatAM-AC1t

Para la complementación parcial del mutante Δ natAM-L1 se realizó la expresión de los genes *natAC1* (ACP) y *natAM* (amidohidrolasa). Para ello se amplificaron ambos genes conjuntamente en un fragmento de 1801 bp utilizando los cebadores 1519fw y ACPrv. A continuación, se digirió el producto de la PCR EcoRV-EcoRI y se clonó en el plásmido pSETec obteniendo el plásmido pnatAM-AC1. Seguidamente, se digirió esta construcción NheI y se subclonó el gen de resistencia a tiosreptona dando lugar a la construcción final **pnatAM-AC1t** (Fig.21a).

f) Plásmido pnatAC1-St

Para la complementación génica parcial del mutante Δ natAM-L1, se construyó el plásmido pnaTAC1-St el cual expresa los genes *natS* (ACP sintasa tipo III), *natLI* (AMP sintetasa y ligasa) y *natAC1* (ACP). Se obtuvo un fragmento de 3070 bp tras la amplificación con los *primers* PAMACup y PAMACrp. A continuación, se digirió el producto de la PCR BamHI-EcoRI y se clonó en el plásmido pSETeTc dando lugar al plásmido **pnatAC1-St** (Fig. 21b).

g) Plásmido pnatAM-L1-S ϵ

Para la complementación génica completa del mutante Δ natAM-L1 se procedió a la expresión conjunta de los genes *natAM*, *natAC1*, *natLI* y *natS*. En esta ocasión, se amplificó un fragmento de 4416 bp, conteniendo los cuatro genes, con los oligonucleótidos 1519fw y PAMACrp. Se linearizó el plásmido pSETec con EcoRI y se digirió el fragmento MfeI-EcoRI. Tras la clonación se obtuvo el plásmido pnaAM-L1-S. Para finalizar la construcción de **pnatAM-L1-S ϵ** (Fig. 21c), se digirió el plásmido anterior NheI y se subclonó el gen de resistencia a eritromicina tras aislarlo del vector pAGE con una digestión NheI-AvrII.

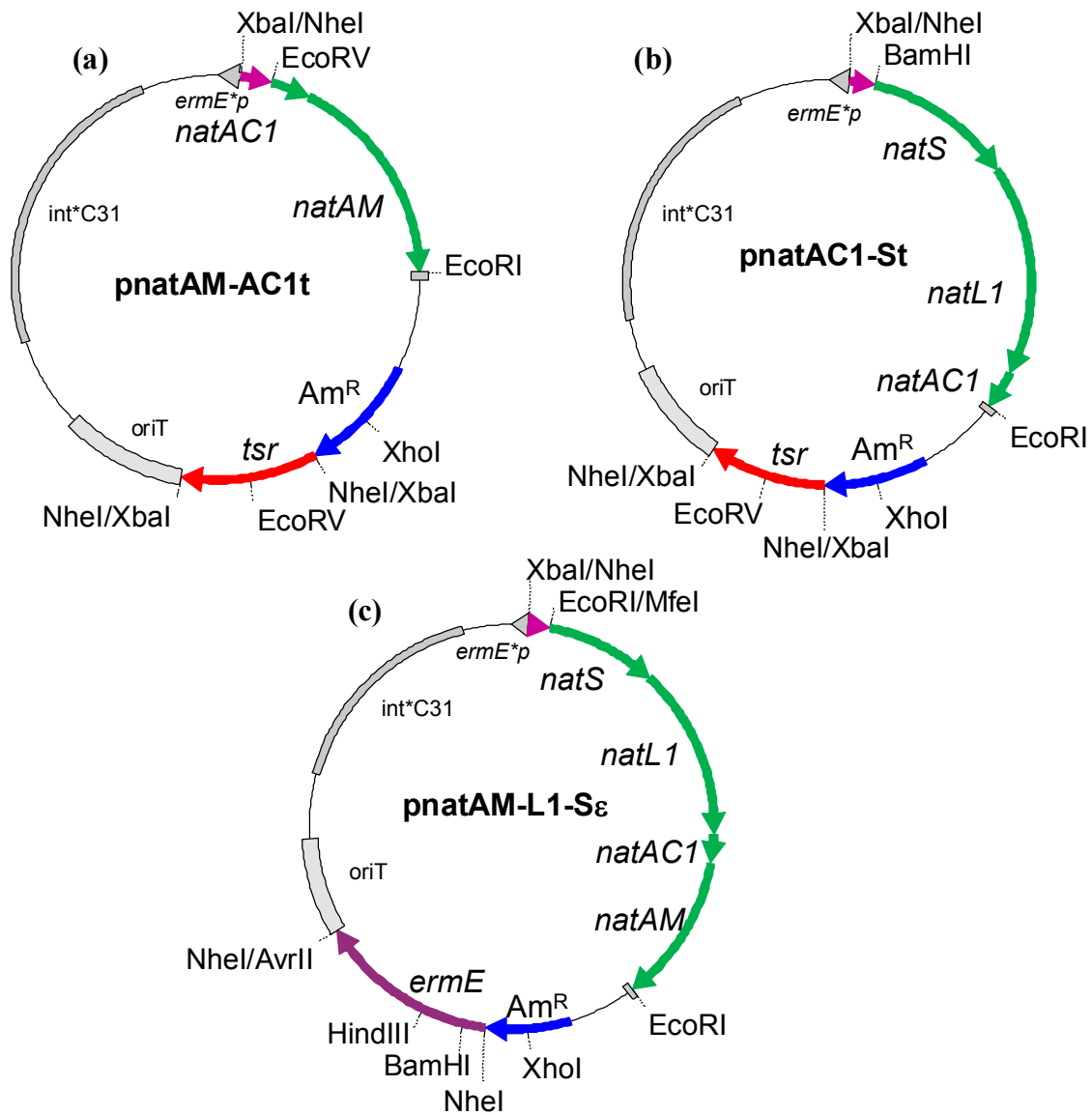


Figura 21. Plásmidos: a) pnatAM-AC1, b) pnatAC1-St, c) pnatAM-L1-Sε.

2.17.2.2 Construcción de plásmidos para la sobreexpresión de reguladores de la ruta del nataxazol.

a) Plásmido pSETeSARP04

Para la sobreexpresión en *Streptomyces* sp. Tü 6176 del gen *orf-4*, que codifica un regulador transcripcional tipo SARP, se procedió a construir un plásmido denominado pSETeSARP04 (Fig. 22a). Para ello, se amplificó por PCR el gen completo utilizando como ADN molde el cósmido cos6E8 y los cebadores SARP04fw y SARP04rv obteniéndose un fragmento de 1248 bp. El fragmento se digirió BamHI-EcoRI y se

clonó en el vector pSETec digerido BamHI-EcoRI, obteniéndose el plásmido pSETeSARP04.

b) Plásmido pnatR1

Para la obtención del plásmido **pnatR1** (Fig. 22b), cuyo objetivo es la de sobreexpresar el gen *natR1*, que codifica un regulador transcripcional tipo LuxR, en *Streptomyces* sp. Tü 6176, se procedió a amplificar el gen completo utilizando como ADN molde el cos6E8 y los cebadores LuxR09-2fw y LuxR09-2rv, obteniéndose un fragmento de 3057 bp. En esta ocasión el oligonucleótido LuxR09-2rv lleva como diana un sitio EcoRV y por lo tanto se digirió el vector pSETec EcoRV-EcoRI para la clonación del fragmento y obtener el plásmido deseado.

c) Plásmido pnatR2

natR2 codifica un regulador transcripcional de tipo TetR. Para la sobreexpresión de dicho gen se construyó el plásmido **pnatR2** (Fig. 22c). Se procedió a amplificar el gen completo utilizando los cebadores TetR14afw y TetR14arv obteniéndose un fragmento de 948 bp. En esta ocasión al primer TetR14afw se incorporó una diana BglII y por lo tanto el fragmento se digirió BglII-EcoRI y se clonó en el vector pSETec digerido BamHI-EcoRI obteniéndose así el plásmido pnatR2.

d) Plásmido pnatR3

Al igual que en el caso anterior, *natR3* codifica para un regulador transcripcional de tipo TetR. Para la obtención del plásmido **pnatR3** (Fig. 22d) que nos permitirá la sobreexpresión de dicho gen se siguieron los mismos pasos que se han descrito anteriormente. En esta ocasión los oligonucleótidos utilizados fueron TetR27fw y TetR27rv obteniéndose un fragmento de 934 bp. El fragmento se digirió BamHI-EcoRI y se clonó en el vector pSETec.

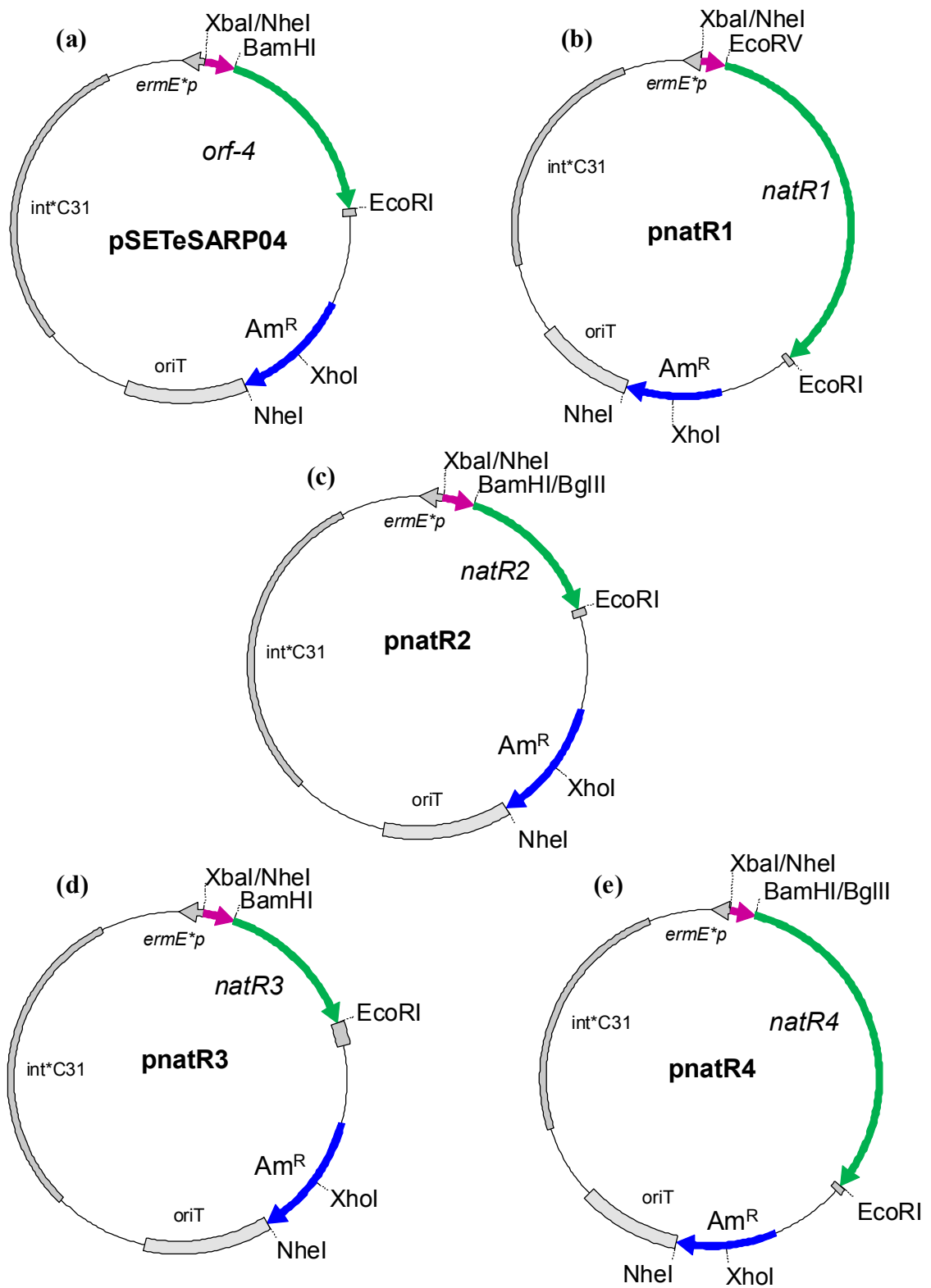


Figura 22. Plásmidos: a) pSEteSARP04, b) pnatR1, c) pnatR2, d) pnatR3, e) pnatR4.

e) Plásmido pnatR4

En el caso de *natR4*, que codifica un regulador transcripcional de tipo SARP, para su sobreexpresión, al igual que en los casos anteriores, se utilizó el vector integrativo pSETec que se digirió BamHI-EcoRI para clonar un fragmento de 2658 bp amplificado usando los cebadores SARP29fw y SARP29rv. El cebador SARP29fw incorpora una diana de restricción BglII. El fragmento amplificado se digirió BglII-EcoRI y se clonó en pSETec obteniéndose el plásmido **pnatR4** (Fig. 22e).

2.17.2.3 Construcción de plásmidos para la sobreexpresión de genes no pertenecientes al *cluster* del nataxazol.

Para poder realizar la expresión de genes que se encuentran en otros agrupamientos génicos se siguió la misma estrategia que en los genes del *cluster* de biosíntesis de benzoxazol con la excepción de que en la amplificación de estos genes se usó ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. Tü 6176 como molde.

a) Plásmido pCoe-SS

Se procedió a la sobreexpresión de diferentes genes localizados en el agrupamiento génico *cluster* 25. Uno de los genes seleccionados fue *cf54_20720* que codifica una salicilato sintasa. Se procedió a obtener una construcción denominada **pCoe-SS** (Fig. 23a) para lo cual se amplificó el gen por PCR utilizando los *primers* SSTUfw y SSTUrv obteniéndose un fragmento de 1701 bp. El fragmento se digirió BamHI-EcoRI y se clonó en el vector pEM4T. El gen *cf54_20720* se sobreexpresó en *S. albus* J1074.

b) Plásmido pCoe-citp450

Otro de los genes seleccionados fue *cf54_20695* que codifica un citocromo P450. Para ello, se procedió a obtener una construcción denominada **pCoe-citp450** (Fig. 23b). Se amplificó el gen por PCR utilizando los cebadores 4259P450fw y 4259P450rv obteniéndose un fragmento de 1371 bp. El fragmento se digirió BamHI-EcoRI y se

clonó en el vector pSETec. El gen *cf54_20695* se sobreexpresó en el productor de nataxazol *Streptomyces* sp. Tü 6176.

c) Plásmido pCoe-oxi

Otro de los genes pertenecientes al *cluster* 25 es *cf54_20685* que codifica una oxidorreductasa. Se construyó el plásmido **pCoe-oxi** (Fig. 23c) amplificando el gen completo con los cebadores 4258boxifw y 4258boxirv obteniéndose un fragmento de 2161 bp. El fragmento se digirió BglII-EcoRI y se clonó en el vector pSETec digerido BamHI-EcoRI. Este gen se sobreexpresó únicamente en el productor de nataxazol.

d) Plásmido pCoe-MT

En el mismo agrupamiento génico que los genes anteriores se encuentra el gen *cf54_20690* que codifica una metiltransferasa la cual se expresó heterológamente en *S. albus* J1074. Para poder llevar a cabo este objetivo se construyó el plásmido **pCoe-MT** (Fig. 23d). Para la amplificación por PCR se utilizaron los *primers* 4263MTfw y 4263MTrv obteniéndose un fragmento de 992 bp. En este caso el fragmento digerido BamHI-EcoRI se clonó en el vector pEM4T digerido BamHI-EcoRI, obteniéndose el plásmido pCoe-MT.

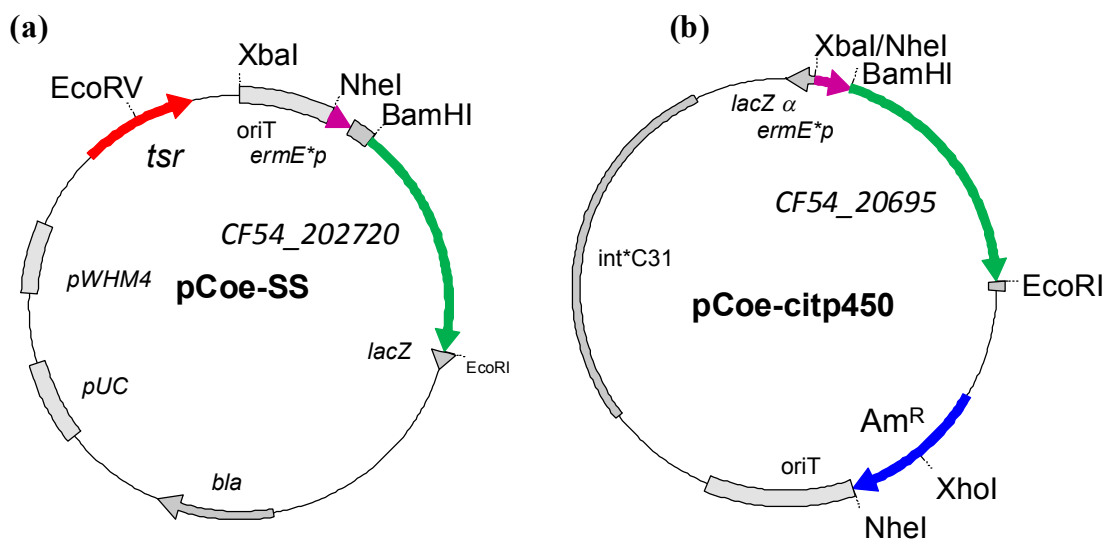


Figura 23. Plásmidos: a) pCoe-SS b) pCoe-citp450,

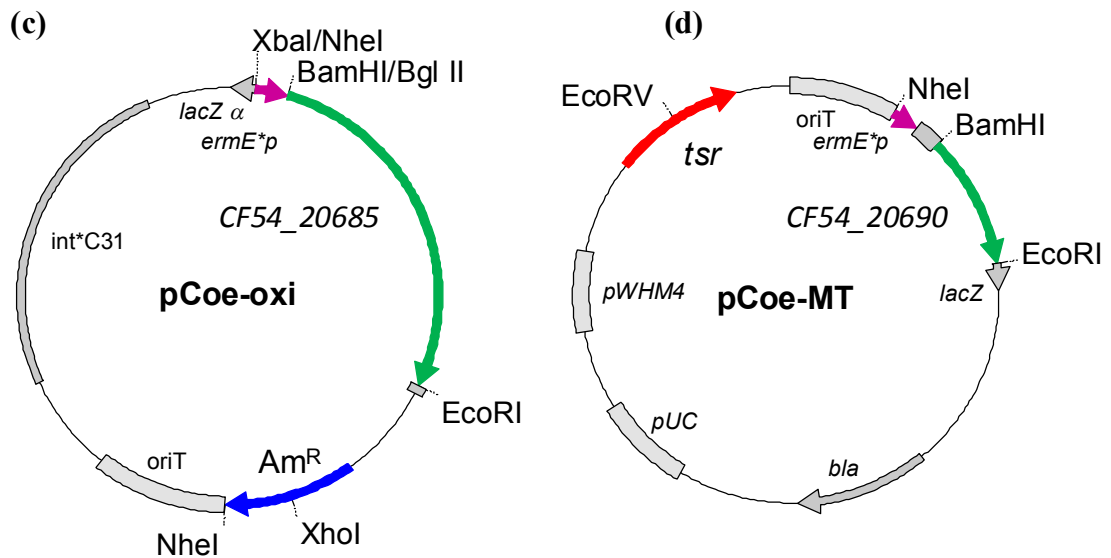


Figura 23 (continuación). Plásmidos: c) pCoe-oxi, d) pCoe-MT.

2.17.3 Construcción de plásmidos para la expresión del agrupamiento génico completo del nataxazol.

a) Plásmido BAC-6E8

Para la expresión heteróloga del agrupamiento génico del nataxazol en *S. albus* J1074 se utilizó el cósmido cos6E8, que presenta todos los genes implicados en la biosíntesis de nataxazol clonados en pWE15, y el BAC (Bacterial Artificial Chromosome) bifuncional (*E. coli* y *Streptomyces* spp.) pEBZ333 (Fig. 24a). Para realizar la construcción se linearizaron ambos plásmidos con NheI. Se desfosforiló pEBZ333 y la ligación se realizó a 4°C durante toda la noche. A continuación, se transformaron células *E. coli* LE392MP obteniéndose, finalmente, la construcción BAC-6E8 (Fig. 24b). Con esta construcción se transformaron protoplastos de *S. albus* J1074, *S. argillaceus*, *S. lividans* JT46 y el productor del benzoxazol caboxamicina *Streptomyces* sp. NTK 937.

b) Plásmido BAC-natT1/AC2

Otro de los plásmidos para la expresión heteróloga del cluster del nataxazol se construyó digiriendo cos6E8 AvrII-NheI obteniéndose un fragmento de 32 kb el cual contiene todos los genes estructurales y tres de los cuatro reguladores de la ruta (*natR2*,

natR3, *natR4*) más la *orf+1*. Este fragmento se clono en pEBZ333 digerido NheI, obteniéndose plásmido BAC-natT1/AC2 (Fig. 24b) con el cual se transformaron protoplastos de *S. albus* J1074, *S. argillaceus*, *S. lividans* JT46 y *Streptomyces* sp. NTK 937.

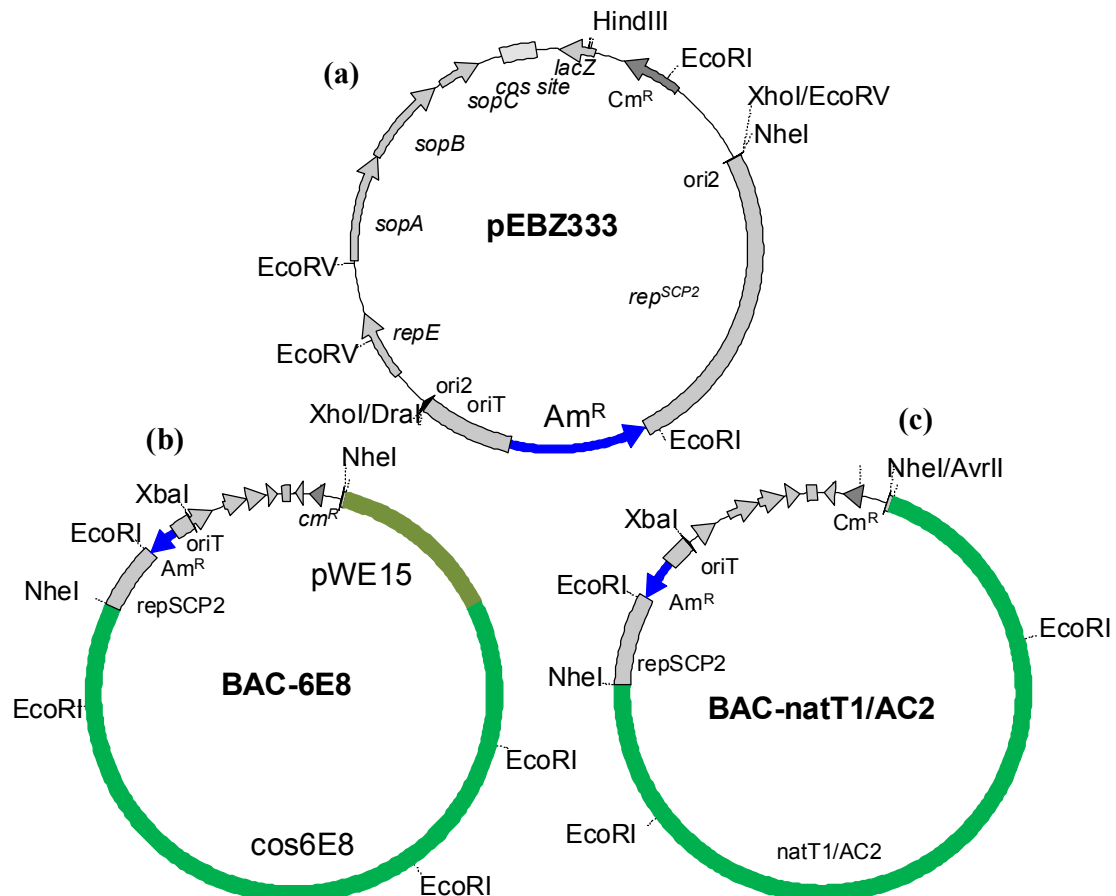


Figura 24. a) pEBZ333, b) BAC-6E8, c) BAC-natT1/AC2.

2.17.3.1 Construcción de plásmido pNATAR a través de la técnica *TAR cloning* y del plásmido pNATAR Δ AM.

a) Plásmido pNATAR

Para la expresión heteróloga del agrupamiento génico de nataxazol en *S. albus* J1074, *S. argillaceus* y *S. lividans* JT46 se procedió a clonar el *cluster* en el plásmido integrativo y trifuncional pCAP01 (Yamanaka *et al*, 2014) (Fig. 25a). Para ello, se siguió la técnica del *TAR cloning* (*Transformation Associated Recombination*).

Para realizar esta técnica primero se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos NATAR1–NATAR2 y NATAR3–NATAR4. Con la primera pareja de cebadores se amplificó por PCR la región inicial del *cluster* la cual contiene 100 bp de la *orf-1* y 900 bp de *natR1* mientras que con la segunda pareja de cebadores se amplificaron 800 bp de *natR4* más 200 bp de la región intergénica que le siguen *downstream*. A continuación los fragmentos de PCR se digirieron BamHI y se ligaron entre sí dando un fragmento de 2 kb. Este fragmento se reamplificó utilizando los *primers* NATAR1 y NATAR4 para obtener mayor cantidad de fragmento. Seguidamente, este fragmento se clonó en el plásmido pCAP01 con las dianas SpeI - XhoI dando lugar a un plásmido denominado pCAPNAT. Este plásmido se digirió BamHI para linearizarlo y se introdujo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48 junto con cos6E8, que contiene la ruta completa, siguiendo los pasos descritos por Kouprina y Larinov (2008). Se cultivó en YNB/sorbitol. Las colonias obtenidas debían haber sufrido una recombinación entre los fragmentos NATAR1-2 y NATAR3-4 y sus homólogos en el cos6E8 dejando al cos6E8 linearizado y sin el *cluster* de biosíntesis de nataxazol y a pCAPNAT circularizado y con el *cluster* de biosíntesis del nataxazol. A este nuevo plásmido que contiene el *cluster* del nataxazol se le denominó pNATAR (Fig. 25b).

Finalmente, las colonias positivas se crecieron en YPD para obtener el plásmido, para, a continuación, transformar *E. coli* DH10B y de ahí obtener suficiente cantidad para transformar protoplastos de *Streptomyces* spp.

b) Plásmido pNATAR Δ AM

Por otro lado se construyó el plásmido pNATAR Δ AM que deriva de pNATAR al cual se le ha delecionado *natAM* y se ha sustituido por el marcador URA3 de 1689 bp que confiere prototofia a la pirimidina uracilo en levaduras. Para construir este plásmido, primero se amplificó el marcador URA3 de pCXJ18 utilizando la pareja de primers mutAMd y mutAMrv los cuales tienen 40 bp adyacente a *natAM*. El producto de PCR se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48/pNATAR siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior. Se creció en. Los clones obtenidos en YNB sin

uracilo son capaces de sintetizar su propio uracilo por lo que han sufrido la recombinación esperada reemplazándose *natAM* por URA3 y obteniéndose así el plásmido pNATAR Δ AM (Fig. 25c) que se clonó en *E. coli* DH10B para obtener suficiente cantidad y finalmente se introdujo en *Streptomyces* spp.

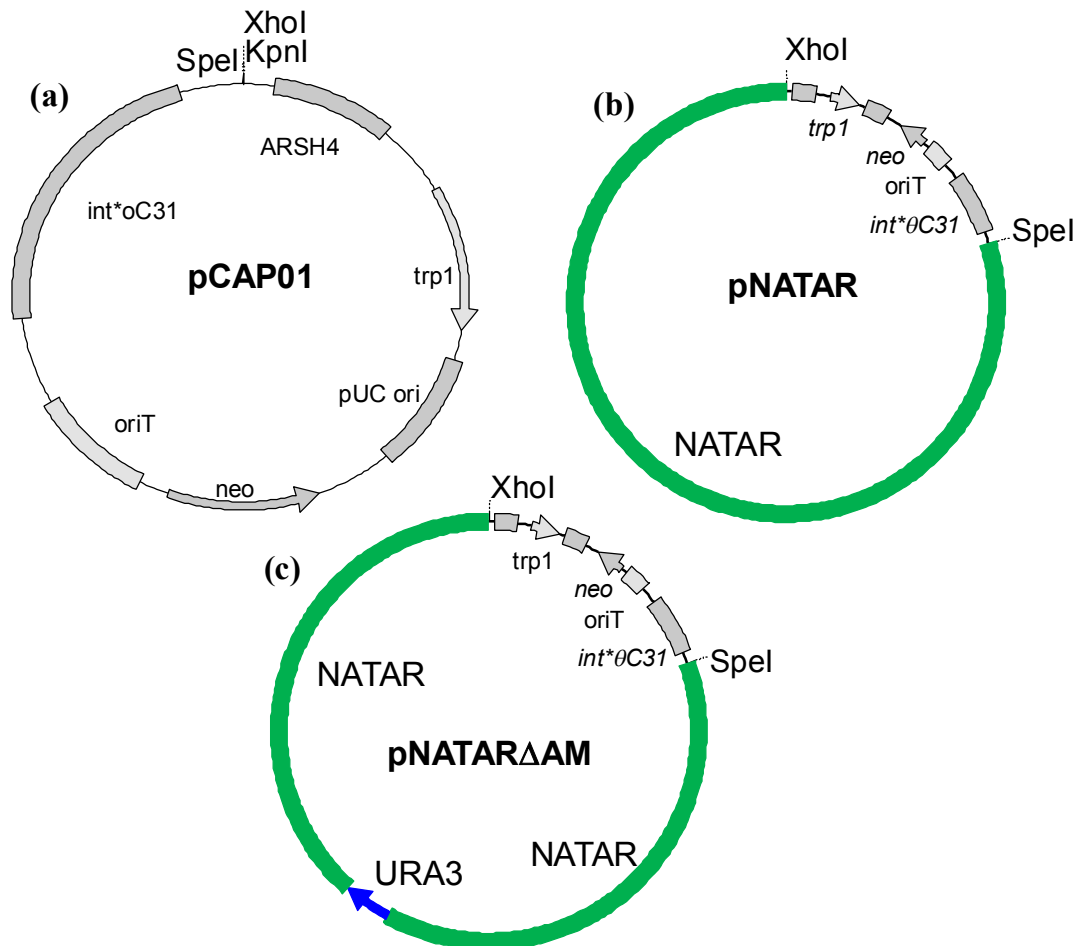


Figura 25. a) pCAP01, b) pNATAR y c) pNATAR Δ AM.

2.18 Complementación de mutantes.

La complementación de los mutantes se realizó de dos formas diferentes: complementación química y complementación genética.

La complementación química se realizó en los mutantes *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK, Δ natAN y Δ natAN- Δ SS. En el caso del mutante Δ natPK se le añadió al cultivo un extracto con ácido 6-metilsalicílico. Este 6-MSA se obtuvo de la expresión heteróloga de *natPK* en *S. albus* utilizando el plásmido pnatPK. En el caso de mutante

Δ natAN se realizó la complementación química utilizando ácido 3-hidroxiantranílico comercial (Sigma-Aldrich), producto final de la reacción en la que participa la antranilato sintasa codificada por el gen *natAN*. Y, finalmente, para el mutante Δ natAN- Δ SS se adicionó al cultivo ácido salicílico comercial (Sigma-Aldrich).

La complementación génica se utilizó para complementar el triple mutante *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natAM-L1. Se utilizaron los plásmidos pnatAM-AC1t, pnatAC1-St y pnatAM-L1-S ϵ . De igual modo se utilizó el plásmido pnatPK para intentar complementar genéticamente el mutante *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK.

2.19 Análisis de compuestos

2.19.1 Producción y extracción de nataxazol y otros benzoxazoles.

Para el análisis rutinario de la producción de nataxazol y otros compuestos de la familia de los benzoxazoles en las diferentes cepas con las que se ha trabajado se cultivaron las cepas en medio R5A sólido (descrito en el apdo. 2.2.1.1) en placas de 25 pocillos. A cada pocillo se le adicionó 2 ml de medio cultivo que se inoculó con 2 μ l de esporas de las cepas a analizar. Se cultivó durante 7 días a 30°C. Tras el periodo de incubación, se procedió a obtener un extracto utilizando 2 ml de solvente (acetato de etilo/1% ácido fórmico). La extracción se dejó en agitación durante al menos 2 horas. A continuación, se recolectó el solvente y se evaporó con una centrifuga acoplada a una bomba de vacío, *Speed-back*.

2.19.2 Comparación de producción entre distintas cepas.

Para comparar las diferencias de producción entre distintas cepas, en el caso de la sobreexpresión o inactivación de los reguladores, primero, se crecieron preinóculos en matraces de 250 ml con 50 ml de TSB, inoculados con 10 μ l de esporas. Se incubaron a 30°C y a 250 rpm de agitación durante 24 horas. A continuación, se prepararon tubos estériles de 5 ml de R5A líquido con cada cepa igualando la OD₆₀₀ para que los cultivos fueran lo más homogéneos posibles. Se prepararon tres matraces de 250 ml con 50 ml

de R5A líquido por cada cepa o clon a analizar y se inocularon con 1 ml de cultivo. Se incubaron durante 7 días a 30°C en agitación y se tomó 1 ml de muestra cada 24 horas. Para obtener los datos de producción de nataxazol y derivados se realizó una extracción con acetato de etilo/1% ácido fórmico tal y como se describe en el apartado anterior.

Para corregir la variabilidad debida al crecimiento se cuantificó el crecimiento y se corrigió la producción por el crecimiento.

2.19.2.1 Cuantificación del crecimiento por peso seco.

Para la cuantificación del crecimiento durante los experimentos de comparación de producción ésta realizó midiendo el peso seco. Para ello, al mismo tiempo que se tomaba 1 ml de cultivo para cuantificar su producción, en un tubo eppendorf tarado se añadía otro 1 ml del mismo cultivo. A continuación, se centrifugó para eliminar el sobrenadante dejando solo el micelio y se lavó 3 veces con agua MiliQ estéril. El micelio lavado se secó a 80°C durante 3 días. Se volvió a pesar el tubo eppendorf con el micelio obteniéndose el valor del peso seco de la muestra.

2.19.3 Análisis por UPLC

Para realizar el análisis por UPLC de las muestras, primero los extractos obtenidos se resuspendieron en 60 µl de metanol-DMSO con una proporción 1:1 de los cuales se analizaron 10 µl por UPLC. El UPLC utilizado durante la realización del trabajo fue un UPLC Acquity (Waters) con una columna de C18 “*Acquity UPLC[®] BEH (Ethylene-Bridged Hybrid)*” la cual presenta una tamaño de partícula de 1,7 µm y unas dimensiones de 2,1 x 100 mm. Durante el análisis, se aplicó un flujo de 0,5 ml/min a una temperatura de 35°C de los siguientes eluyentes: el primer minuto el eluyente fue 10% de acetonitrilo y 90% de ácido trifluoroacético (TFA); durante los 7 minutos siguientes va aumentando en un gradiente lineal hasta 100% de acetonitrilo. La detección de los picos en el cromatograma resultante y de los espectros se realizó a una longitud de onda de 330 nm.

2.19.4 Análisis por HPLC-MS

Para el análisis de las masas de los compuestos se realizó por espectrometría de masas acoplado a HPLC. Se usó un sistema cromatográfico Alliance, con una columna Symmetry C18 (2'1 x 150 mm), unido a un espectrómetro de masas ZQ4000. Los solventes utilizados fueron los mismos descritos anteriormente. La elución se realizó manteniendo durante 4 minutos un flujo de 10% acetonitrilo y seguido de un gradiente lineal hasta llegar al 88% en el minuto 30, a un flujo de 0'25 ml/min. La detección de los picos en el cromatograma se realizó a 330 nm. El análisis de masas se realizó por ionización *electrospray* en modo positivo con un voltaje de ionización de 3kV y un voltaje de cono 20V.

2.19.5 Purificación de compuestos

Para la purificación de nataxazol y otros benzoxazoles se utilizaron diversos métodos. En el caso del nataxazol y el nataxazol hidroxilado se utilizó 2 litros de medio GHSA sólido repartidos en 80 placas de Petri con 25 ml de medio cada una. Se sembraron las placas con 100 µl de un preinóculo de *Streptomyces* sp. Tü 6176 crecido durante 24 horas a 30°C en agitación a 250 rpm. El cultivo se incubó durante 7 días a 30°C. Posteriormente, la extracción de compuestos se realizó con 500 ml de acetato de etilo/1% ácido fórmico dejándolo en agitación durante al menos 2 horas. Seguidamente, se decantó el solvente para separarlo del cultivo y se evaporó en un rotavapor. A continuación, el extracto obtenido se disolvió en 5 ml de DMSO-metanol y se pasó por una columna de C18. El material retenido se eluyó con una mezcla de metanol y 0,05% TFA en agua. Para fraccionar la muestra se aplicó un gradiente del 0% al 100% de metanol durante 60 minutos, con un flujo de 10 ml/min, recogiendo fracciones cada 5 minutos y analizándolas por UPLC. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron en vacío y a continuación se resuspendieron en un volumen pequeño de una mezcla DMSO-metanol (1:1). La purificación de los productos se llevó a cabo mediante HPLC preparativa usando una columna SunFire C18 (10 µm, 10 x 150 mm, Waters). Los compuestos fueron cromatografiados con mezclas de acetonitrilo o

metanol y TFA al 0,05% en agua, en condiciones isocráticas optimizadas para cada compuesto y un flujo de 7 ml/min. Posteriormente se pasó por un cartucho de extracción de fase sólida utilizando una columna C18 “*Sep-Pack*” (Waters). Finalmente, el cartucho se lavó con agua y posteriormente con metanol para extraer el compuesto que finalmente se liofilizó.

Para purificar la caboxamicina, primero se cultivaron 2 litros de R5A sólido repartidas en 80 placas con la cepa silvestre *Streptomyces* sp. NTK 937. Se sembraron con 100 µl de un preinóculo crecido en TSB a 30°C y en agitación a 250 rpm. Se incubó en la estufa a 30°C durante 7 días. Los pasos para la extracción y la purificación fueron los mismos que para el nataxazol.

En el caso de la purificación del benzoxazol UK-1, el medio de cultivo fue el medio definido carente de zinc. Se utilizaron 2 litros repartidos en 40 matraces de 250 ml con 50 ml cada uno. Se inoculó con 2 ml de un pre-inóculo en TSB de la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176 ΔPKS tras haberlo lavado tres veces con agua MiliQ. A continuación se incubó durante 5 días a 30°C en incubadores con agitación a 250 rpm. Tras el periodo de incubación, se centrifugó el cultivo separando el caldo del precipitado donde se encontraban las células. Las células se resuspendieron con acetato de etilo/1% ácido fórmico mientras que el caldo se pasó directamente por columna de extracción. A continuación, se analizaron por UPLC ambas y se observó que UK-1 se encontraba íntegramente en el extracto de células por lo que se procedió a su purificación a partir de ahí. El método de purificación fue el mismo que para el nataxazol.

Para la purificación del benzoxazol AJ9561, se utilizó la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176 ΔnatR3 que se cultivó en 2 litros de R5A líquido repartidos en 40 matraces con 50 ml de medio. Cada matraz fue inoculado con 300 µl de un preinóculo de TSB crecido durante 24 horas a 30°C en agitación obteniendo en cada matraz inoculado una OD₆₀₀ inferior a 0,1. Se incubó durante 24 horas en un incubador con una agitación de 250

rpm y a 30°C. Al igual que con el UK-1 se separó el caldo de cultivo de las células y se observó que el compuesto se encontraba tanto en el caldo como en las células por la que se realizó la extracción de las células con acetato de etilo/1% ácido fórmico y se siguieron los mismos pasos para la purificación que en los casos anteriores. Mientras que para la extracción del compuesto del caldo éste se paso por un cartucho de extracción en fase sólida C18 (10g). A continuación, se aplicó un gradiente del 0% al 100% de metanol y 0'05% TFA durante 60 minutos, con un flujo de 10 ml/min, recogándose fracciones cada 5 minutos y analizándolas por UPLC. Posteriormente, tras identificar las fracciones donde se localizaba el compuesto, se procedió a su purificación siguiendo los mismos pasos que con los demás compuestos.

Para la extracción y purificación de la enterobactina y sus intermediarios, se cultivó *Streptomyces* sp. Tü 6176 en 2 litros de medio definido carente de hierro en matraces de 2 litros con 400 ml cada uno. Se inocularon con 5 ml de un preinóculo crecido en TSB durante 24 horas a 30°C y con una agitación de 250 rpm. Se incubó durante 7 días a 30°C. Al igual que con UK-1 y AJI9561, se separaron el caldo de cultivo de las células analizando por separado cada una por UPLC y observándose que los compuestos se encontraban en el caldo. Por lo tanto para su extracción y purificación se siguieron las mismas etapas que en el caso del AJI9561.

2.19.6 Caracterización estructural de los compuestos

La elucidación de los derivados del nataxazol fue realizada en la Fundación Medina de Granada. El análisis de espectro de masa se realizó utilizando LC/MS, un sistema de cromatografía líquida que emplea una columna de Zorbax SB-C8 de 2'1 x 30 mm con un gradiente general de agua-acetonitrilo a una concentración de 1'3 mM en TFA y formiato amónico durante un tiempo de análisis de 10 minutos. Los datos se registraron en un espectrómetro de masas "*Bruker maxis*".

A continuación, se analizaron por RMN (Resonancia Magnética Nuclear). Los compuestos se disolvieron 50 µl de DMSO-*d*₆ de los cuales se transfirieron 32 al tubo

de RMN y se analizaron en un espectrómetro “*Brucker AVANCE III*” de 500 MHz equipado con una microcriosonda de 1’7 mm a una temperatura de 24°C.

2.20 Bioconversiones

Durante este trabajo se realizaron distintas bioconversiones dándole a la cepa silvestre o alguna de las cepas mutantes obtenidas diferentes compuestos ya fuesen precursores como el ácido 3-hidoxiantranílico u otros benzoxazoles como caboxamicina o AJI9561. Para ello se procedió a preparar un preinóculo en TSB el cual se inoculó con 10-50 µl de esporas y se incubó con una agitación de 250 rpm durante 24 horas a 30°C. Tras esto, se inocularon los matraces de 250 ml con 50 ml de R5A líquido con 1 ml del preinóculo, igualando la OD₆₀₀ si se utilizaban cepas diferentes. Se dejó incubando en las mismas condiciones que el preinóculo durante 24 horas. Tras estas 24 horas se adicionó el compuesto cuya concentración vario según la bioconversión.

2.21 Análisis de la actividad biológica

2.21.1 Análisis de la actividad antibiótica

Para la determinación de la actividad antibiótica se utilizó la técnica de difusión en disco. La actividad antibiótica de nataxazol y nataxazol hidroxilado fue ensayada frente a la bacteria Gram negativa *E. coli*, Gram positiva *S. albus*, y la actividad antifúngica se ensayo frente a la levadura *Candida albicans*. En el caso de AJI9561 y nataxazol también fueron ensayadas las cepas *S. lividans* JT46, *S. argillaceus* y *Streptomyces* sp. NTK 937. La técnica de siembra utilizada en los tres casos fue la técnica de sobrefusión donde 25 ml de medio sólido atemperado (40-45°C) se inocularon con 100 µl de cultivo (*E. coli* y *Candida albicans*) o 50 µl de esporas de *Streptomyces* spp. El medio inoculado se sirvió en placas de Petri y se dejó solidificar (Tabla 12). A continuación, se depositaron por cada placa tres discos de 5 mm de diámetro sin compuesto. Seguidamente, a cada disco se le adicionó una concentración determinada del compuesto a ensayar. Se incubaron las placas durante 24 horas.

Tabla 12. Condiciones en las que se hicieron los bioensayos

Especie	Medio de cultivo	T^a de incubación
<i>Escherichia coli</i>	LA ½	37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	LA ½	37°C
<i>Streptomyces spp.</i>	TSA ½	30°C
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	37°C

2.21.2 Análisis de la actividad citotóxica

Algunos de los compuestos purificados también se probaron frente a diferentes líneas tumorales (Tabla 13) para testar su actividad citotóxica, y por tanto, su potencial como compuestos antitumorales. Este proceso se llevó a cabo en la Unidad Biotecnológica Preparativa de la Universidad de Oviedo donde se utilizó el kit comercial “*Cell Counting Kit-8*” siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Tabla 13. Líneas tumorales ensayadas

Nombre	Tipo de tumor
A549	Pulmón
MDAMB231	Mamá
HT29	Colón
AGS	Gástrico
A2780	Ovario
NIH3T3	Fibroblasto de ratón (control)

RESULTADOS

3.1 Análisis bioinformático del genoma de *Streptomyces* sp. Tü6176.

El genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 presenta un tamaño de 8.820.073 nucleótidos con un contenido en G+C del 72'86 %. A este resultado se llegó a través de la secuenciación de 512.452 secuencias iniciales de 340'62 nucleótidos cada una. De esta forma, encontramos el genoma representado en 19'79 veces en 174'55 Mb. A continuación, estas secuencias se ensamblaron *de novo* dando lugar a 1265 *contigs*. El tamaño medio de los *contigs* es de 10.531 bp, siendo el de mayor tamaño de 68'1 kb. Luego, se realizó un nuevo ensamblaje obteniendo un total de 20 *scaffolds*. El tamaño medio es de 1.211.426 bp teniendo 3'5 Mb el *scaffold* de mayor tamaño. Finalmente, en la anotación resultante se identificaron un total de 6.806 secuencias codificantes, un operón de ARNr y 67 *locis* de ARNt.

3.1.1 Potenciales agrupamientos génicos de biosíntesis de metabolitos secundarios.

Para la búsqueda y análisis de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios en el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se ha utilizado la herramienta bioinformática antiSMASH 2.0. Dicha herramienta predijo 38 potenciales agrupamientos génicos (Tabla 14). La mayoría de estos *clusters* (17) están compuestos por proteínas modulares: 1 *cluster* contiene sintasas de ácido grasos poliinsaturados (PUFA), 10 *clusters* contienen NRPSs, uno presenta un sistema híbrido PKS-NRPS, 3 *clusters* corresponden a PKSs tipo I, un *cluster* contiene una PKS tipo II y un último *cluster* presenta una PKS tipo III.

Tabla 14. Descripción de los diferentes *clusters* de biosíntesis predichos por la herramienta bioinformática.

<i>Cluster</i>	Nº GenBank CF54 *	Tipo	Producto predicho	Referencia**
1	03620-03625	Terpeno	Albaflavenona	Bentley <i>et al.</i> , 2002
2	07050-07095	Sideróforo	Desconocido	
3	07305-07410	PKS tipo I	Nataxazol	Udwary <i>et al.</i> , 2011

4	07415-07460	PUFA	Desconocido	
5	07485-07515	NRPS	Desconocido	
6	08595-08645	Bacteriocina	Desconocido	
7	08770	Terpeno	Geosmina	Bentley <i>et al.</i> , 2002
8	10925-10955	Terpeno	Hopeno	Bentley <i>et al.</i> , 2002
9	11885-11915	Bacteriocina	Desconocido	
10	12645-12705	NRPS	Enterobactina	Liu <i>et al.</i> , 1989
11	13990-14130	Fosfoglicolípido	Moenomicina***	Ostash <i>et al.</i> , 2007
12	14140-14185	Lantipéptido	Desconocido	
13	14730-14780	Bacteriocina	Desconocido	
14	14900-15020	NRPS	Azinomicina B***	Zhao <i>et al.</i> , 2008
15	15025	Terpeno	Desconocido	
16	15055-15110	NRPS	coelichelina-like	Bentley <i>et al.</i> , 2002
17	15465-15490	Lantipéptido	Desconocido	
18	15655-15660	Terpeno	2-methylisoborneol	Bentley <i>et al.</i> , 2002
19	16410-16710	NRPS	Desconocido	
20	17350-17370	Butirolactona	Desconocido	
21	17425-17550	NRPS-PKS	Virginiamicina M*** Pristinamicina***	Pulsawat <i>et al.</i> , 2007 Mast <i>et al.</i> , 2011
22	17570-17915	PKS tipo I	Vicenistatina***	Ogasawara <i>et al.</i> , 2004
23	18585-18595	Butirolactona	Desconocido	
24	19785-19880	PKS tipo I	Desconocido	
25	20670-20720	NRPS	Coelibactina	Bentley <i>et al.</i> , 2002
26	20835-20965	Aminociclitol	Higromicina B	GenBank: AJ628642.1
27	21030-21050	NRPS	Desconocido	
28	21230-21235	Melanina	Melanina	Bentley <i>et al.</i> , 2002
29	25565-25595	Ectoina sintasa	5-Hydroxyectoine	Bentley <i>et al.</i> , 2002
30	26680-26810	NRPS	Desconocido	
31	29075-29100	NRPS	Desconocido	
32	29305-29390	NRPS	Desconocido	
33	29415-29640	Terpeno	Longestina***	Hayashi <i>et al.</i> , 2007
34	29990-30015	Terpeno	Fitoeno-Isorerinateno	Bentley <i>et al.</i> , 2002
35	30170-30215	Butirolactona	Desconocido	
36	33430-33490	PKS tipo II	Posible pigmento esporal	
37	34275-34280	PKS tipo III	THN, flaviolina	Bentley <i>et al.</i> , 2002
38	34650-34655	Terpeno	Desconocido	

*Localización basada en análisis por antiSMASH del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176, número de acceso JFJQ01000000.

** Referencia del agrupamiento génico más similar al localizado por antiSMASH.

*** Compuesto tipo más probable en función de la homología del *cluster*.

AntiSMASH 2.0 no solamente predice los potenciales agrupamientos génicos sino que también intenta predecir las posibles estructuras de cada uno de ellos. Para ello, se basa en los precursores utilizados por los módulos de carga en PKSs y NRPSs, en las

modificaciones de las proteínas auxiliares del *cluster* y en la homología con otros *clusters* ya descritos, algunos de los cuales parecen estar muy conservados. Es el caso, por ejemplo, del *cluster* 37 que estaría implicado en la biosíntesis de 1,3,6,8 – tetrahidroxinaftaleno (THN) y su producto de oxidación flaviolina a partir de una PKS tipo III. Se puede encontrar en *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis* MA-4680 y *S. albus* J1074 (Nett *et al.*, 2009; Craney *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2014; Olano *et al.*, 2014b). Otro agrupamiento génico conservado es el del sideróforo enterobactina (*cluster* 10) el cual contiene una NRPS que carga el aminoácido serina uniéndolo al ácido 2,3–hidroxibenzoico. Aunque la enterobactina fue descrita por primera vez en *E. coli*, se ha visto que también se produce por actinomicetos. (Fiedler *et al.*, 2001). Otro de los *clusters* conservado en *Streptomyces* sp. Tü 6176 es el del hipotético zincóforo coelibactina (Fig. 26a) el cual fue descrito en *S. coelicolor* A3(2) por Bentley y colaboradores (Bentley *et al.*, 2002; Hesketh *et al.*, 2009).



Figura 26. a) Comparación antiSMASH 2.0 entre el *cluster* de coelibactina de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *S. coelicolor* A3(2). b) Comparación del *cluster* de higromicina B de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus*.

Además de los *clusters* anteriormente mencionados, también encontramos agrupamientos implicados en la biosíntesis de péptidos: 5 *clusters* de péptidos ribosomales (3 bacteriocinas y 2 lantipéptidos), un sideróforo de hidroxamato y un *cluster* implicado en la biosíntesis de ectoína. Se han localizado del mismo modo 8 agrupamientos génicos implicados en la biosíntesis de terpenos, algunos muy conservados como los de albaflavenona y el de geosmina; 3 *clusters* implicados en la

biosíntesis de butirolactonas, otro posiblemente implicado en la producción del fosfoglicolípido moenomicina, otro para melanina y, finalmente, otro para el antibiótico higromicina B (Fig. 26b). La mayor parte de los genes descritos para el *cluster* de la higromicina B (GenBank: AJ628642.1) se encuentran en *Streptomyces* sp. Tü 6176 el cual presenta resistencia a dicho antibiótico.

3.1.2 Análisis de la secuencia para la localización del potencial *cluster* de biosíntesis de nataxazol.

Tras analizar el genoma con la anotación de los genes y la predicción de los potenciales agrupamientos génicos implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios se procedió a analizar aquellos *clusters* que pudieran contener los genes necesarios para la biosíntesis de nataxazol y sus precursores (Fig. 27).

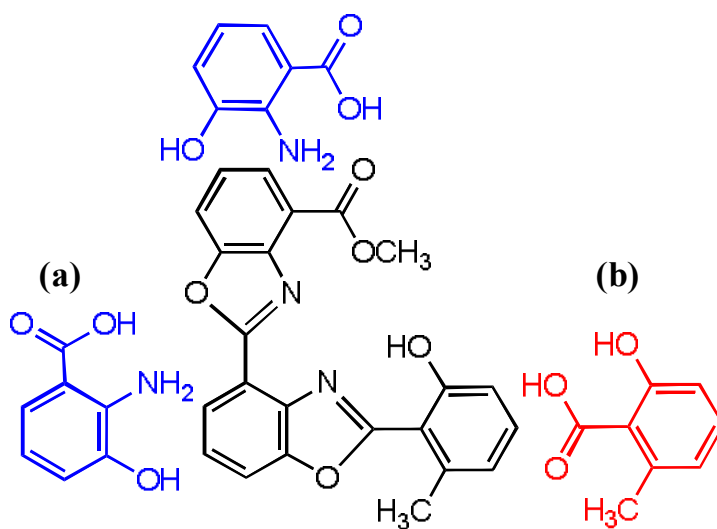


Figura 27. Nataxazol con sus precursores: a) ácido 3-hidroxiantranílico y b) ácido 6-metilsalicílico

Primero, estudiando la síntesis del motivo benzoxazol descrita en la bibliografía se adoptó la hipótesis de Wu y colaboradores para la biosíntesis del benzoxazol calcimicina (Wu *et al.*, 2011) y Shibata y colaboradores para el UK-1 (Shibata *et al.*, 1993). El primer precursor podría ser el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) (Fig. 27a).

En la ruta de biosíntesis de calcimicina la formación del 3-HAA sigue la ruta del sikimato (Knaggs, 1999) (Fig. 28a), de modo que se buscaron, en los diferentes *clusters*, genes que codificaran enzimas para la modificación de corismato, tales como antranilato sintasas, isocorismatasas y 2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dehidrogenasas. En el **cluster 3** se localizaron tres genes adyacentes cuyos productos deducidos presentan similitud con antranilato sintasas, isocorismatasas y 2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dehidrogenasas de las rutas de biosíntesis de la calcimicina y fenazinas (Schneemann *et al.*, 2011).

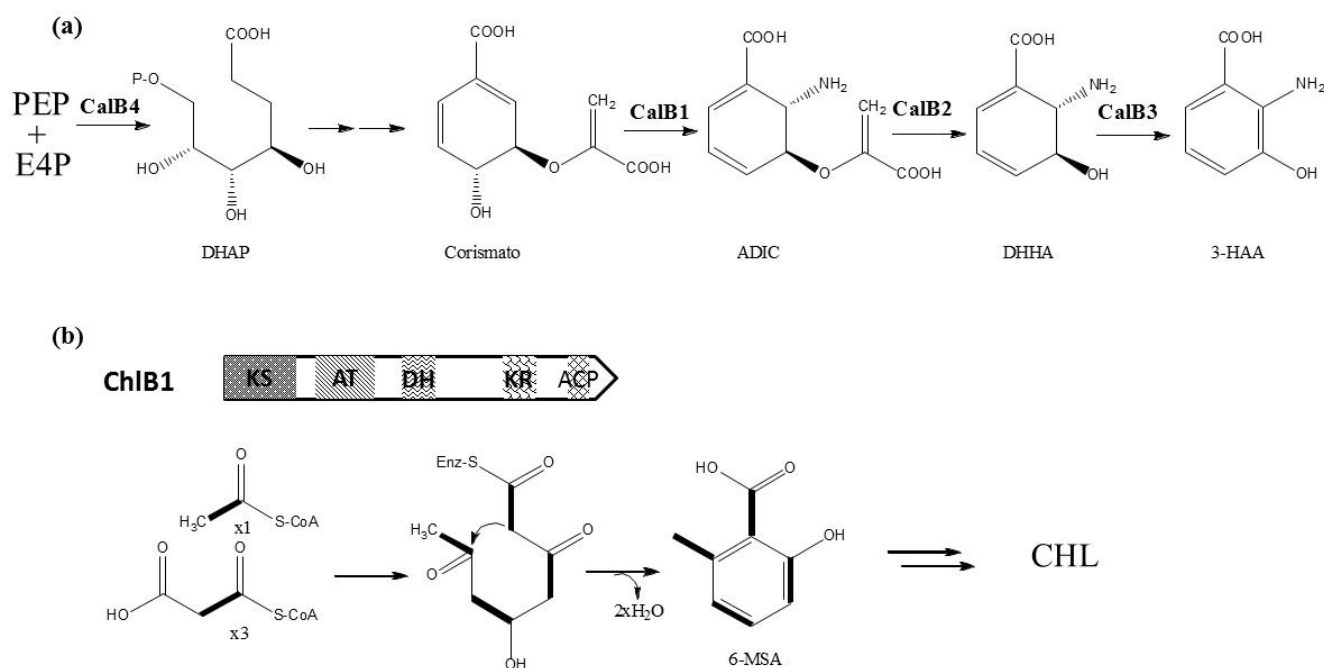


Figura 28. a) Biosíntesis de 3-HAA en la ruta de la calcimicina (Wu *et al.*, 2011) y b) Biosíntesis de 6-MSA por la PKS tipo I iterativa ChlB1 en la ruta de biosíntesis de la clorotricina (Shao *et al.*, 2006).

Para biosíntesis del segundo precursor nos basamos en la hipótesis de Shibata y colaboradores (Shibata *et al.*, 1993) quienes propusieron que el segundo precursor del UK-1 podría ser el ácido salicílico (SA). Sin embargo, en el caso del nataxazol el motivo derivado del SA se encuentra metilado siendo el compuesto, posiblemente, ácido 6-metilsalicílico (6-MSA) (Fig. 27b). Para localizar los genes implicados en la biosíntesis del 6-MSA se siguieron dos hipótesis iniciales:

- 1º. Una molécula de corismato podría ser modificada por una salicilato sintasa para dar lugar a SA (Ziebart *et al.*, 2010) y éste, finalmente, se metilaría por una metiltransferasa.
- 2º. La segunda opción implica la acción de una PKS tipo I iterativa que condensaría una molécula de acetil-coA y tres moléculas de malonil-coA para dar lugar a 6-MSA, tal y como se describe en la ruta de biosíntesis de la clorotricina (Shao *et al.*, 2006 y Jia *et al.*, 2006) (Fig. 28b).

En el *cluster* 3 localizamos una PKS tipo I iterativa (*cf54_07385*) cuyo producto deducido presenta alta similitud con ChIB1 (% Identidad/Similitud: 50/62) de la ruta de biosíntesis de la clorotricina (Jia *et al.*, 2006). Por otro lado, en el *cluster* 25 se localizó genes que codifican una salicilato sintasa y una metiltransferasa similares a la salicilato sintasa y la metiltransferasa del *cluster* de coelibactina en *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002).

3.2 Caracterización de *cf54_07385*.

Con el objetivo de demostrar si *cf54_07385*, que codifica para una PKS tipo I iterativa en el agrupamiento génico 3, se encuentra implicada en la biosíntesis del ácido 6-metilsalicílico y a su vez en la biosíntesis de nataxazol, se decidió realizar una interrupción génica de dicho gen obteniendo así la cepa mutante *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK (nos referiremos a esta cepa como Δ natPK de aquí en adelante). Para ello, se obtuvo la construcción p Δ natPK (aptdo. 2.16.1.1). Tras la construcción de p Δ natPK (clonado en el vector pOJ260) se realizó la conjugación de micelio de la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176, tal y como se describe en Material y Métodos. Después de un tiempo de incubación de 17 días, se obtuvo un transconjugante con resistencia a apramicina y con el plásmido insertado en el cromosoma. Esto se comprobó tanto por Southern blot (Fig. 29a) como por PCR (Fig. 29b y c). En la comprobación por Southern Blot se digirió la cepa silvestre (WT) como la cepa Δ natPK con dos enzimas diferentes, KpnI y BglII. En el caso de la digestión KpnI (**calle 1**, Fig. 29a) para la cepa silvestre se espera una banda de 5'3 kb mientras que para Δ natPK se esperan dos bandas

de 6'3 y 3'5 kb, respectivamente. Mientras que en la digestión BglIII (**calle 2**, Fig. 29a) se espera una banda de 3'6 kb en la cepa silvestre y para Δ natPK se esperan dos bandas de 4 kb y 500 bp, respectivamente. Por otro lado, La comprobación por PCR se realizó utilizando las parejas de *primers* M13fw – PCOMP1 (Fig. 29b) y M13rv – PCOMP2 (Fig. 29c). Los cebadores M13 anillan dentro del plásmido pOJ260 mientras que los cebadores PCOMP1 y PCOMP2 (Fig. 29c) anillan fuera de *cf54_07385*, de forma que en la cepa silvestre no se espera amplificación debido a que no está inserto el plásmido mientras que en la cepa Δ natPK se espera para la pareja M13fw – PCOMP1 una banda de 2'5 kb y para la pareja M13rv – PCOMP2 una banda de 4 kb.

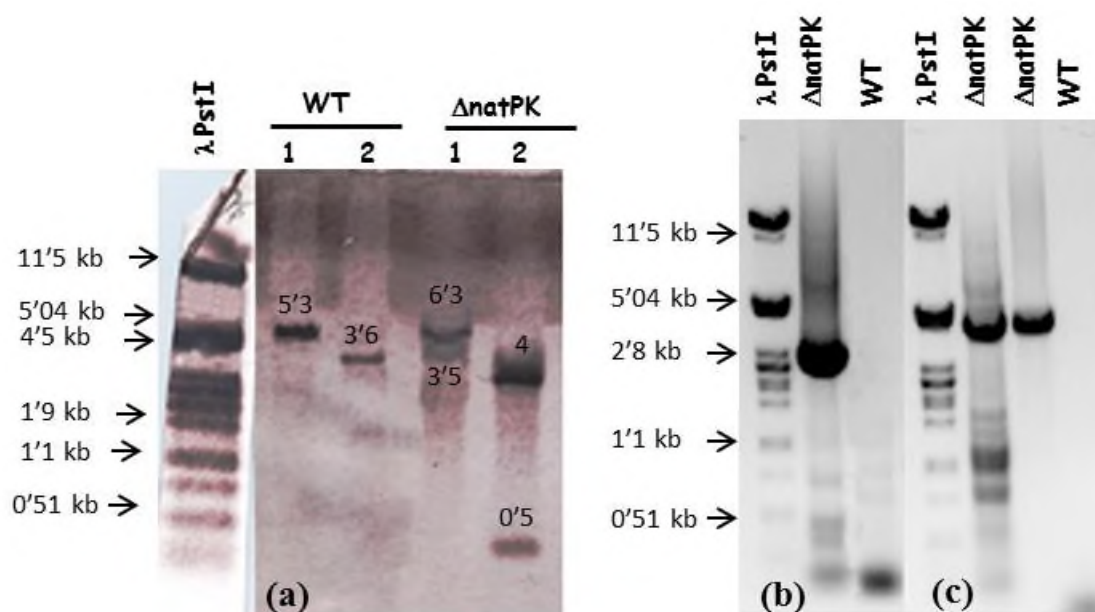


Figura 29. a) Southern blot del mutante Δ natPK. b) PCR de comprobación del mutante Δ natPK usando los oligonucleótidos M13fw – PCOMP1. c) PCR de comprobación del mutante Δ natPK usando los oligonucleótidos M13rv – PCOMP2.

A continuación, se procedió a comprobar la producción de nataxazol en Δ natPK, siguiéndose para ello los pasos descritos en el aptdo 2.19.1. El extracto obtenido se analizó por UPLC (aptdo 2.19.3). El análisis del extracto de Δ natPK mostró la ausencia de nataxazol (Fig. 30b) en comparación con la cepa silvestre donde se observa un pico de nataxazol (1) con una movilidad de 7'05 min (Fig. 30a). Esto demuestra la implicación de *cf54_07385* en la biosíntesis de nataxazol. A este gen se le denominará *natPK*.

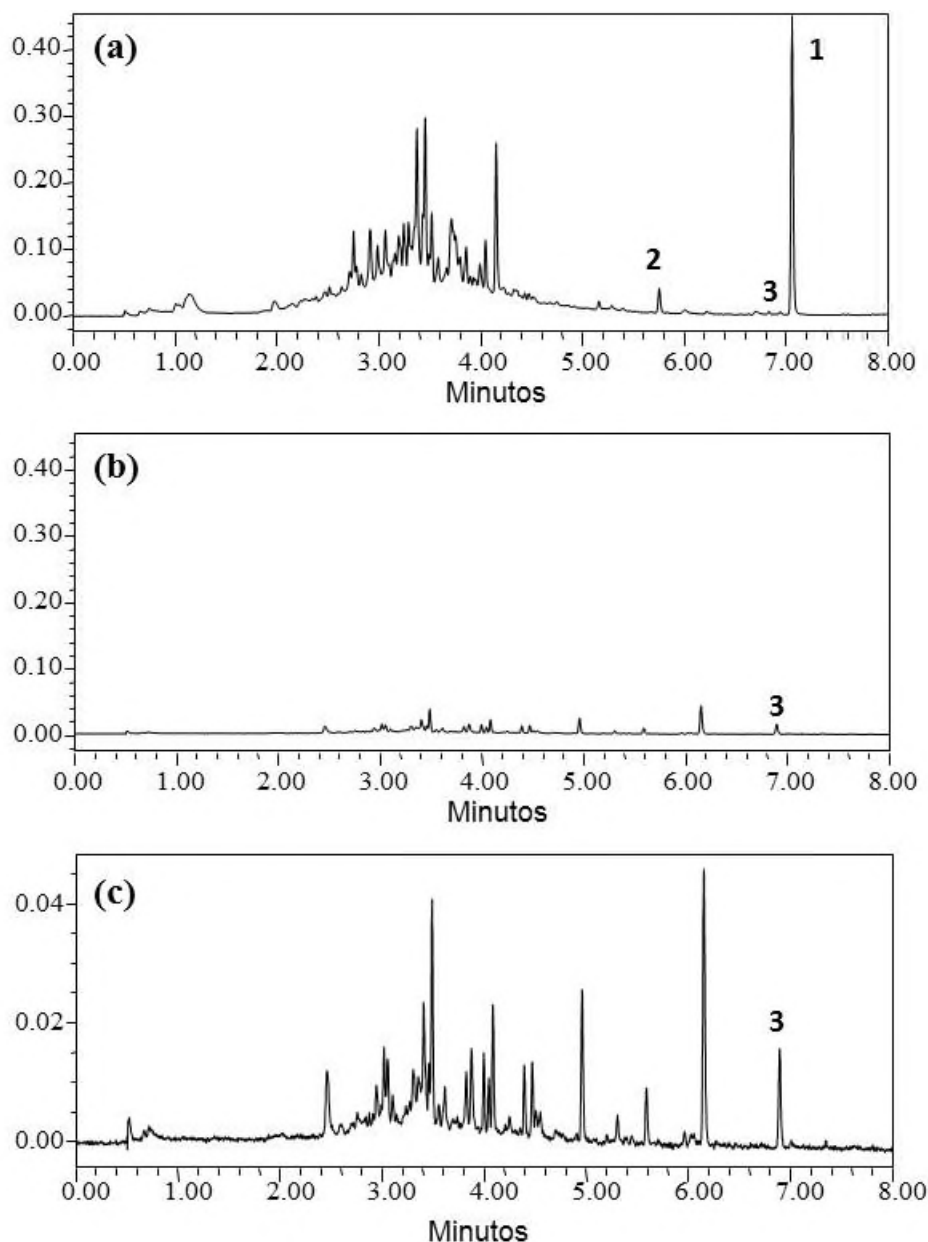


Figura 30. Cromatogramas: **a)** Cepa silvestre de *Streptomyces* sp. Tü 6176 donde se observa nataxazol (**1**) y los compuestos **2** y **3**. **b)** Cepa mutante *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK donde se observa la desaparición de nataxazol y del compuesto **2** y el incremento del compuesto **3**. **c)** Ampliación del cromatograma (b).

En el mutante Δ natPK no solo desaparece nataxazol (**1**) sino que también desaparece otro compuesto (**2**) con una movilidad de 5'7 min, presente en la cepa silvestre (Fig. 30a) y el cual presenta un espectro ligeramente diferente al de nataxazol (Fig. 31a y b). Además, en la cepa mutante se puede apreciar el incremento de otro compuesto con un espectro similar al del nataxazol (Fig. 31c) y con una movilidad de 6'8 min (**3**) (Fig. 30b y c).

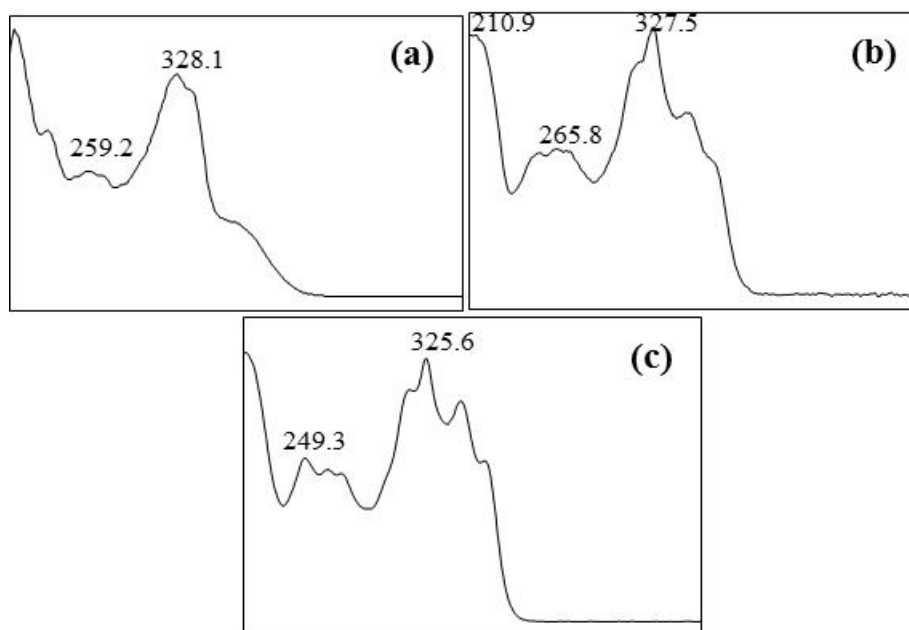


Figura 31. Espectro de absorbancia de: **a)** compuesto **2**, movilidad de 5'7 min. **b)** nataxazol (**1**). **c)** compuesto **3**, movilidad de 6'8 min.

Seguidamente, se analizaron los extractos anteriores mediante HPLC-MS. El compuesto con tiempo de retención en UPLC de 5'7 min (**2**) presenta una masa de 417 m/z $[M+H]^+$ (Fig. 32a), 16 unidades más que el nataxazol (Fig. 32b). Mientras que este mismo análisis nos permitió ver que el compuesto con tiempo de retención de 6'8 min (**3**) tiene una masa de 387 m/z $[M+H]^+$ (Fig. 32c), 14 unidades menos que el nataxazol.

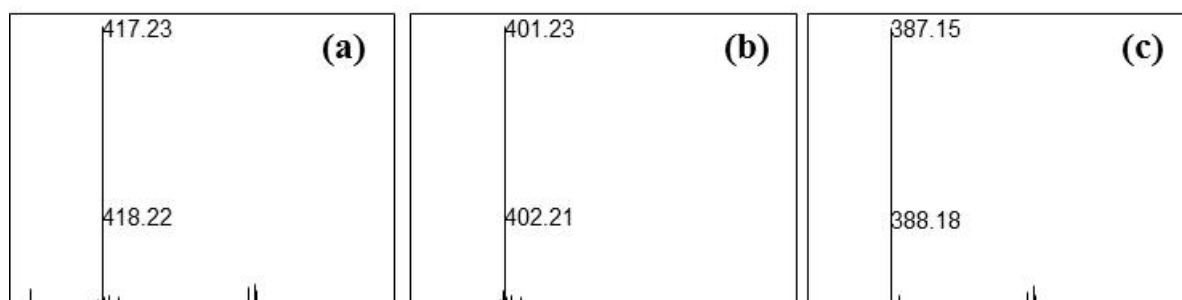


Figura 32. Cromatograma de masas de **a)** compuesto **2**, **b)** nataxazol (**1**) y **c)** compuesto **3**.

3.2.1 Expresión heteróloga de *natPK* en *S. albus* J1074.

Tras demostrar la implicación de NatPK en la biosíntesis del nataxazol, se procedió a realizar su expresión heteróloga en *S. albus* J1074 con el objetivo de

confirmar su implicación en la biosíntesis del 6-MSA. Para ello, se utilizó la construcción pnatPK (aptdo 2.17.2.1) obtenida a partir del plásmido multicopia pEM4T.

Después de obtener el plásmido, se siguieron los pasos de conjugación de esporas de *S. albus* J1074 (aptdo 2.11.2). Tras la obtención de colonias transconjugantes, se analizó la producción por UPLC observándose la presencia de un compuesto con tiempo de retención de 3'68 min, el cual no aparece en el control, *S. albus* J1074 con el plásmido pEM4T (Fig. 33a y b). El espectro de absorción de este compuesto (Fig. 33c) se comparó con el descrito por Puel y colaboradores (2005) para 6-MSA viéndose que los espectros eran idénticos. Finalmente, se analizó por HPLC-MS y la masa obtenida, 153 m/z $[M+H]^+$ (Fig. 33d), es la misma que la esperada para el 6-MSA. Por lo tanto se demuestra que NatPK es la encargada de la biosíntesis del 6-MSA.

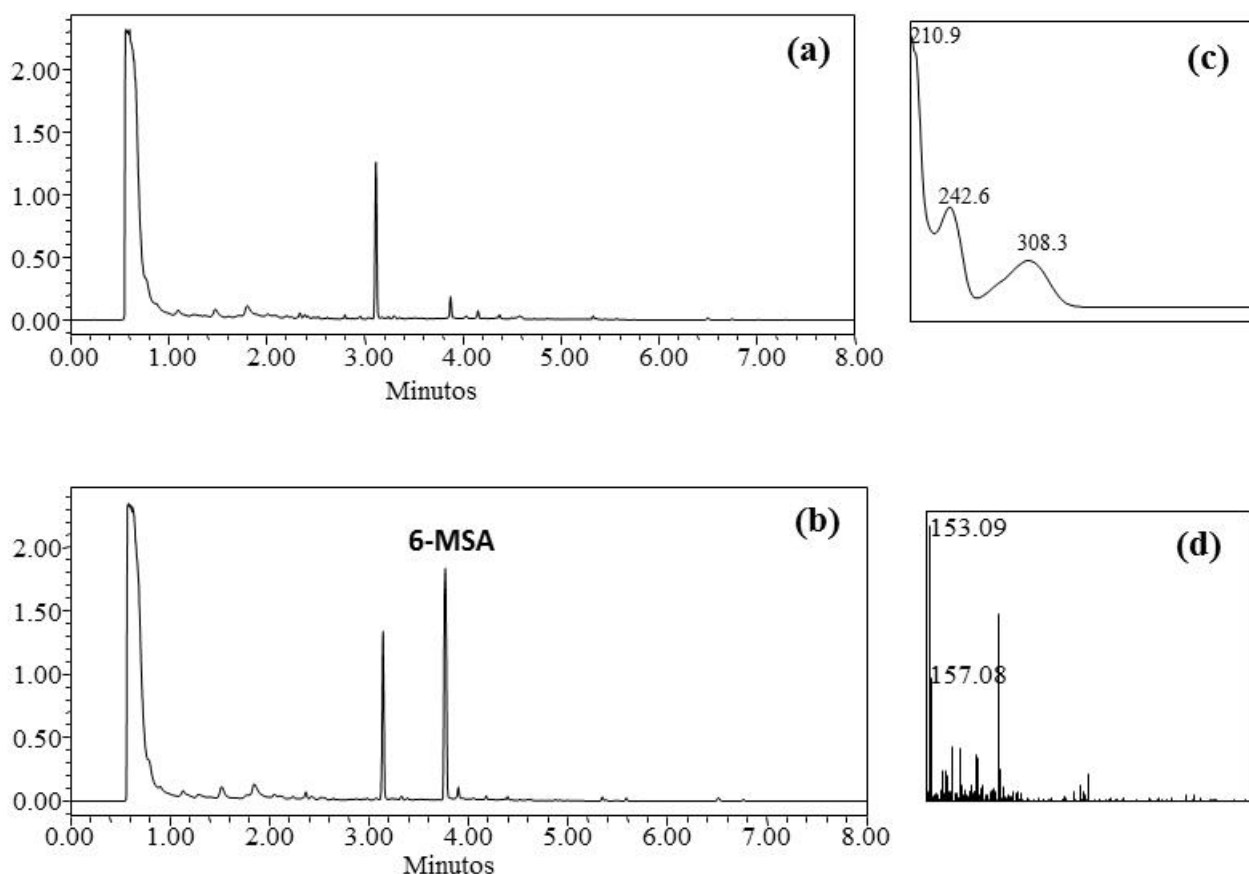


Figura 33. a) *S. albus* J1074 + pEM4T. b) *S. albus* J1074 + pnatPK. c) Espectro de absorbancia de 6-MSA observado en la *S. albus* J1074 + pnatPK. d) Espectro de masas del compuesto.

3.2.2 Complementación del mutante Δ natPK.

Para recuperar la producción de nataxazol en el mutante Δ natPK se realizaron dos tipos de complementación. Primero, se intentó una complementación genética donde se introdujo el gen completo bajo el control del promotor constitutivo *ermE***p* en la cepa mutante. Para ello se utilizó el mismo plásmido que en la expresión heteróloga, pnatPK. El resultado de esta estrategia no fue completamente positivo pues aunque se recuperó la producción de nataxazol en algunas de las colonias seleccionadas ésta era inferior al de la cepa silvestre. Por otro lado, la mayoría de las colonias analizadas no recuperaban la producción de nataxazol.

A continuación, se procedió a realizar una complementación química. Para ello, se cultivaron las cepas *S. albus* J1074/pnatPK y *S. albus* J1074/pEM4T en R5A sólido para obtener sus correspondientes extractos. A los extractos se les eliminó el solvente y se resuspendieron las muestras en 250 μ l de DMSO:metanol. 50 μ l se analizaron por UPLC para observar que el proceso de producción de 6-MSA había sido correcto. El resto de los extractos se utilizó para experimentos de bioconversión usando la cepa mutante Δ natPK. A cultivos de 24 horas de Δ natPK crecido en R5A se añadieron los extractos correspondientes y tras 48 horas adicionales de incubación se realizaron extracciones para ser analizadas por UPLC. El resultado obtenido fue la recuperación de la producción de nataxazol en la cepa Δ natPK a la cual se le había añadido el extracto procedente del cultivo *S. albus* J1074/pnatPK que contiene 6-MSA (Fig. 34b). Por el contrario en el cultivo al cual se le adicionó el extracto procedente de *S. albus* J1074/pEM4T (control) no hubo recuperación de la producción de nataxazol (Fig. 34a).

Esto nos confirma que el producto de NatPK, 6-MSA, es uno de los precursores biosintéticos del nataxazol.

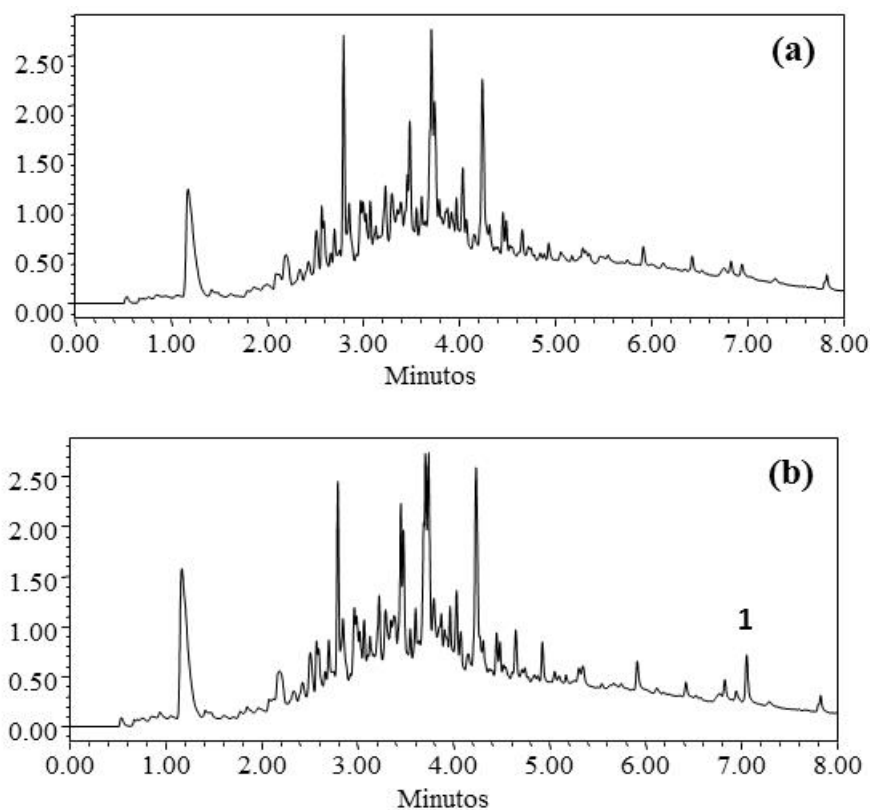


Figura 34. Cromatogramas donde se observa **a)** la ausencia de nataxazol en Δ natPK y **b)** la recuperación de nataxazol (**1**) tras añadir 6-MSA.

3.2.3 Caracterización estructural y bioactividad del compuesto 2.

Con el objetivo de conocer la estructura del compuesto **2** con movilidad en UPLC de 5'7 min, se procedió a su purificación. La purificación se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.19.5. Tras la purificación, se liofilizó el compuesto (0'5 mg) y se envió a la Fundación Medina (Granada) para su caracterización (Datos en Anexo I). El resultado fue un compuesto igual que el nataxazol pero que presenta un grupo hidroxilo adicional en la unidad 6-MSA (Fig. 35). A este compuesto se le ha denominado nataxazol hidroxilado.

3.3 Aislamiento del agrupamiento génico responsable de la biosíntesis del nataxazol.

3.3.1 Construcción de una genoteca a partir de ADN cromosómico.

Con el objetivo de aislar el *cluster 3* se procedió a la construcción de una genoteca. Para ello, se utilizó el ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. Tü 6176, el cósmido pWE15 y la cepa de *E. coli* LE392MP y se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.10 para su obtención. Como resultado se obtuvo una genoteca conformada por un total de 1612 clones que contienen, cada uno de ellos, alrededor de 40 kb de ADN. De esta forma, el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se encuentra representado 7³¹ veces.

3.3.2 Análisis de la genoteca.

A continuación, se procedió al análisis de la genoteca para la localización de cósmidos que contuvieran el *cluster 3* completo. Primero, se realizó una hibridación *in situ* de colonia utilizando una sonda homologa. En este caso, la sonda elegida fue un fragmento de *natPK* de 1'1 kb obtenido a partir de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos PKS1Ta y PKS1Tb (Tabla 9).

Las 1612 colonias se transfirieron a una membrana de nailon para realizar la hibridación. La utilización de la sonda *natPK* dio como resultado 9 colonias positivas: cos2A6, cos5B3, cos5B4, cos5G9, cos6E8, cos6H1, cos10H11, cos11D3 y cos17D4.

Con la intención de localizar cuál de ellos poseían el agrupamiento génico completo, se aislaron los cósmidos y se digirieron BamHI para, posteriormente, realizar dos Southern blot. En el primero de ellos se utilizó la sonda *natPK* utilizada en la hibridación *in situ* (Fig. 36a) donde se pudo observar que los fragmentos BamHI positivos presentaban tamaños muy semejantes por lo que posiblemente los cósmidos se encontraran solapados.

El segundo Southern blot se realizó utilizando una sonda constituida por un fragmento de 800 bp de *natAN* (*cf54_07345*), localizado en el *cluster* 3, amplificado por PCR con los *primers* COA1547 y COA318D (Tabla 10). En este segundo Southern blot (Fig. 36b), solamente, cuatro de los nueve cósmidos dieron positivo: *cos2A6*, *cos6E8*, *cos6H1* y *cos11D3*.

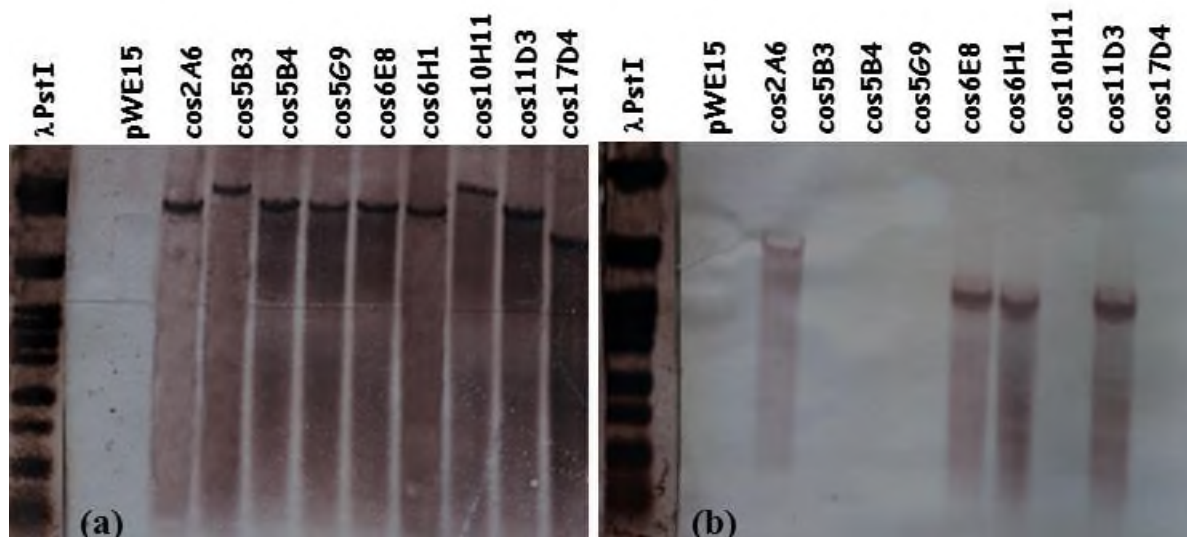


Figura 36. a) Southern blot con la sonda de *natPK* de las 9 colonias positivas en la hibridación *in situ*. b) Southern blot con la sonda *natAN* de las 9 colonias positivas. Marcador de tamaño molecular el ADN del fago λ digerido con la enzima PstI.

A continuación, de estos cuatro cósmidos se secuenciaron sus extremos utilizando los cebadores pWE15fw y pWE15rv (Tabla 11), los cuales anillan a los lados de la diana BamHI del vector pWE15, con el objetivo de encuadrar los cósmidos dentro de la secuencia del genoma del productor de nataxazol.

Se observó que los cuatro cósmidos tienen el agrupamiento génico 3 completo. Los *cos6H1* y *cos11D3* contienen la misma región. Por lo tanto, se decidió trabajar con el cósmido *cos6E8* ya que presenta el *cluster* centrado codificando el primer gen (*upstream*) que se encuentra una hipotética dehidrogenasa/reductasa a la que se ha denominado *orf-6* y siendo la última (*downstream*) una sintasa de ácidos grasos poliinsaturados a la que se ha denominado *orf+1* (Fig. 37).

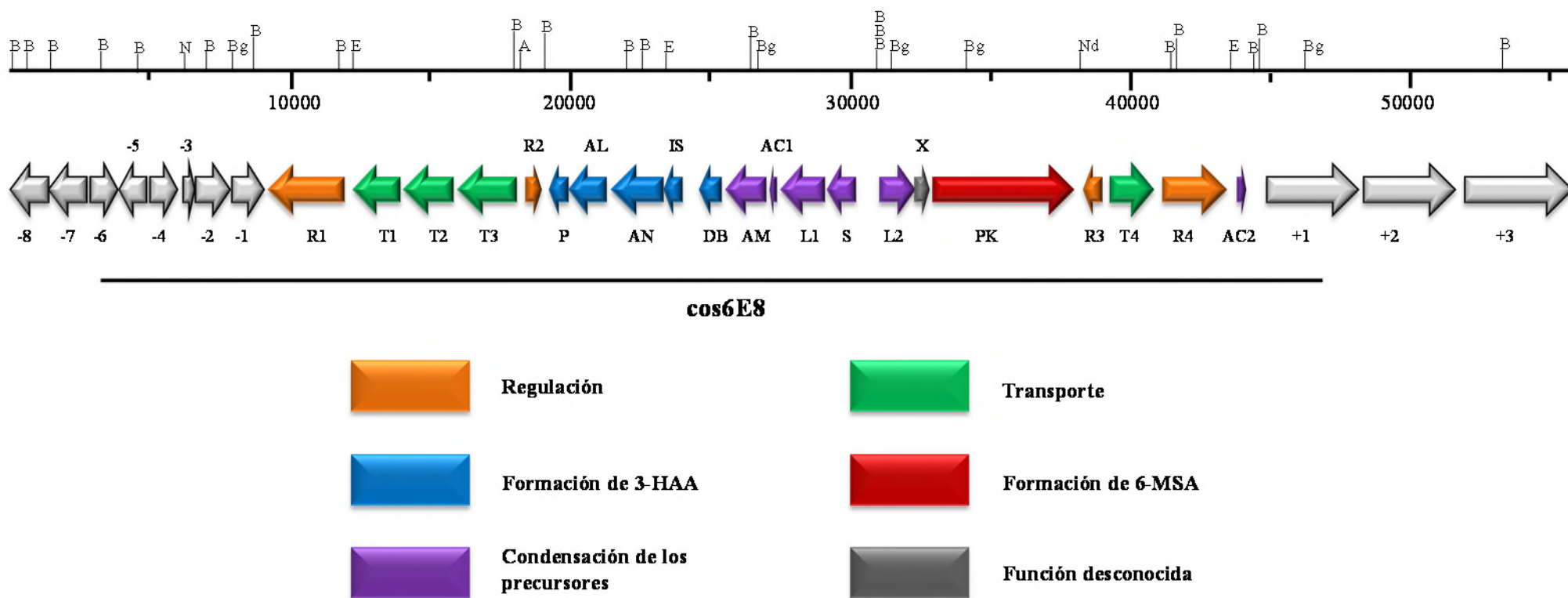


Figura 37. Agrupamiento génico implicado en la biosíntesis de nataxazol.

Sitios de restricción. A: AvrII; B: BamHI; Bg: BglIII; E: EcoRI; N: NsiI y Nd: NdeI

Para finalizar, la secuencia completa de este cósmido fue depositada en el GenBank siendo su número de acceso LN7138664.

3.4 *Cluster 3: Agrupamiento génico implicado en la ruta de biosíntesis del nataxazol.*

Tras haber localizado el *cluster* completo en el cósmido cos6E8 (Fig. 37), se llevó a cabo un análisis de los genes que contiene y así poder realizar una hipótesis de la ruta de biosíntesis de nataxazol.

Mediante la inactivación de *natPK* se ha podido demostrar su implicación en la ruta de biosíntesis de nataxazol, y mediante su expresión heteróloga en *S. albus* J1074, sabemos que su producto final es el 6-MSA. El gen *natPK* codifica una PKS tipo I iterativa la cual presenta un módulo con cinco dominios (Fig. 38): cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT), tioester hidrolasa (TH), cetoreductasa (KR) y ACP (proteína transportadora de grupos acilos) de los cuales el dominio TH está relacionado con la liberación de 6-MSA (Moriguchi *et al.*, 2010). Tal como se mencionó anteriormente, NatPK presenta similitud con ChIB1 de la ruta de biosíntesis de la clorotricina (Jia *et al.*, 2006) y con PokM1 (53/62) de la ruta de biosíntesis de la poliketomicina (Daum *et al.*, 2009).

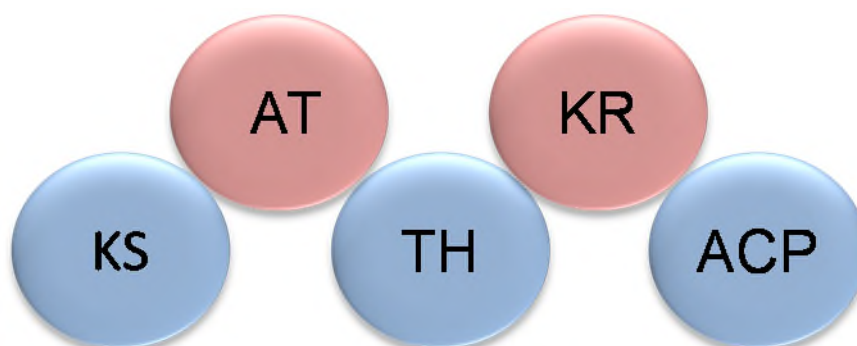


Figura 38. Dominios de la PKS tipo I iterativa NatPK

NatPK cataliza la condensación de una molécula de acetil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA que dará lugar a 6-MSA (Fig. 39a). En el cluster de biosíntesis de nataxazol se localiza *natP* (*cf54_07330*) que codifica para 4'-fosfopanteinil transferasa

(4'-PPT) que podría estar implicada en la modificación post-traducciona del dominio ACP de NatPK. Las PPTs están implicadas en la unión covalente del motivo 4'-PPT del coenzima A al dominio ACP de PKSs, funcionando este motivo finalmente como transportador de la cadena policetídica (Lambalot *et al.*, 1996). Además de *natP*, en el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se localizan cuatro genes adicionales que codifican 4'-PPTs: *cf54_16675*, *cf54_17390*, *cf54_17450* y *cf54_07455*.

El segundo precursor de la biosíntesis de nataxazol sería 3-HAA, el cual es necesario para la formación del anillo benzoxazol tal como proponen Wu y colaboradores (2011) en la biosíntesis del benzoxazol calcimicina. En el *cluster* 3, se localizan cuatro genes relacionados con la biosíntesis de 3-HAA: *natAL* (*cf54_07335*), *natAN* (*cf54_07345*), *natIS* (*cf54_07350*), y *natDB* (*cf54_07355*). NatAL corresponde a una 3-deoxi-D-arabinosa-heptulosónico 7-fosfato sintasa (o aldolasa), encargada de iniciar la biosíntesis de corismato a partir de la eritrosa-4-fosfato en la ruta de biosíntesis del sikimato (Ikeda, 2006). Presenta homología con EsmA6 (61/71) de la ruta de la safenamicina (Rui *et al.*, 2012), CalB4 (43/53) de la ruta de biosíntesis de la calcimicina (Wu *et al.*, 2011) y TomC (39/48) de la ruta de biosíntesis de la tomaimicina (Li *et al.*, 2009). En el genoma se ha localizado una 3-deoxi-D-arabinosa-heptulosónico 7-fosfato sintasa (*cf54_24340*) adicional la cual probablemente se encuentre implicada en la ruta del sikimato del metabolismo primario.

El gen *natAN* (*cf54_07345*) codifica para antranilato sintasa que modificaría el corismato generando 2-amino-2-deoxiisocorismato (ADIC) (Fig. 39b). La antranilato sintasa del *cluster* 3 presenta similitud con EsmA5 (60/70), antranilato sintasa del *cluster* de la safenamicina, CalB1 (56/70), implicada en la ruta de biosíntesis del benzoxazol calcimicina y con las antranilato sintasas de la ruta de la tomaimicina, TomD (46/59) y TomP (36/47). En el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se han localizado dos genes que codifican antranilato sintasas adicionales, *cf54_24325* y *cf54_24750*.

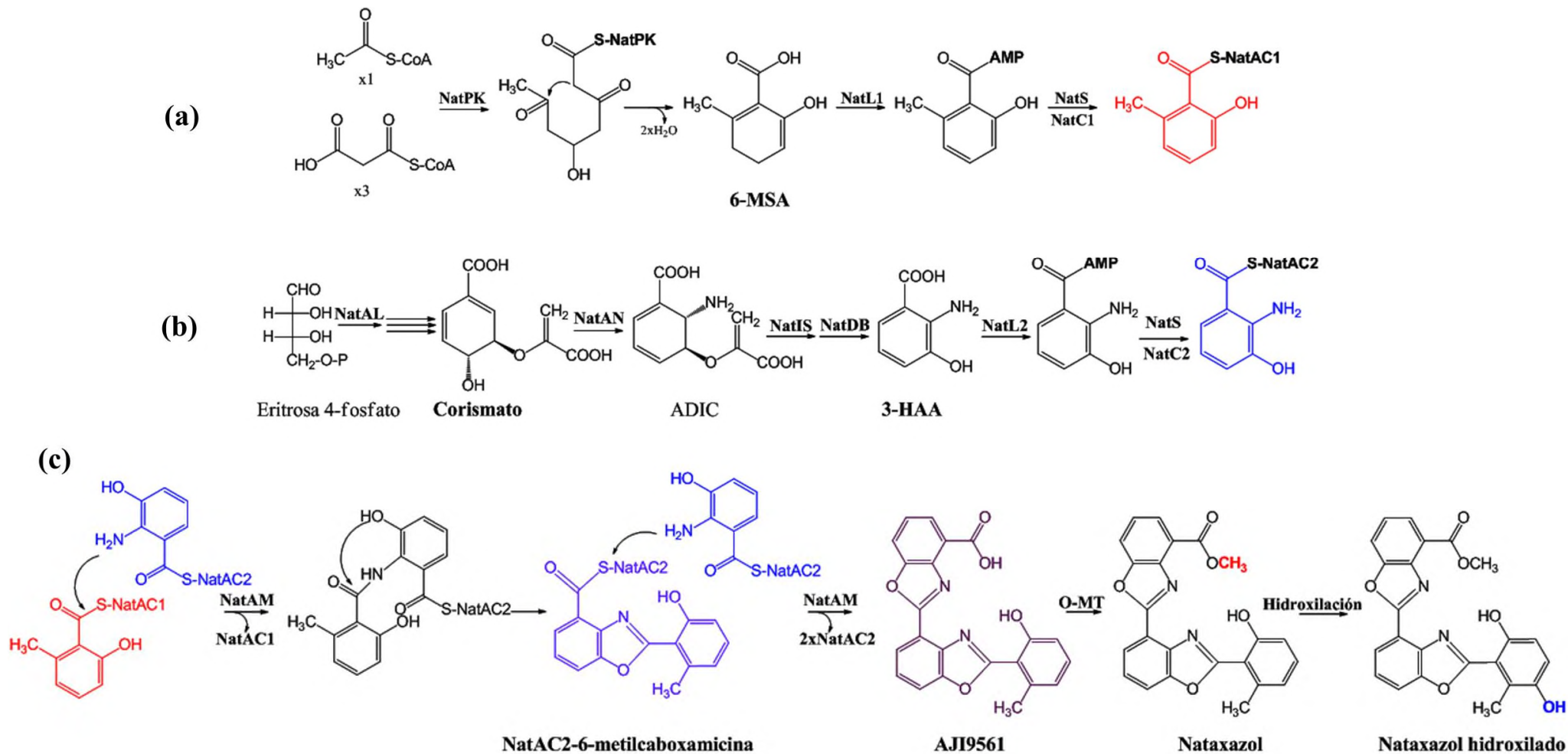


Figura 39. a) Biosíntesis de 6-MSA y su activación. b) Biosíntesis de 3-HAA y su activación. c) Ensamblaje de los precursores para dar lugar a nataxazol y nataxazol hidroxilado.

Para la biosíntesis de 3-HAA, ADIC sería transformado en *trans*-2,3-dihidro-3-hidroixantranilato por la isocorismatasa NatIS (CF54_07350). NatIS presenta similitud con EsmA4 (69/77) y CalB2 (61/68). En el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se puede localizar al menos otro gen que codifica una isocorismatasa (*cf54_12675*) situado en el *cluster* 10. A continuación actuaría NatDB (CF54_07355), 2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dehidrogenasa, dando lugar, finalmente, a 3-HAA (Fig. 39b). NatDB presenta similitud con CalB3 (56/68) que participa en la biosíntesis de calcimicina. Al igual que en el caso de la isocorismatasa, se ha localizado otro gen que codifica una 2,3-dihidroxibenzoato 2,3-dehidrogenasa en el *cluster* 10.

En el *cluster* de nataxazol se localizan dos genes que codifican AMP sintetetasas y ligasas, *natL1* y *natL2*. NatL1 (CF5_07370) tiene similitud con la 6-MSA adenilasa EsmD2 (59/73), con la 3-hidroxipicolinico AMP sintetasa y ligasa de *Streptomyces virginiae* VisB (55/69) y con la salicilil-AMP ligasa de *Streptomyces griseoflavus* Tü4000 SSRG_01316 (60/71). Este tipo de enzimas presentan un dominio de unión AMP formado por los residuos LSGGxTxxxK (de Crécy-Lagard *et al.*, 1997). NatL1 presenta este dominio característico (Fig. 40). Probablemente, NatL1 se encargué de la formación del complejo AMP-6-MSA (Fig.39a). Por otro lado, NatL2 (CF5_07380) presenta similitud con sintetetasas de coenzima F390 como la bagremicina sintetasa FevW (53/67) de *Streptomyces* sp. WK-5344 (BAM73635.1) o con BagE de *Streptomyces* sp. Tü 4128 (53/66) (AGM38213.1). NatL2 se encargaría de formar el complejo AMP-3HAA (Fig. 39b).

NatL1	-----P--LPEPDASDVAF FL LSGGTTALPKLI PRTHDDYVYMS-GRAAAVCELAEDD	240
EsmD2	AAADPSGSASFAPDPADVAFFLLSGGTTALPKLI PRTHDDYVYMM-RAAVEAIRLTEND	240
Salc-AMP	---DPEAGAPFPVLDPSDVAFFLLSGGTTALPKLI PRTHDDYTYQV-RAAGSATALTERD	240
VisB	-----PVALPEPDASDVAF FL LSGGTTALPKMI PRTHDDYAYQT-RI TAGICELGEDT	240
EntE	-----PSEFAEPDPSDVAFFLLSGGTTALPKLI PRTHDDYLYQA-RTAASVCELTGDD	240
NatL2	DLRD-QYPFGMLAVGREHLATYHES SGTAGEPTASYTEEDWTDLAERFARKWTG IHP SD	240
BagE	DLRD-SYPFGMLGVPRERLAS YHES SGSTGNPTPAYFTEAEWTDLADRFVVRKTVPLG PQ D	240
FevW	DLRD-SYPFGMLGVPRERLAS YHES SGSTGNPTPAYFTEAEWTDLADRFVVRKTVPLG PE D	240

Figura 40. Alineamiento parcial de NatL1 y NatL2 frente a otras sintetetasas y ligasas dependientes de AMP: EsmD2 (*S. antibioticus*), Salc-AMP (SSRG_01316, *S. griseoflavus* Tü4000), VisB (*S. virginiae*), EntE (*Saccharopolyspora spinosa*). BagE (*Streptomyces* sp. Tü 4128), FevW (*Streptomyces* sp. WK-5344)

Por otro lado, el agrupamiento génico de biosíntesis de nataxazol presenta dos genes que codifican proteínas con similitud a ACPs, NatAC1 (CF5_07365) y NatAC2 (CF54_07410), y una similar a β -cetoacil-ACP sintasas, NatS (CF5_07375). NatS presenta similitud con EsmD1 (50/68), ChIB3 (38/56) y PokM2 (33/53). Este enzima se encargaría de transferir 6-MSA de AMP-6-MSA a NatAC1, liberándose AMP y formando el complejo NatAC1-6-MSA (Fig. 39a). NatAC1 presenta similitud con EsmD3 (56/70) y se caracteriza por presentar el dominio típico ACPs, LGx(H/D)SL (Marahiel *et al*, 1997) (Fig. 41). Por otro lado, NatAC2 presenta similitud con SSRG_01320 (78/87) de *S. griseoflavus* Tu4000. NatS sería también el encargado de la activación de 3-HAA uniéndolo a NatAC2 a través de la forma activada AMP-3HAA, proceso en el cual se liberará AMP formándose el complejo NatAC2-3HAA. De esta manera, ambos precursores se encontrarían activados y preparados para su condensación.

```

NatAC1      M-DITAFP-----TEDELRATVAPVLGLAPERIEPDASIVLLGLSSLEIMRLVSRWR 60
EsmD3        M----ADE-----PVSTSDQVRTAVAALIGTAPHDIPGDANLVFLGLGSLDVMRLSSRWR 60
ACP          MAGTRAARTVPRTSPLSADELRQEIADVLGVQADTI PGDAHLVHLGLGSLIEMRLATRWR 60
NatAC2      MVKITAAE-----AQKWLIDEIAQRLGTDPSQVPPDQYFDELDLDSTAALIIAGEME 60
SSRG         MGKVTADE-----VQKWLIEKIAERLGEQPSAIPPGQYFDELDMDSTEALIIAGEME 60

```

Figura 41. Alineamiento de NatAC1 y NatAC2 frente a otras ACPs: EsmD3 (*S. antibioticus*), PP (WP_031508997.1, *S. megasporus*), SSRG (SSRG_01320, *S. griseoflavus* Tu4000)

A continuación, se producirá la condensación de ambos precursores en su forma activada, NatAC1-6-MSA y NatAC2-3HAA, para formar el primer domino benzoxazol. Para ello, ocurrirá un ataque nucleofílico del grupo amino de 3-HAA hacia el grupo tiol de NatAC1-6-MSA, liberando NatAC1, y dando lugar al intermediario de la ruta NatAC2-6-metilcaboxamicina (Fig.39c). La liberación de la ACP podría ocurrir de forma espontánea (Wu *et al*, 2011) o participar en el proceso NatAM. El gen *natAM* (*cf54_07360*) codifica una amidohidrolasa que presenta similitud con enzimas de otros *Streptomyces* spp. como la amidohidrolasa (63/71) de *S. megasporus* (WP_031508998.1). Este tipo de enzimas se caracterizan por estar involucradas en la rotura de enlaces C-N o P-O (Seibert y Raushel, 2005), habiéndose comprobado

recientemente que pueden intervenir en la rotura de enlaces C-S (Duarte *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2014).

Seguidamente, la segunda unidad activada NatAC2-3HAA atacaría con su grupo amino al grupo tiol de NatAC2-6-metilcaboxamicina, liberándose la ACP. Posteriormente la segunda ACP podría ser liberada mediante la actividad amidohidrolasa de NatAM, formando el intermediario AJI9561. Este compuesto es un benzoxazol conocido y descrito por Sato y colaboradores (2001) y es estructuralmente muy semejante al nataxazol. AJI9561 se metilaría para dar finalmente nataxazol (Fig.39c). En el agrupamiento génico 3 no se ha localizado ningún gen que presente similitud con metiltransferasas (Fig. 37). Sin embargo, *natX* es un gen con función desconocida y cuyo producto deducido no presenta similitud con ninguna proteína previamente descrita. Por otro lado, en el *cluster* de biosíntesis de nataxazol tampoco se ha identificado ningún gen que codifique la posible hidroxilasa necesaria para transformar nataxazol en nataxazol hidroxilado (Fig. 39c).

Observando el agrupamiento génico (Fig. 37) se puede apreciar que a ambos lados de los genes estructurales nos encontramos genes que codifican proteínas implicadas en transporte y genes que codifican reguladores transcripcionales. Con respecto a los genes de transporte se han identificado cuatro posibles genes: *natT1* (*cf54_07310*), *natT2* (*cf54_07315*), *natT3* y *natT4* (*cf54_07395*). NatT1 y NatT2 presentan similitud con transportadores transmembrana ABC tipo III. Estos transportadores se caracterizan por presentar un dominio hidrofílico de unión a ATP y actividad ATPasa y un dominio hidrofóbico transmembrana (Méndez y Salas, 2001). NatT1 y NatT2 pueden formar un sistema de transporte heterodímero con dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP. El *software* de predicción de hélices transmembrana TMHMM Server v2.0 (Krogh *et al.*, 2001) muestra que NatT1 contendría 5 hélices transmembrana mientras que NatT2 presentaría 6 hélices (Fig. 42a y b).

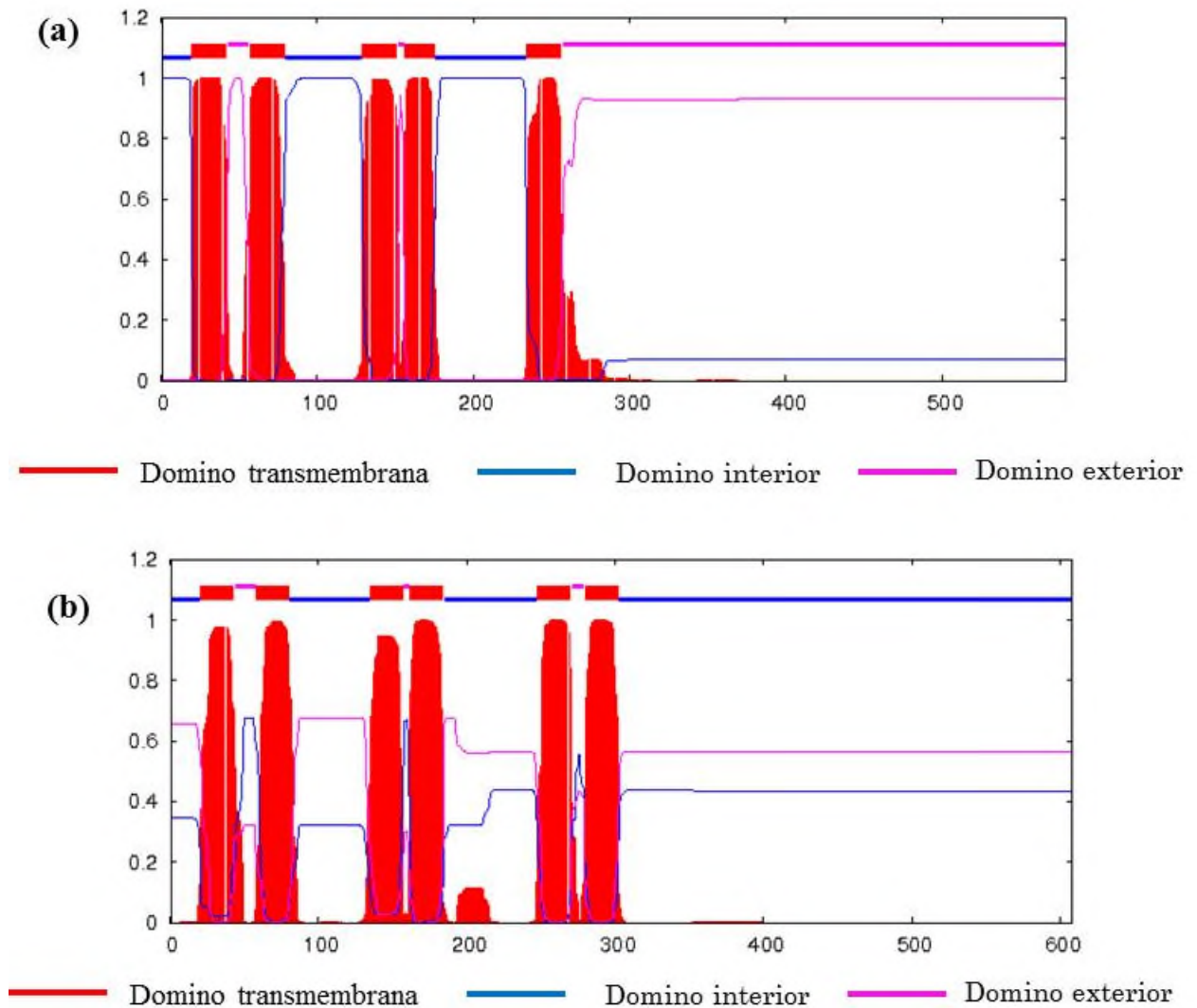


Figura 42. a) Gráfico de dominios transmembrana de NatT1. b) Gráfico de dominios transmembrana de NatT2.

Por otro lado, NatT3 correspondería a una proteína transportadora con un dominio MMPL (*Mycobacterial Membrane Protein Large*). Este tipo de proteínas pertenecen a la familia de proteínas transportadoras RND implicadas en la resistencia a drogas, la nodulación e incluso, la división celular. Algunas de estos transportadores se encuentran cerca de *clusters* de biosíntesis de policétidos (Domenech *et al.*, 2005). NatT3 contendría 12 hélices transmembrana (Fig.43a). Los genes *natT1*, *natT2* y *natT3* se transcriben en la misma orientación (Fig. 37) lo que podría indicar que sus productos actúan conjuntamente en el sistema de transporte. El último transportador codificado por un gen del *cluster* 3 es NatT4 (CF54_07395) el cual presenta similitud con transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y con transportadores de

resistencia a drogas de la familia EmrB/QacA (TIGR00711). NatT4 presenta similitud con Lcz38 del cluster de biosíntesis de lactonamicina Z (Zhang *et al.*, 2008) y está conformado por 14 hélices transmembrana (Fig. 43b).

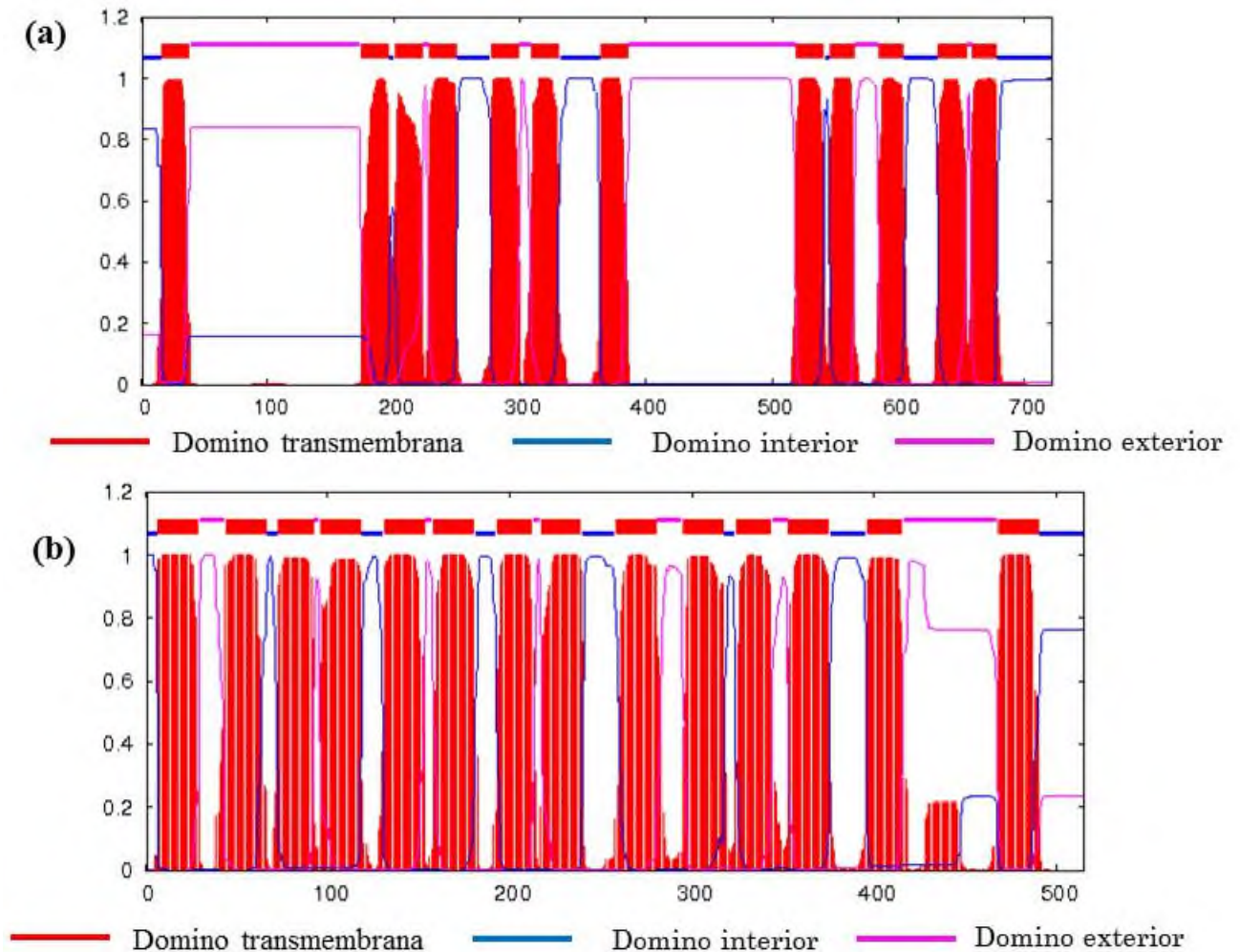


Figura 43. a) Gráfico de los dominios transmembrana de NatT3. b) Gráfico de los dominios transmembrana de NatT4.

Finalmente, los cuatro genes que codifican reguladores transcripcionales se encuentran flanqueando al agrupamiento génico. NatR1 (CF54_07305) corresponde a un regulador de la familia LuxR el cual presenta un dominio HTH (hélice-giro-hélice), además tiene similitud con EsmT2 (46/58) de la ruta de biosíntesis de la safenamicina. A continuación, encontramos dos reguladores de la familia TetR codificados por los genes *natR2* (*cf54_07325*) y *natR3* (*cf54_07390*). Este tipo de reguladores en actinomicetos están descritos generalmente como represores (Ramos *et al.*, 2005). El último gen regulador que localizamos en el *cluster* es *natR4* (*cf54_07400/cf54_07405*)

el cual codifica un regulador transcripcional de tipo SARP. Presenta homología con reguladores AfsR de diferentes actinomicetos y contiene un dominio BTAD (dominio bacteriano de activación transcripcional). Además, *natR4* contiene un codón TTA que determinaría un nivel superior de regulación (pleiotrópico) necesario para desencadenar la biosíntesis del nataxazol, a través del gen regulador *bldA* que codifica un ARNt-Leu (Chater y Chandra, 2008).

El agrupamiento génico presente en cos6E8 completo no solo se encuentra en *Streptomyces* sp. Tú 6176 sino que también está presente en *Streptomyces* sp. PsTaAH-124, con una similitud de entorno al 99% en casi todos los genes del *cluster* (Tabla 16). Además, Udvary y colaboradores (2011) han descrito un *cluster* muy similar en la cepa *Frankia* sp. EAN1pec. La comparación entre el *cluster* de *Streptomyces* sp. Tú 6176 y el *cluster* FE20 de *Frankia* sp. EAN1pec muestra la gran similitud existente entre ambos (Fig. 44). Se puede observar que una de las principales diferencias entre ambos *clusters* es la ausencia del gen ortólogo a *natDB*, sin embargo, cuando se analiza el *cluster* por separado tanto por antiSMASH como por Blastx, en esa región presenta homología con dehidrogenasas tipo NatDB. Por otro lado, Udvary y colaboradores (2011) proponen una estructura basada en dos anillos aromáticos, de los cuales ninguno corresponde a 6-MSA (Fig. 45).

Tabla 16. Comparación de los productos deducidos a partir de los genes identificados en la secuencia de cos6E8.

Gen	Localización Secuencia genómica CF54_	Localización cos6E8	aa ^a	Función propuesta	Proteína más similar (% Identificación/ Similitud) origen
<i>orf-6</i>	NA ^b	CEK42805.1	176 ^c	Dehidrogenasa/reductasa	WP_018564658.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf-5</i>	NA ^b	CEK42806.	352	Sarcosina oxidasa	WP_018564657.1 (99/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf-4</i>	07280	CEK42807.1	333	Regulador SARP	WP_018564656.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf-3</i>	07285	CEK42808.1	139	Hipotética ciclasa/dehidrasa	WP_018564655.1 (98/98) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf-2</i>	07290	CEK42809.1	413	Ornitina aminotransferasa	WP_018564654.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf-1</i>	07295	CEK42810.1	385	Tioester reductasa	WP_018564653.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natR1</i>	07305	CEK42811.1	935	Regulador LuxR	WP_018564652.1 (99/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124

					Franean1_3551 (40/53), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natT1</i>	07310	CEK42812.1	579	Transportador ABC	WP_018564651.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3554 (65/77), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natT2</i>	07315	CEK42813.1	608	Transportador ABC	WP_018564650.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3553 (62/73), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natT3</i>	NA ^b	CEK42814.1	722	Transportador MMPL	WP_018564649.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_6797 (49/66), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natR2</i>	07325	CEK42815.1	198	Regulador TetR	WP_018564648.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natP</i>	07330	CEK42816.1	236	4'-PPT transferasa	WP_018564647.1 (98/98) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natAL</i>	07335	CEK42817.1	460	DHAP ^e sintasa,	WP_018564646.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natAN</i>	07345	CEK42818.1	636	Antranilato sintasa	WP_018564645.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3620 (64/72), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natIS</i>	07350	CEK42819.1	230	Isocorismatasa	WP_018564644.1 (99/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3619 (70/78), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natDB</i>	07355	CEK42820.1	274	DHHA dehidrogenasa	WP_018564643.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natAM</i>	07360	CEK42821.1	494	Amidohidrolase	WP_018564642.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3617 (69/80), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natAC1</i>	07365	CEK42822.1	89	ACP	WP_018564641.1 (99/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3616 (66/76), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natL1</i>	07370	CEK42823.1	539	Sintetasa/ligasa dependiente de AMP	WP_018564640.1 (99/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3615 (71/82), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natS</i>	07375	CEK42824.1	350	β -cetoacil-ACP sintasa	WP_018564639.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3614 (80/91), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natL2</i>	07380	CEK42825.1	436	Sintetasa/ligasa dependiente de AMP	WP_018564638.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3613 (76/84), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natX</i>	NA ^b	CEK42826.1	195	Proteína hipotética	Sin similitud
<i>natPK</i>	07385	CEK42827.1	1717	Ácido 6-metilsalicílico sintasa	WP_018564637.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3611 (62/70), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natR3</i>	07390	CEK42828.1	232	Regulador TetR	WP_018564636.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3552 (60/73), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natT4</i>	07395	CEK42829.1	515	Transportador	WP_018564635.1 (100/100)

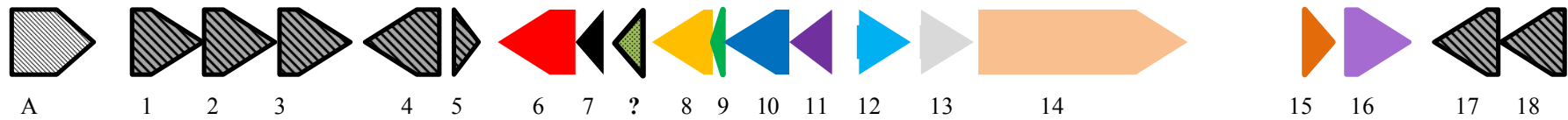
				EmrB/QacA	<i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124 Franean1_3555 (63/77), <i>Frankia</i> sp. EAN1pec
<i>natR4</i>	07400 07405	CEK42830.1	845	Regulador SARP	WP_018564634.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>natAC2</i>	07410	CEK42831.1	88	ACP	WP_018564633.1 (100/100) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124
<i>orf+1</i>	07415		957 ^c	Sintasa de ácidos grasos poliinsaturados	WP_018564632.1 (99/99) <i>Streptomyces</i> sp. PsTaAH-124

Finalmente, el agrupamiento génico 3 se encuentra delimitado *downstream* por la *orf+1* (*cf54_07420*) perteneciente al *cluster* 4 de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Se ha visto que este tipo de genes en γ -proteobacterias implicados en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Valentine y Valentine, 2004). Por el otro lado (*upstream*), el primer gen (*orf-1*, *cf54_07295*) codifica una proteína que contiene un dominio tioester reductasa el cual está presente en la α -aminoadipato reductasa implicada en la biosíntesis de lisina (Ehmann *et al.*, 1999) aunque también se puede encontrar en algunas NRPSs como MxcG de *Stigmatella aurantiaca* (Silakowski *et al.*, 2000). El gen *orf-2* (*cf54_07290*) codifica una ornitina aminotransferasa y *orf-3* (*cf54_07285*) una hipotética ciclasa/dehidrasa la cual contiene un dominio de transporte de lípidos (pfam03364) y policétido ciclasa/dehidrasa. A continuación, *orf-4* (*cf54_07280*) codifica un regulador transcripcional de tipo SARP que presenta similitud con otros reguladores implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios como es el caso de SgvR3 y VmsS implicadas en la biosíntesis de griseoviridina y viridigriseina en *S. griseoviridis* (Xie *et al.*, 2012). El gen *orf-5* codifica una sarcosina oxidasa que podría estar implicada en la producción de glicina (Suzuki *et al.*, 1992). El gen *orf-6* codifica una hipotética dehidrogenasa de cadena corta/reductasa la cual contiene dominio de unión a NAD(P) (IPR016040).

CLUSTER 3 *Streptomyces* sp. Tü 6176



CLUSTER de *Frankia* sp. EANpec1



1: Proteína hipotética

2: Proteína hipotética

3: Proteína con dominio HTH

4: Regulador NrmA

5: Regulador HxlR

6: Antranilato sintasa

7: Isocorismatasa

?: Hipotética dehidrogenasa

8: amidohidrolasa

9: ACP

10: Sintetasa y ligasa dependiente de AMP

11: β -cetoacil-ACP sintasa

12: Sintetasa y ligasa dependiente de AMP

13: Monooxigenasa

14: PKS tipo I iterativa

15: TetR

16: Proteína hipotética

17: Proteína con dominio Cu^{+2}

18: Proteína hipotética

Figura 44. Comparación entre el *cluster* del nataxazol de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y el *cluster* FE20 análogo en la cepa de *Frankia* sp. EAN1pec

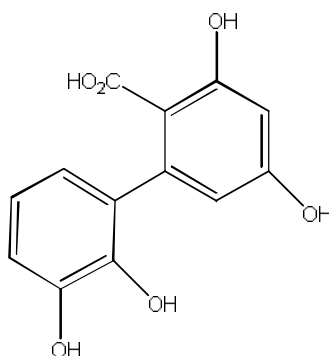


Figura 45. Estructura propuesta por Udworthy y colaboradores (2011) para el producto del agrupamiento génico FE20 de *Frankia* sp. EAN_{pec1} análogo al *cluster* de biosíntesis de nataxazol.

Las funciones de los ortólogos de Orf-1, Orf-2, Orf-5 en la biosíntesis de diferentes amino ácidos indicaría que posiblemente estas proteínas se encuentran implicadas en el metabolismo primario de *Streptomyces* sp. Tü 6176.

3.5 Caracterización del compuesto 3

Tal y como se ha mostrado anteriormente, *Streptomyces* sp. Tü 6176 es capaz de producir un benzoxazol adicional aparte de nataxazol y nataxazol hidroxilado. Este compuesto (**3**) con una movilidad de 6'8 min (Fig. 30) presenta una masa de 387 m/z $[M+H]^+$, y fue observado con más claridad en el mutante Δ natPK. Esto nos indica que su precursor no es 6-MSA.

Hay descritos dos benzoxazoles de origen natural que presentan una masa de 387 m/z $[M+H]^+$, AJI9561, producido por *Streptomyces* sp. AJ9561 (Sato *et al.*, 2001), y UK-1, producido por *Streptomyces* sp. 517-02 (Ueki *et al.*, 1993). Estructuralmente, AJI9561 es muy similar a nataxazol (Fig. 46), presentando ambos una unidad de 6-MSA y dos unidades de 3-HAA, aunque la segunda carece del grupo metoxilo en el caso de AJ9561. UK-1 (Fig. 46c) es también muy similar al nataxazol estando formado por dos moléculas de 3-HAA, la segunda metilada, pero careciendo del grupo metilo de 6-MSA. Esto induce a pensar en el ácido salicílico como posible precursor de UK-1.

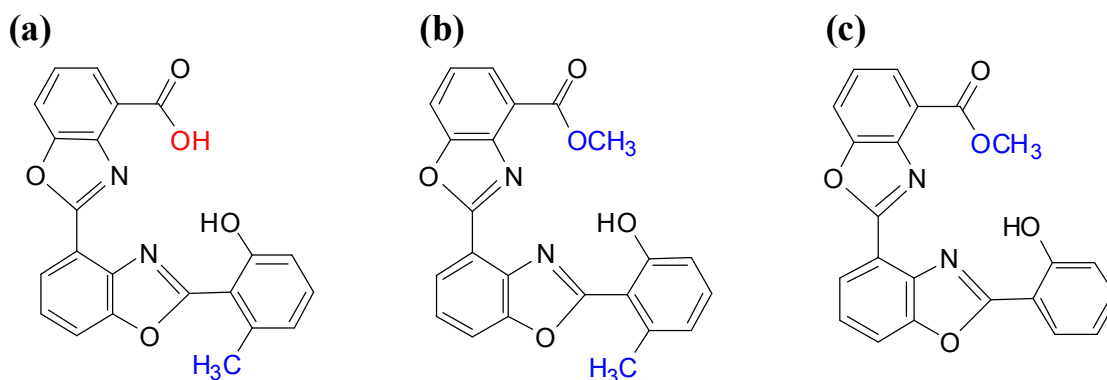


Figura 46. Comparación entre las estructuras del **a)** AJI9561, **b)** Nataxazol y **c)** UK-1.

En base a todos estos datos y a la hipótesis de Ueki y colaboradores (1993), se propuso que el compuesto **3** podía ser UK-1 y que su biosíntesis se deba a la interacción entre dos clusters: el cluster del nataxazol el cual proporciona el 3-HAA y el *cluster 25* el cual como se describió anteriormente posee un gen que codifica una salicilato sintasa (*cf54_20720*), único localizado en el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 con estas características.

3.5.1 Mejora de la producción del compuesto **3**

El principal problema para caracterizar estructuralmente el compuesto **3**, es su escasa producción tanto por parte de *Streptomyces* sp. Tü 6176 como por el mutante Δ natPK. Por lo tanto el primer objetivo para caracterizar este compuesto fue mejorar su producción.

3.5.1.1 Mejora de la producción por adición de posibles precursores.

En primer lugar se procedió a realizar experimentos de bioconversión utilizando el mutante Δ natPK al cual se le añadieron posibles precursores del compuesto **3** para su bioconversión. El primer precursor utilizado, teniendo en cuenta que el compuesto **3** corresponda a UK-1, fue el ácido salicílico, y el segundo precursor fue la caboxamicina, benzoxazol que Hohmann y colaboradores (2009) describieron como parte de otros benzoxazoles más complejos como el UK-1 o el nataxazol.

Para realizar el experimento, se inocularon esporas de Δ natPK en un matraz con TSB que sirvió como preinóculo. Se añadió 1 ml de cultivo a 3 matraces con R5A líquido durante 4 días a 30°C en agitación. Al cuarto día de cultivo a un matraz se le añadió ácido salicílico con una concentración final de 2 mM, a otro caboxamicina con una concentración final de 4 μ g/ml y el tercero se utilizó como control. Se tomó 1 ml de muestra a las 24 horas (5° día de cultivo) para realizar extractos y analizarlos mediante UPLC.

El análisis de la bioconversión de ácido salicílico (**4**) mostró un ligero aumento del compuesto **3** (Fig.47b) y la aparición de un nuevo compuesto (**5**) con una movilidad de 6'02 min y espectro similar al de los benzoxazoles (Fig. 47c). Se analizó la muestra por HPLC-MS y se obtuvo una masa de 373 m/z $[M+H]^+$ lo que correspondería a 14 unidades menos que el compuesto **3** por lo que podría ser un intermediario del mismo. Se tomaron muestra en días sucesivos pero la producción del compuesto **3** no aumento y la producción del compuesto **5** se mantuvo o desapareció.

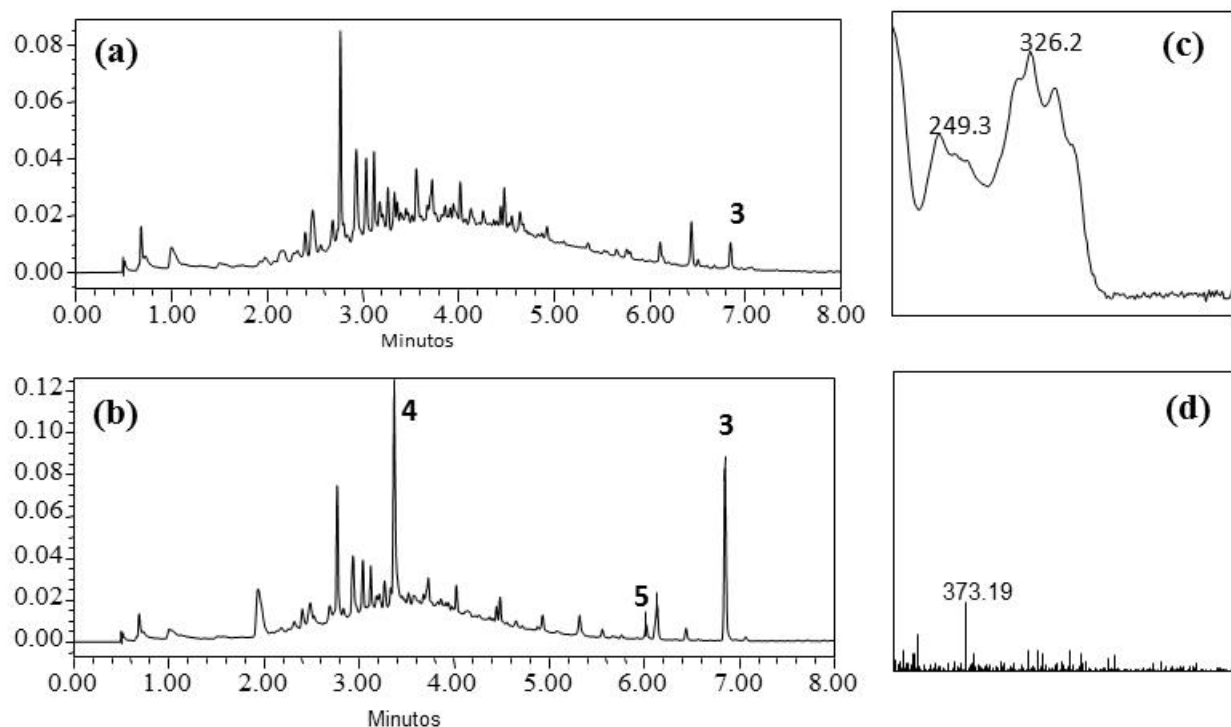


Figura 47. a) Cromatograma de Δ natPK, b) Cromatograma de Δ natPK más ácido salicílico, c) Espectro de absorción del compuesto 5 y d) espectro de masas del compuesto 5.

Por otro lado, el análisis de la bioconversión de caboxamicina (**6**) tampoco mostró el aumento del compuesto **3** (Fig. 48) pero sí la aparición de dos compuestos nuevos con espectro muy parecido a la caboxamicina, uno con tiempo de retención de 4'3 min (**7**) y el segundo con tiempo de retención de 6 min (**8**). El análisis de la muestra por HPLC-MS mostró que el primero presenta una masa de 255 m/z $[M+H]^+$, una unidad menos que la caboxamicina, y el segundo de 270 m/z $[M+H]^+$ 14 unidades más que la caboxamicina lo que podría implicar que ésta habría sido modificada por una metilación, probablemente en el grupo carboxilo.

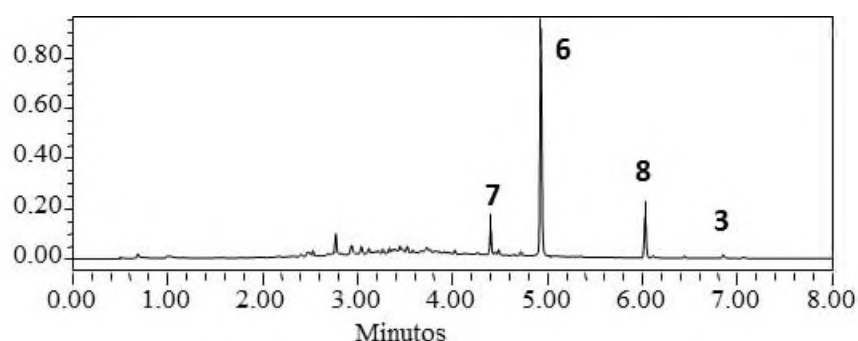


Figura 48. Cromatograma de la bioconversión de la caboxamicina (**6**). Compuesto con movilidad de 4'3 min (**7**), compuesto con movilidad de 6 min (**8**), compuesto con movilidad de 6'8 min (**3**).

3.5.1.2 Mejora de la producción del compuesto **3** por activación del *cluster 25*.

La segunda estrategia para la mejora de la producción del UK-1 fue intentar aumentar la expresión de la salicilato sintasa localizada en el *cluster 25*. El agrupamiento génico **25** (Fig. 49) presenta una alta homología con el *cluster* de biosíntesis del zincóforo coelibactina en *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002; Hesketh *et al.*, 2009). En base al *cluster* de *S. coelicolor* A3(2) el agrupamiento génico **25** debería tener un tamaño de 37 kb y estar conformado por 23 genes, sin embargo en la secuencia del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 muchos de estos genes no se encuentran secuenciados completamente, apareciendo por lo tanto truncados (Fig. 49). Tanto en el trabajo de Bentley y colaboradores (2002) como en el de Hesketh y colaboradores (2009) se

propone una estructura de coelibactina basada en la especificidad de los módulos de adenilación de su NRPS, ya que la estructura del compuesto no ha sido determinada. La coelibactina (Fig. 50) constaría de una molécula de ácido salicílico a la cual se le unirían tres aminoácidos, una treonina y dos cisteínas. Hesketh y colaboradores (2009) observaron que había una mayor transcripción del *cluster* de coelibactina en condiciones limitantes de zinc que cuando este metal estaba presente en las concentraciones habituales en los medios de cultivo utilizados. En base a estos datos y a la homología del *cluster* 25 con el de coelibactina, se decidió utilizar un medio definido (MD) y éste sin zinc (MD-Zn²⁺) para verificar su efecto sobre la producción del compuesto **3** y eventualmente la producción de coelibactina.

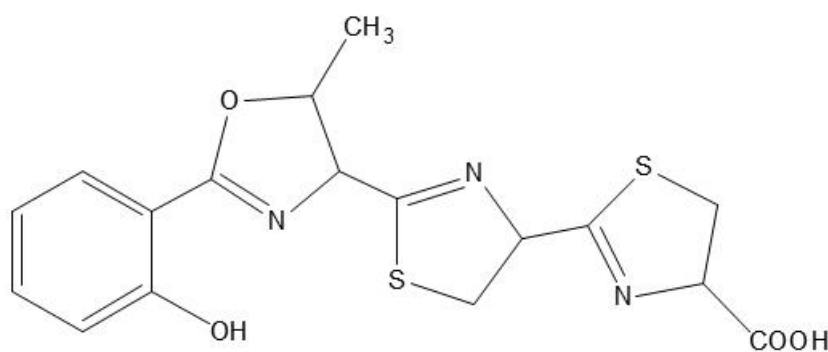
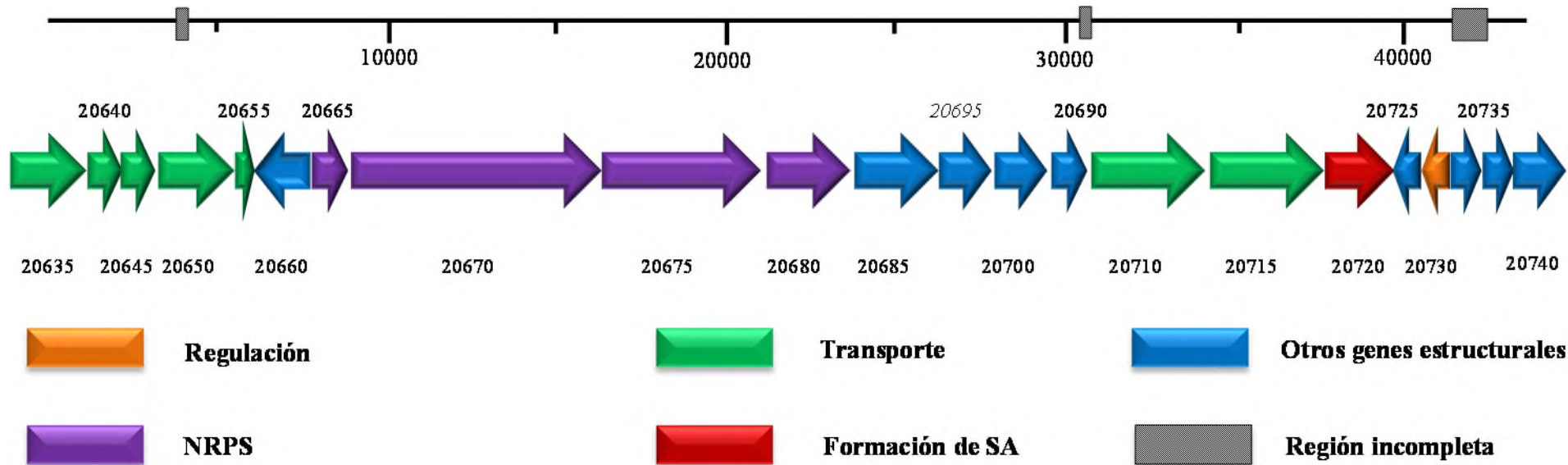


Figura 50. Estructura propuesta por Hesketh y colaboradores (2009).

La cepas utilizadas para observar el efecto de zinc fueron *Streptomyces* sp. Tü 6176 y el mutante Δ natPK. Ambas cepas se cultivaron primero en TSB durante 24 horas a 30°C en agitación, para generar un preinóculo. El preinóculo se lavó tres veces con agua MiliQ estéril al igual que los matraces a utilizar posteriormente para eliminar en su mayor parte las posibles trazas de zinc que pudieran estar presentes. A continuación, se inocularon los medios definidos MD y MD-Zn²⁺ y se siguió el protocolo descrito en el apdo 2.19.1 de Material y Métodos. Las muestras obtenidas a lo largo de los 7 días de incubación se extrajeron con acetato de etilo/1%de ácido fórmico y se analizaron por UPLC.



- *cf54_20635* Proteína transportadora ABC
- *cf54_20640* Proteína de transportadora de membrana
- *cf54_20645* Proteína integral de membrana
- *cf54_20650* Proteína transportadora ABC, unión de ATP
- *cf54_20655* Proteína transportadora ABC, unión de ATP
- *cf54_20660* AMP sintetasa y ligasa
- *cf54_20665* NRPS
- *cf54_20670* NRPS
- *cf54_20675* NRPS
- *cf54_20680* Epimerasa
- *cf54_20685* Oxidoreductasa

- *cf54_20695* Citocromo P450
- *cf54_20700* Oleoil-ACP sintasa
- *cf54_20690* Metiltransferasa tipo 12
- *cf54_20710* Proteína transportadora ABC
- *cf54_20715* Proteína transportadora ABC
- *cf54_20720* Salicilato sintasa
- *cf54_20725* Treonina deshidratasa
- *cf54_20730* Regulador transcripcional MarR
- *cf54_20735* Endoribonucleasa
- *cf54_20735* Endoribonucleasa
- *cf54_20740* Amidohidrolasa/hidrolasa dependiente de Metal

Figura 49. Agrupamiento génico 25 encargado de la biosíntesis del zincóforo coelibactina.

Los resultados obtenidos, en el caso de *Streptomyces* sp. Tü 6176, muestran que en MD el nataxazol (**1**) se produce normalmente mientras que en MD-Zn⁺² su producción se ve notablemente reducida (Fig. 51). En ninguno de los casos, se ve un aumento de la producción del compuesto **3**. Además, en MD-Zn⁺² se observa la aparición de 3 compuestos con un espectro similar al del ácido salicílico (Fig. 51c, d y e). Estos compuestos presentan una movilidad de 2'27 (**9**), 2'36 (**10**) y 3'3 min (**4**), respectivamente (Fig.51c, d y e). El compuesto con movilidad de 3'3 min., presenta el mismo tiempo de retención que el ácido salicílico utilizado en las bioconversiones del apartado anterior (Fig. 47). Se analizaron por HPLC-MS los tres compuestos observándose las masas siguientes: 267 *m/z* [M+H]⁺, 138 *m/z* [M+H]⁺ y 139 *m/z* [M+H]⁺, respectivamente. La masa de 139 *m/z* [M+H]⁺ del compuesto con movilidad de 3'3 min. corresponde a la del ácido salicílico (**4**) al igual que su movilidad.

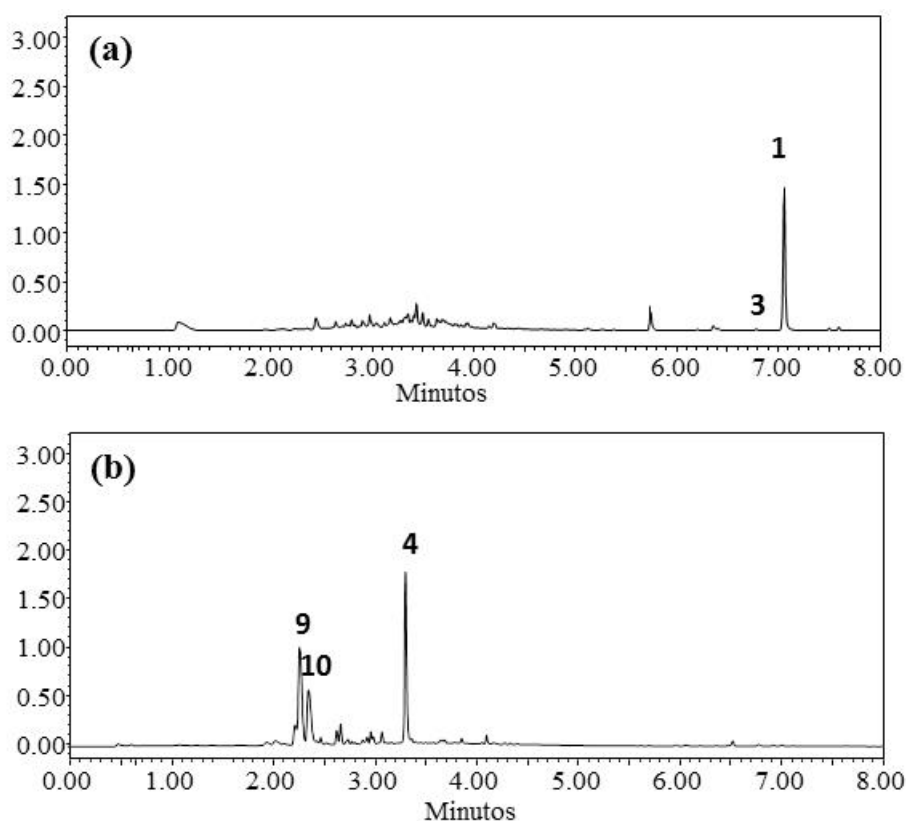


Figura 51. a) Cromatograma de UPLC del extracto obtenido a 5 días de *Streptomyces* sp. Tü 6176 en MD, b) Cromatograma de UPLC del extracto obtenido a 5 días de *Streptomyces* sp. Tü 6176 en MD-Zn⁺².

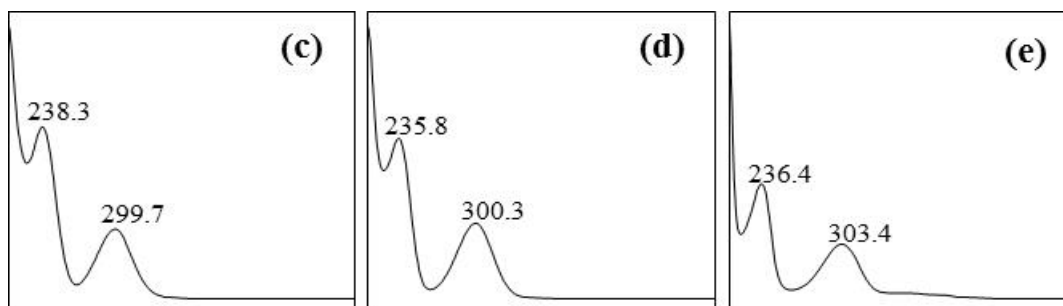


Figura 51 (continuación). **c)** Espectro de absorción del compuesto **9**, **d)** Espectro de absorción del compuesto **10**, y **e)** Espectro de absorción del compuesto **4**, ácido salicílico.

Los resultados obtenidos respecto a la disminución de nataxazol podían ser esperables ya que Hesketh y colaboradores (2009) describieron una inhibición general de la biosíntesis de antibióticos en *S. coelicolor* A3(2) cuando aumentaba la transcripción de la coelibactina (Fig. 52). No obstante y teniendo en cuenta que la regulación global del metabolismo secundario en *S. coelicolor* A3(2) y *Streptomyces* sp. Tü 6176 puede diferir considerablemente, el efecto observado podría deberse a que ambos clusters utilizan como precursor el corismato. De tal forma, al activarse la salicilato sintasa, ésta podría estar secuestrando corismato para generar ácido salicílico, evitando de este modo que se formase el 3-HAA necesario para la biosíntesis de nataxazol.

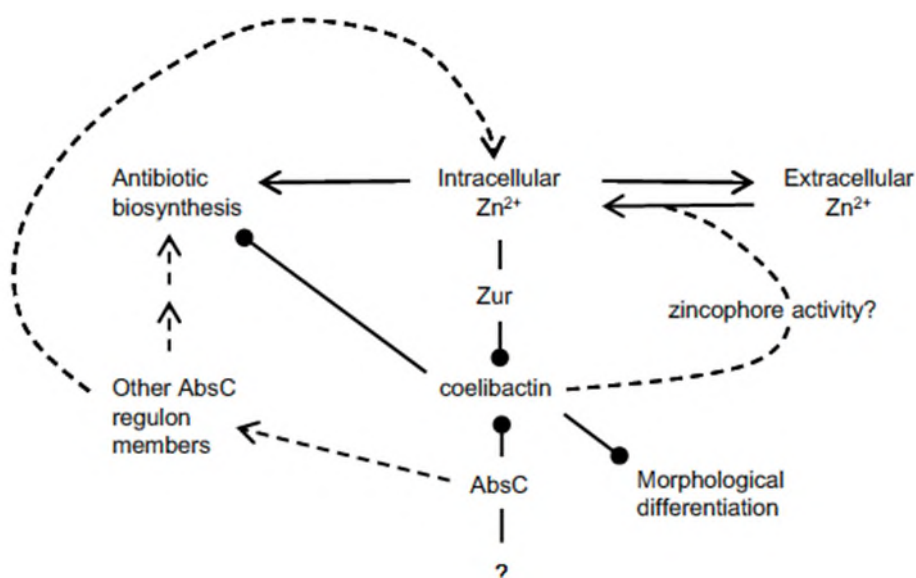


Figura 52. Esquema tomado del artículo de Hesketh y colaboradores (2009) donde muestran la relación de la coelibactina con otros cluster de biosíntesis de antibióticos.

Con respecto a los resultados obtenidos con Δ natPK, cuando esta cepa se cultiva en MD, no hay un aumento de la producción del compuesto **3** (Fig. 53a) siendo el perfil de producción el previamente observado en R5A (Fig. 47). Sin embargo, cuando Δ natPK se crece en MD-Zn⁺² se observa un aumento de 88'3 veces la producción del compuesto **3** (Fig. 53b), observándose los compuestos **9**, **10** y **4** (ácido salicílico) que fueron detectados en los extractos de *Streptomyces* sp. Tü 6176 (Fig. 51b) aunque, en este caso, en menores cantidades. También se puede observar el compuesto **5** en muy pequeña cantidad.

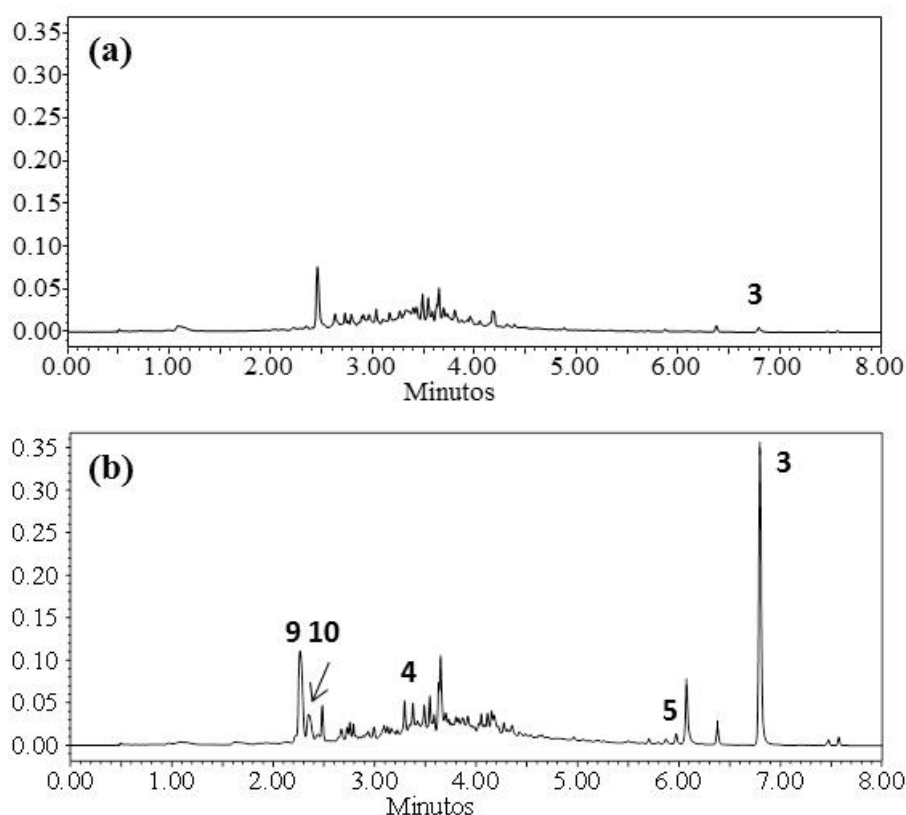


Figura 53. a) Cromatograma de UPLC de Δ natPK en MD a 5 días de incubación y b) Cromatograma de UPLC de Δ natPK en MD-Zn⁺² a 5 días de incubación

3.5.2 Caracterización estructural del compuesto **3**.

La cepa seleccionada para purificar el compuesto **3** y caracterizar su estructura fue Δ natPK. El compuesto **3** fue purificado de cultivos de Δ natPK crecido en MD-Zn⁺² durante 5 días. A continuación, se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.19.5. Tras su purificación y liofilización, el compuesto se envió a la Fundación Medina

(Granada) para su elucidación estructural. El resultado obtenido confirmó que el compuesto **3** con una movilidad de 6'8 min. en UPLC se trata del benzoxazol UK-1 (Fig. 46c; Anexo I: Fig. 95)

3.5.3 Expresión heteróloga de la salicilato sintasa CF54_20720.

Con el objetivo de verificar que el gen que codifica la salicilato sintasa (CF54_20720) localizada en el *cluster* 25 es la responsable de la biosíntesis de ácido salicílico, se procedió a su expresión heteróloga en *S. albus* J1074, organismo que carece de un gen análogo y que por lo tanto no produce ácido salicílico ni ningún compuesto que presente este compuesto en su estructura.

Para realizar esta la expresión heteróloga se generó el plásmido pCoe-SS, en el cual el gen *cf54_20720* se sitúa bajo el control del promotor constitutivo *ermE***p*. El análisis de extractos obtenidos a partir de *S. albus* J1074/pCoe-SS crecido en R5A sólido mostró la presencia de un compuesto con una movilidad de 3'3 min (Fig. 54) que no está presente en el control utilizado (*S. albus* J1074/pEM4T). La movilidad de este pico y su espectro coinciden con los del ácido salicílico (**4**). El análisis mediante HPLC-MS confirmó que la masa observada (139 *m/z* [M+H]⁺) corresponde a ácido salicílico.

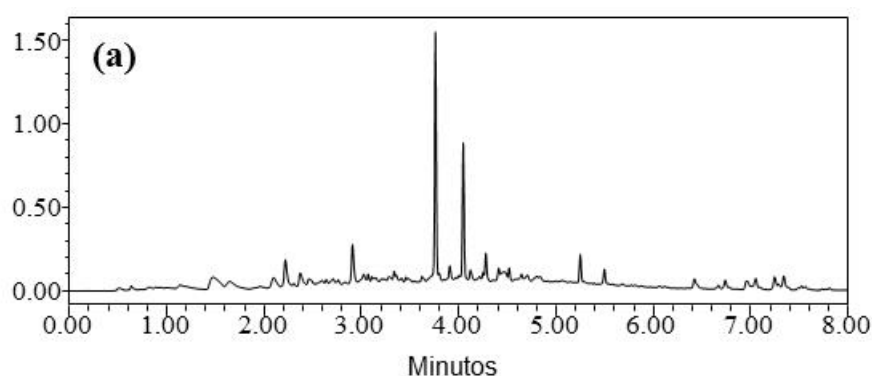


Figura 54. a) Cromatograma correspondiente al extracto de *S. albus* J1074/pEM4T y

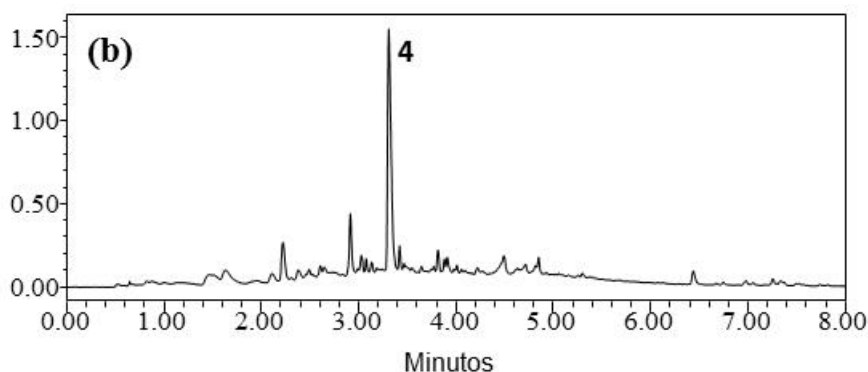


Figura 54 (continuación). **b)** Cromatograma correspondiente al extracto de *S. albus* J1074/pCoe-SS, ambos obtenidos en R5A sólido.

3.6 Caracterización de *natAN* implicado en la biosíntesis del ácido 3-hidroxiantranílico.

Para demostrar que *natAN*, que codifica una antranilato sintasa, participa en la biosíntesis del ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), se realizó un reemplazamiento de dicho gen por el gen de resistencia a apramicina *aac3(IV)*. Para ello, se obtuvo la construcción p Δ natAN (aptdo 2.16.2.1) que se usó para obtener el mutante Δ natAN. La comprobación de este mutante se realizó por PCR utilizando las siguientes parejas de oligonucleótidos: ASCOMP1-ASCOMP2; ApraCfw–TetR14afw y ApraCrv–1518rv (Fig. 55). Con la primera pareja de *primers* se espera ver una diferencia de tamaño entre el organismo silvestre y el mutante debido a que el tamaño de *natAN* es de 2'1 kb mientras que el tamaño esperado para el *cassette* de resistencia a apramicina es de 1'8 kb (Fig. 55a). Con la segunda y tercera pareja de cebadores se pretendía observar que el *cassette* se había insertado en el lugar correcto (Fig. 55b). Con ambas parejas en la cepa silvestre no se espera amplificación porque la cepa no tiene el *cassette* de resistencia a apramicina y por tanto los cebadores ApraCfw y ApraCrv no anillan. En la cepa Δ natAN la amplificación con la pareja ApraCrv–1518rv (**calle 1**) genera una banda de 1995 bp mientras que con ApraCfw–TetR14afw (**calle 2**) la banda esperada es de 3036 bp.

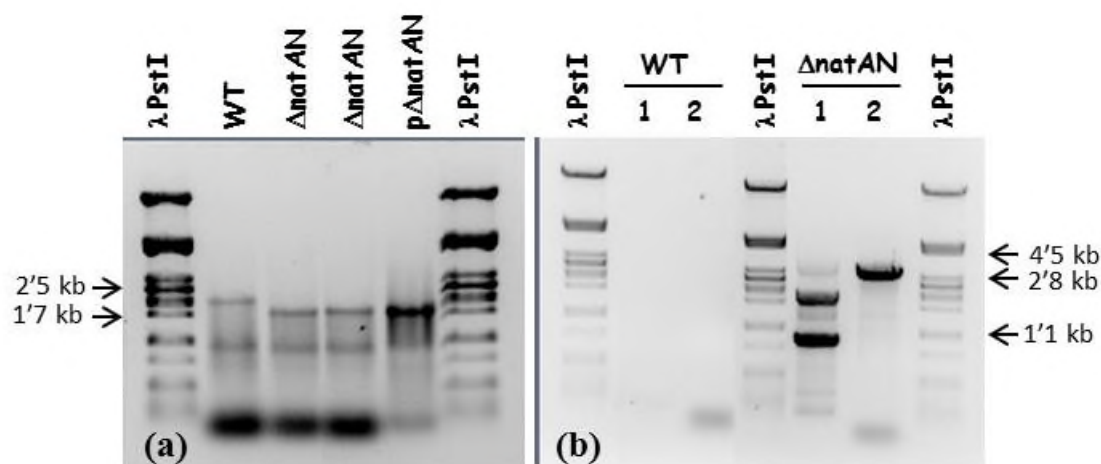


Figura 55. PCR de comprobación del mutante $\Delta natAN$: **a)** PCR utilizando los *primers* ASCOMP1–ASCOMP2 **b)** PCR de comprobación utilizando cebadores internos al *cassette* de resistencia a la apramicina (ApraCfw y ApraCrv) y cebadores externos a la región implicada en el reemplazamiento (TetR14fw y 1518rv).

A continuación, se cultivó $\Delta natAN$ en R5A sólido para analizar su perfil de producción analizando los extractos obtenidos por UPLC. Al observar los cromatogramas (Fig. 56) podemos observar la ausencia de nataxazol hidroxilado (**2**) y de UK-1 (**3**), y la desaparición casi completa del nataxazol (**1**). La presencia de un mínimo residuo de nataxazol se puede deber a la producción de 3-HAA por parte de otras antranilato sintasas codificadas por genes exteriores al *cluster 3*. En este sentido se han localizada al menos 2 genes que codifican antranilato sintasas: *cf54_24325* y *cf54_24750* las cuales no se encuentran incluidas dentro de ningún agrupamiento de biosíntesis de metabolitos secundarios. El gen *cf54_24750* presenta similitud con antranilato sintasas del metabolismo primario implicadas en la formación de fenilalanina y triptófano.

Por otro lado, se observa la aparición de un compuesto (**11**) con una movilidad de 2'26 min y el ligero aumento de otro compuesto (**12**) con movilidad de 3'7 min (Fig. 56b).

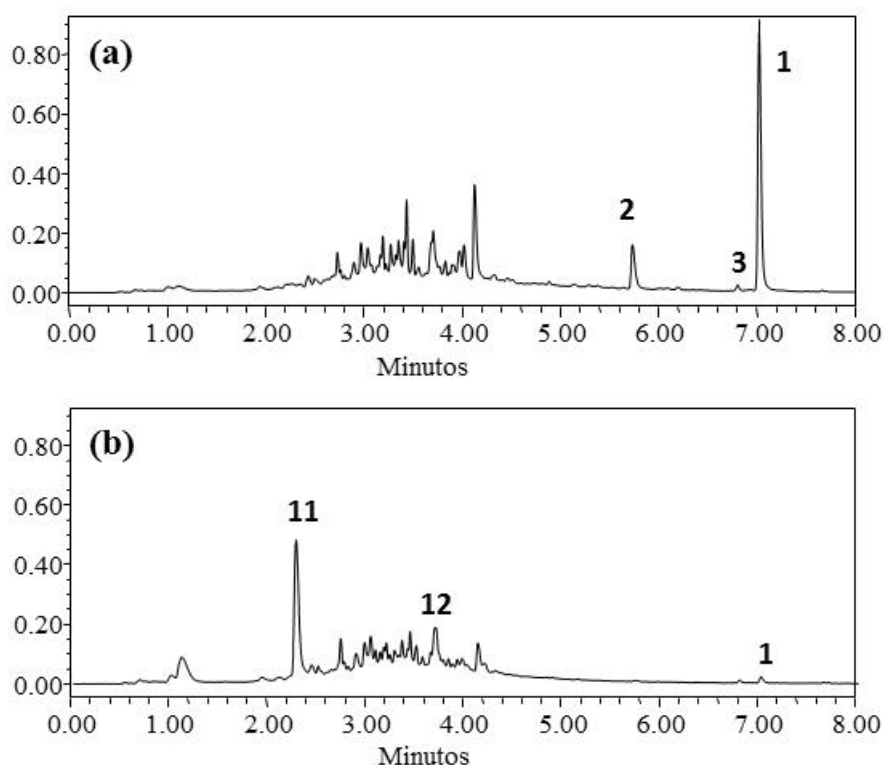


Figura 56. Cromatograma de UPLC del extracto obtenido de la **a)** Cepa silvestre de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y **b)** Cepa mutante Δ natAN.

Los compuestos con movilidades de 2'26 (**11**) y 3'7 min (**12**), tienen un espectro similar al de 6-MSA aunque el máximo de absorción del 6-MSA es de 307 nm mientras que el de estos compuestos es de 316 nm (Fig. 57b y c). Al analizar por HPLC-MS estos dos compuestos se vio que el compuesto **11** presenta una masa de 155 m/z $[M+H]^+$, tan solo dos unidades mayor al 6-MSA, y el compuesto **12** presenta una masa de 670 m/z $[M+H]^+$. En base a estos resultados, se planteó la posibilidad de que 6-MSA pudiese estar siendo usado por otra ruta de biosíntesis, ya que no se observa la acumulación de éste, o bien que pudiesen ser compuestos derivados del corismato que al no ser utilizado para la biosíntesis de 3-HAA esté siendo utilizado en otras rutas de biosíntesis.

Durante el análisis de los agrupamientos génicos implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, llamó la atención la presencia de distintos *clusters* de biosíntesis de ionóforos y su alta conservación, como es el caso del mencionado *cluster* 25 (coelibactina) o el *cluster* 10 (enterobactina). Basándonos en el experimento de la mejora de producción de UK-1, se decidió eliminar cada uno de los metales del MD con

el objetivo de crecer la cepa silvestre en cada nueva versión de este medio para verificar el efecto sobre la producción de ionóforos. Al eliminar FeSO_4 de MD (MD- Fe^{+2}), los resultados de la producción de la cepa silvestre mostraron que además de una producción normal de nataxazol (**1**) aparecían los compuestos **11** y **12**, y un compuesto adicional (**13**) de espectro similar a los anteriores y con una movilidad de 2'68 min (Fig. 57).

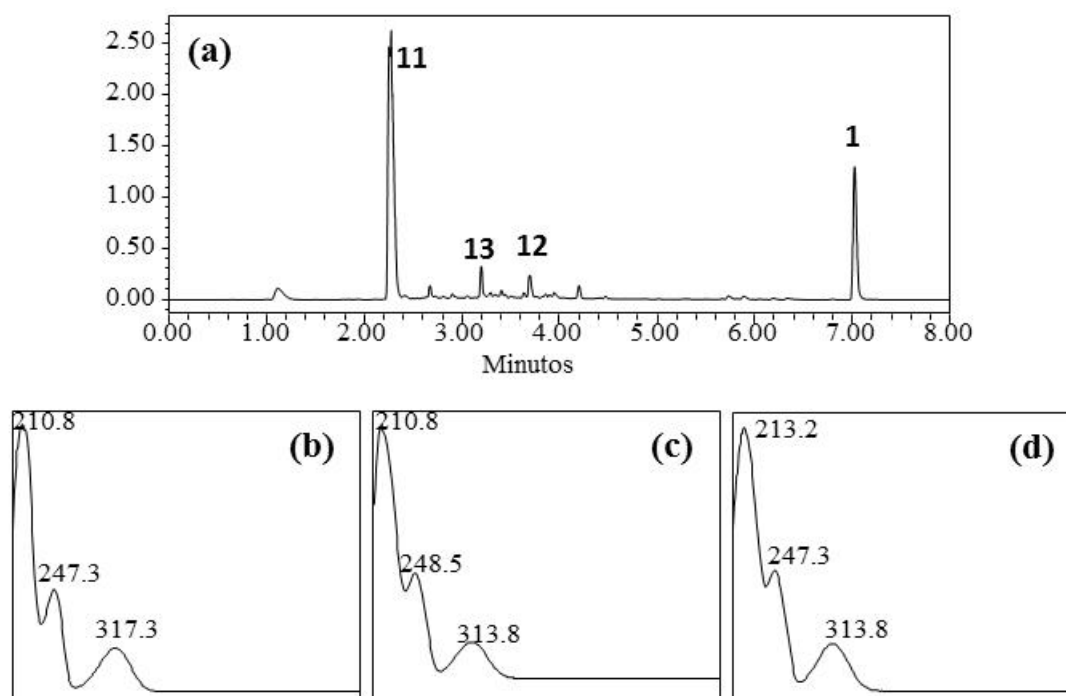


Figura 57. a) Cromatograma del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176 crecida en MD- Fe^{+2} . b) Espectro de absorción del pico con movilidad 2'26 min (**11**), c) Espectro de absorción del pico con movilidad de 3'7 min (**12**) y d) Espectro de absorción del pico con movilidad de 2'68 (**13**).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el mutante ΔnatAN y los vistos en MD- Fe^{+2} , se volvió a analizar la masa de estos compuestos por HPLC-MS. Los compuestos **11** y **12**, tal como se había verificado anteriormente, presentan masas de 155 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 465 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$, respectivamente, mientras que el compuesto **13** presenta una masa de 670 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.6.1 Complementación química de la cepa Δ natAN.

Con el objetivo de recuperar la producción de nataxazol en el mutante Δ natAN, y verificar la participación de NatAN en la biosíntesis de 3-HAA se procedió a realizar una complementación química utilizando 3-HAA comercial a una concentración de 1 mM.

El resultado de esta bioconversión mostró que la adición de 3-HAA a Δ natAN conducía a recuperar la producción de nataxazol (**1**), nataxazol hidroxilado (**2**) y UK-1 (**3**), mientras que al mismo tiempo se observa la desaparición de los compuestos **11** y **12** (Fig. 58b). Este hecho puede deberse a que la presencia de 3-HAA inhiba el *cluster* implicado en la biosíntesis de estos compuestos o la producción de corismato lo que apoyaría la hipótesis de que los compuestos **11** y **12** sean derivados de corismato y su aumento en la cepa Δ natAN se deba un aumento de corismato libre en la célula.

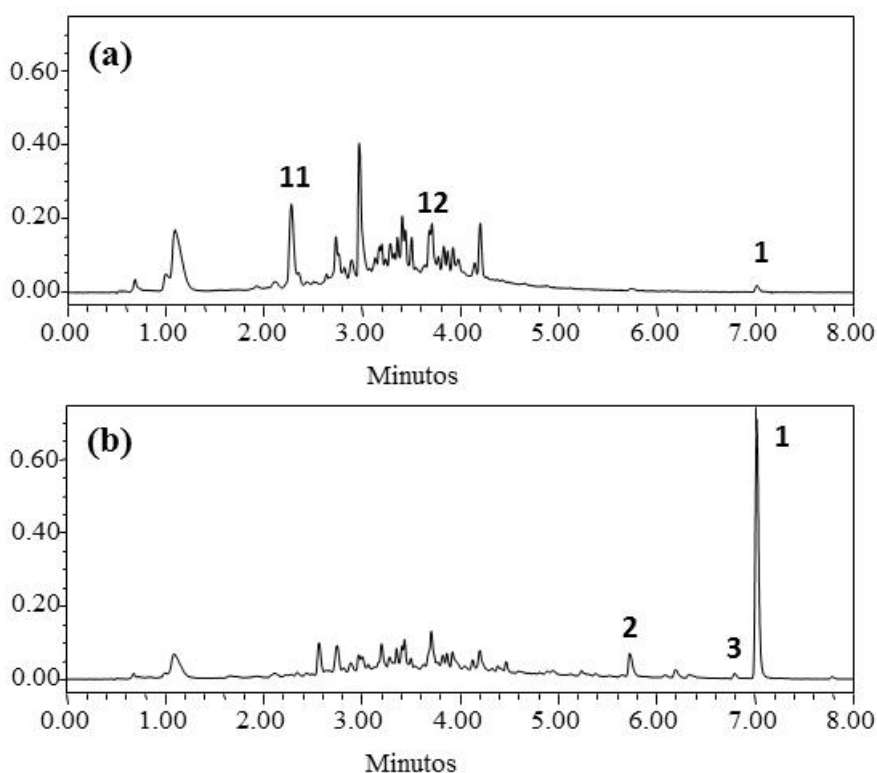


Figura 58. a) Cromatograma del extracto de la cepa Δ natAN y b) Cromatograma del extracto de la cepa Δ natAN a la que se le ha incorporado 3-HAA 1 mM.

3.6.2 Caracterización de los compuestos 11, 12 y 13.

Tras los resultados anteriores se decidió purificar los compuestos **11**, **12** y **13** para caracterizar su estructura. Para la purificación se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.19.5 y, al igual que con el nataxazol hidroxilado y el UK-1, se enviaron a la Fundación Medina para elucidar su estructura.

El resultado de la caracterización estructural mostró que el compuesto **11** es ácido 2,3-dihidroxibenzoico (Fig. 59a), un derivado del corismato. El compuesto **13** corresponde a un dímero de 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina (Fig. 59b), intermediario de la ruta de biosíntesis de enterobactina formado por dos moléculas de ácido 2,3-dihidroxibenzoico unidas cada una a una molécula de serina y unidas entre sí por las serinas. Finalmente, el compuesto **12** corresponde al sideróforo enterobactina (Fig. 59c) (Raymond *et al*, 2003).

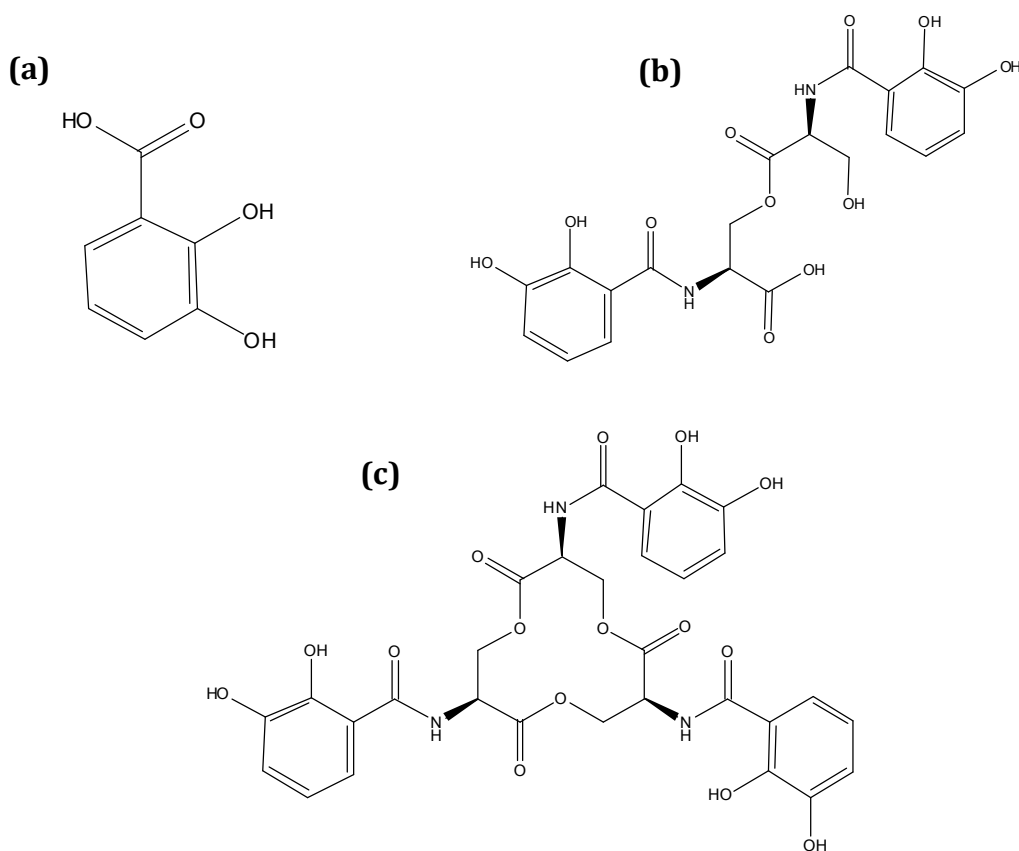
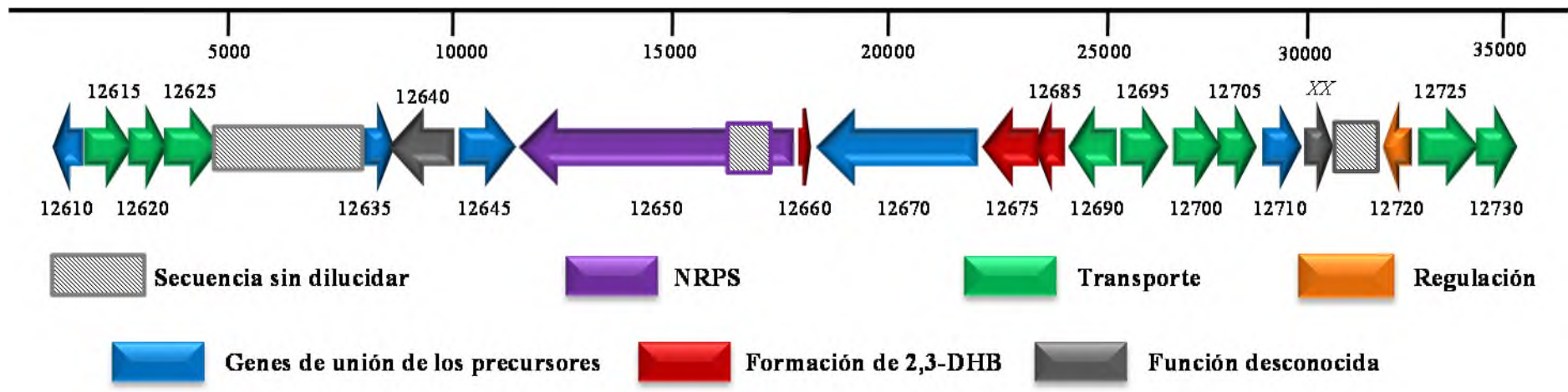


Figura 59. **a)** Estructura del compuesto **11**, ácido 2,3-dihidrobenczoico, **b)** Estructura del compuesto **13**, dímero de 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina y **c)** Estructura del compuesto **12**, enterobactina.

La enterobactina es un sideróforo ampliamente estudiado. La primera vez que se caracterizó fue en *E. coli* (Liu *et al.*, 1989) y seguidamente en otras enterobacterias (Crosa, 1989) pero, también, se ha descrito su producción por estreptomicetos (Fiedler *et al.*, 2001). Al conocer la capacidad de producir enterobactina de *Streptomyces* sp. Tü 6176, se procedió a analizar exhaustivamente el *cluster* 10 (Fig. 60) que presentan una alta similitud con el de enterobactina. Primero, se analizó la NRPS del *cluster* la cual mostraba similitud con EntF, NRPS implicada en la biosíntesis de enterobactina.

Se utilizó el *software* PKS/NRPS Analysis (aptdo. 2.15.1) para realizar una predicción de los módulos que conforman la NRPS CF54_12650 (Fig. 61). El resultado obtenido mostró que tanto EntF como CF54_12650 contienen los mismos dominios iniciales: C (condensación), A (adenilación) y PP (PCP, proteína transportadora de péptidos). El cuarto dominio es desconocido para la NRPS CF54_12650 del *cluster* 10, eso puede deberse a que la secuencia de *cf54_12650* está incompleta. Sin embargo, en ambos casos el dominio A es específico para serina ya que ambos son presentados el mismo motivo de aminoácidos en su centro activo: DVWHFSLV.



<i>cf54_12610</i>	Monooxigenasa	<i>cf54_12685</i>	2,3-dihidroxi benzoato-2,3-dehidrogenasa
<i>cf54_12615</i>	Transportador ABC	<i>cf54_12690</i>	Transportador ABC
<i>cf54_12620</i>	Hipotético transportador de Fe dependiente de ATP	<i>cf54_12695</i>	Permeasa
<i>cf54_12625</i>	Hipotético transportador de Fe	<i>cf54_12700</i>	Permeasa
<i>cf54_12635</i>	Aciltransferasa	<i>cf54_12705</i>	Transportador enterobactina-Fe dependiente de ATP
<i>cf54_12640</i>	Proteína hipotética	<i>cf54_12710</i>	Dehidrogenasa dependiente de FAD
<i>cf54_12645</i>	Esterasa	<i>XX</i>	Proteína hipotética
<i>cf54_12650</i>	NRPS (EntF)	<i>cf54_12720</i>	Regulador TetR
<i>cf54_12660</i>	Isocorismatasa	<i>cf54_12725</i>	Transportador ABC
<i>cf54_12670</i>	2,3-dihidroxi benzoato AMP ligasa (EntE)	<i>cf54_12730</i>	Transportador ABC
<i>cf54_12675</i>	Isocorismato sintasa		

Figura 60. Agrupamiento génico 10 encargado de la biosíntesis del sideróforo enterobactina.



Figura 61. a) Análisis de la NRPS CF54_12650 del *cluster* 10. b) Análisis de EntF de *E. coli*.

Se procedió a inactivar *cf54_12675*, que codifica la isocorismato sintasa implicada en la biosíntesis del ácido 2,3-dihidrobenzoico (**11**), ya que es el compuesto que se acumula en mayor cantidad en el cromatograma (Fig. 57) y es el primer enzima encargado de modificar corismato. Para ello, se utilizó el plásmido pΔICS-entb (aptdo. 2.16.1.1). El mutante, denominado *Streptomyces* sp. Tü 6176 ΔICS-entb (ΔICS-entb) se cultivó en MD-Fe⁺² durante 7 días, se obtuvo un extracto y se analizó por UPLC. El análisis de los cromatogramas mostró la ausencia de ácido 2,3-dihidrobenzoico (**11**) y 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina (**13**), observándose no obstante pequeñas cantidades de enterobactina (**12**) (Fig. 62). Esto puede deberse a la producción residual de ácido 2,3-dihidrobenzoico por otras rutas de biosíntesis como la del *cluster* 5 que presenta una

isocorismato sintasa (CF54_07485). Por otro lado, en estas condiciones de cultivo la cepa silvestre produce nataxazol (Fig. 62a) a diferencia de lo que ocurría en el medio MD-Zn²⁺.

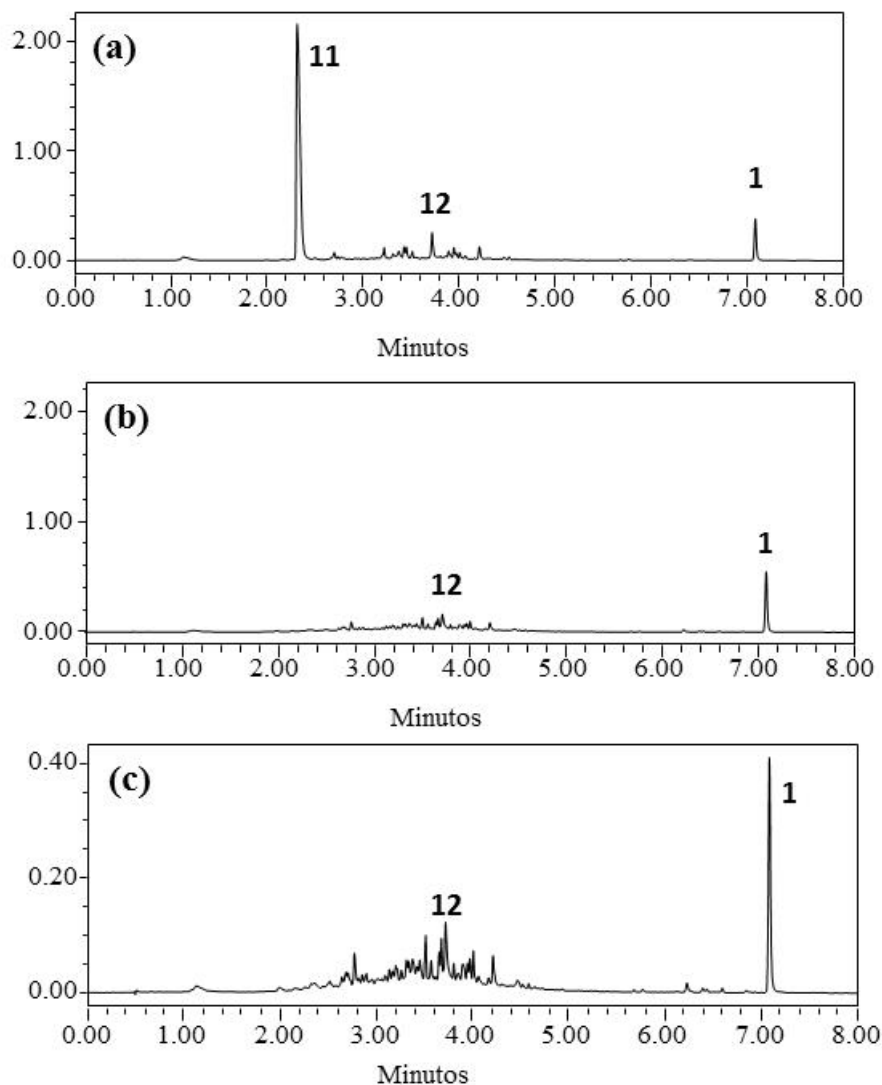


Figura 62. Cromatogramas de UPLC de los extractos crecidos en MD-Fe⁺² de **a)** *Streptomyces* sp. Tü 6176, **b)** de Δ ICS-entb en MD-Fe⁺² y **c)** Ampliación del cromatograma de Δ ICS-entb.

Estos experimentos demuestran que efectivamente el *cluster* 10 determina la producción de enterobactina (**12**) y de sus intermediarios ácido 2,3-dihidrobenzoico (**11**) y el dímero de 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina (**13**). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que si bien la producción de enterobactina requiere un condicionante metabólico específico, ausencia de hierro, su síntesis se puede volver constitutiva

alterando la producción de otros metabolitos secundarios, tal como nataxazol, con los cuales comparte precursores biosintéticos.

3.6.3 Caracterización de la salicilato sintasa CF54_20720 implicada en la biosíntesis de UK-1.

El gen *cf54_20720*, que codifica una salicilato sintasa, se encuentra en el *cluster* 25, tiene un tamaño de 1494 bp y está flanqueada por un gen que codifica un transportador de tipo ABC (*cf54_20715*) y por un gen que codifica una treonina deshidratasa (*cf54_20725*). Tal y como se sugirió en el aptdo. 3.5, la salicilato sintasa CF54_20720 podría estar implicada en la biosíntesis de ácido salicílico, precursor del benzoxazol UK-1. Con la intención de demostrar esta implicación y por lo tanto la interrelación entre ambos clusters, se procedió a inactivar el gen *cf54_20720* en el mutante Δ natAN, no productor de nataxazol ni de UK-1, generándose de este modo un doble mutante. Para ello se obtuvo el plásmido p Δ SS (aptdo, 2.16.2.1) el cual reemplazará *cf54_20720* por el *cassette* de resistencia a eritromicina. Los mutantes obtenidos (Δ natAN- Δ SS), que son resistentes a apramicina (*aac(3)IV* substituye a *natAN*) y a eritromicina (*ermE* substituye a *cf54_20720*), se comprobaron mediante Southern blot (Fig. 63) para verificar que el reemplazamiento se había producido correctamente. Se realizaron dos digestiones diferentes: BamHI y BamHI – EcoRI. Para el primer Southern blot de comprobación se utilizó como sonda *ermE* (Fig. 63a) de tal modo que la cepa Δ natAN (control) no muestra ninguna señal y en el doble mutante se observa en la digestión BamHI dos bandas: de 5 y 2kb, respectivamente; mientras que en la digestión BamHI–EcoRI se observan dos bandas: de 2 y 0'9 kb, respectivamente. En ambos casos las señales observadas se corresponden con los resultados esperados. En el segundo Southern se utilizó como sonda SS-1 (Fig. 63b) obtenida por PCR tras la amplificación del primer fragmento para el reemplazamiento con los *primers* SS-1 y SS-2. En este caso, en la digestión BamHI del ADN cromosómico de Δ natAN se observan dos bandas: de 6'7 y 5 kb, mientras que en la cepa Δ natAN- Δ SS se obtienen

bandas de 5 y 2 kb. Con respecto a la digestión BamHI–EcoRI en la cepa control se obtienen bandas de 5 y 2'5 kb mientras que en el doble mutante las señales son de 5 y 2 kb. Finalmente, se utilizó como sonda el gen *cf54_20720* (Fig. 63c) obteniéndose en la digestión BamHI del ADN cromosómico de Δ natAN una banda de 6'7 kb mientras que en el doble mutante se observan dos bandas de 2 y 5 kb, respectivamente. En la digestión BamHI–EcoRI la cepa control presenta una señal de 2'5 kb y Δ natAN- Δ SS dos señales de 2 y 0'9 kb, respectivamente. Estos experimentos verificaron que el reemplazamiento del gen *cf54_20720* se había producido de forma correcta.

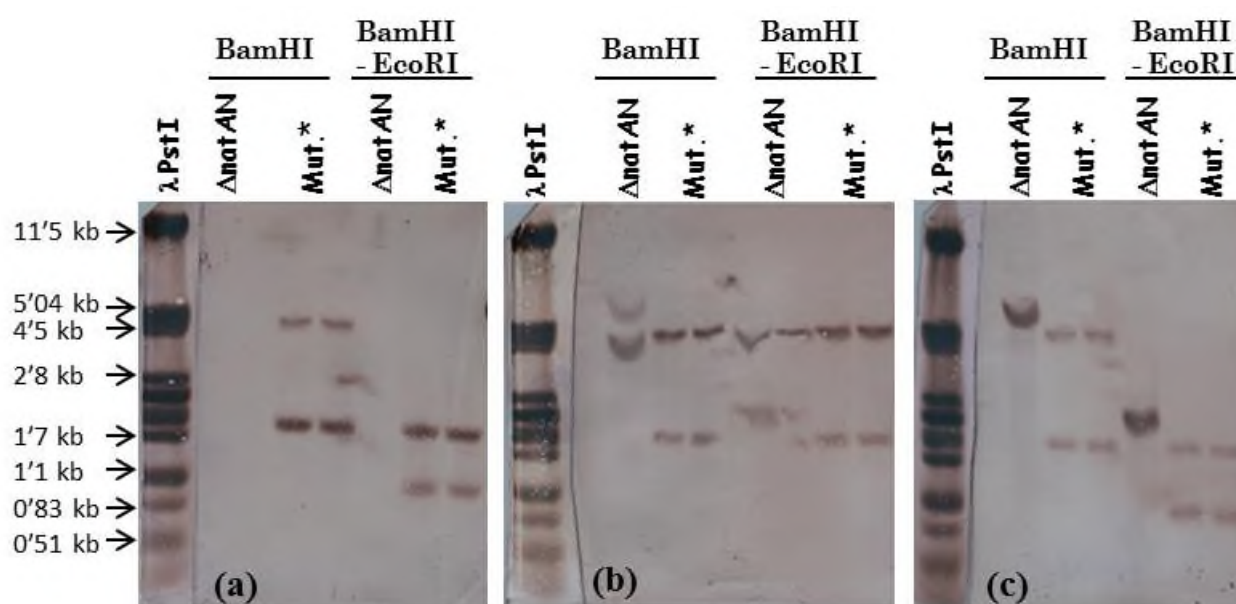


Figura 63. a) Southern blot utilizando como sonda *ermE*. b) Southern blot utilizando como sonda el fragmento obtenido con los *primers* RESS-1 y RESS-2. Y c) Southern blot utilizando como sonda *cf54_20720*.

*Mut.: Δ natAN- Δ SS

Los mutantes Δ natAN y Δ natAN- Δ SS se crecieron en MD-Zn⁺² para analizar sus perfiles de producción. En ninguno de los casos se observó la producción de nataxazol (1) ni UK-1 (3) (Fig. 64), tal y como se esperaba ya que ambos mutantes carecen de *natAN* necesario para producir 3-HAA. Sin embargo, observamos que en la cepa Δ natAN se produce ácido salicílico (4) y los compuestos 9 y 10 previamente observados en el experimento de la mejora de producción de UK-1 (Fig. 51b). Por el contrario, en el doble mutante Δ natAN- Δ SS desaparece la producción de ácido salicílico

(4) y de los compuestos con movilidad 9 y 10. Este resultado claramente demuestra la implicación de *cf54_20720* en la biosíntesis de ácido salicílico y de los compuestos 9 y 10.

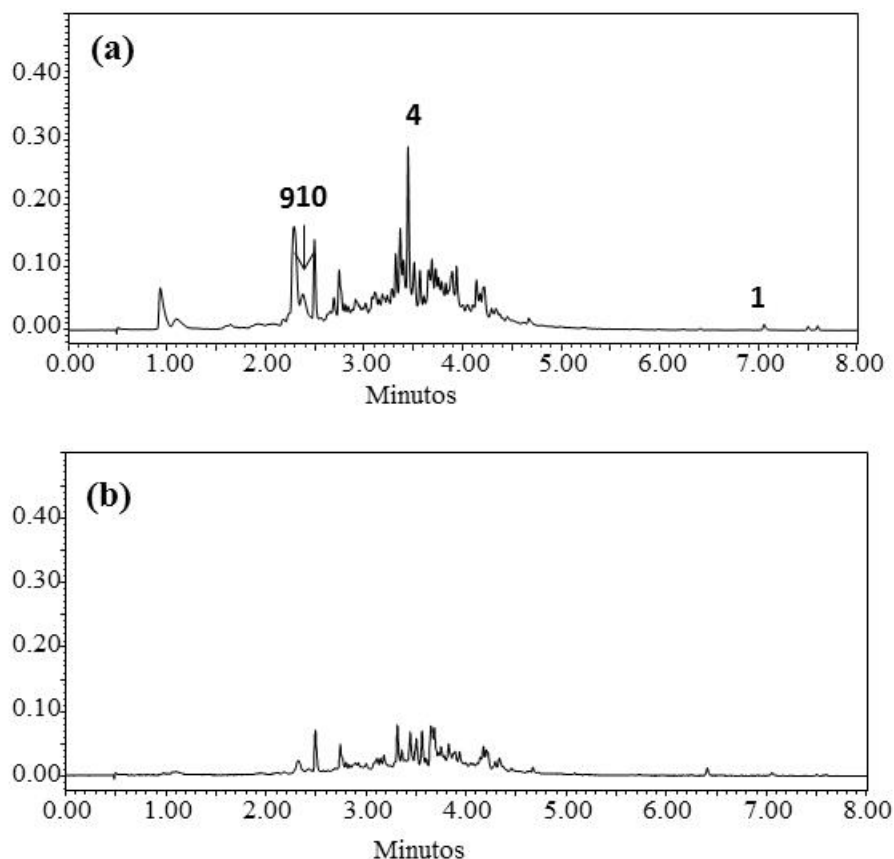


Figura 64. a) Cromatograma de UPLC del extracto de la cepa Δ natAN crecido en MD-Zn⁺² y b) Cromatograma de UPLC del extracto de la cepa Δ natAN- Δ SS crecido en MD-Zn⁺².

No obstante, para clarificar la participación de la salicilato sintasa CF54_20720 en la producción de UK-1 se procedió a realizar una bioconversión utilizando ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) y creciendo los mutantes Δ natAN y Δ natAN- Δ SS en MD-Zn⁺². En este experimento, esperaríamos que Δ natAN recuperara la producción de nataxazol (1) y UK-1 (3), mientras que Δ natAN- Δ SS, debido a que carece de *cf54_20720*, se anticipa la recuperación de la producción de nataxazol (1) y no de UK-1 (3).

Como se puede observar en los cromatogramas de los extractos obtenidos de ambos cultivos, Δ natAN recupera la producción de ambos compuestos (Fig.65a)

mientras que $\Delta\text{natAN-}\Delta\text{SS}$ solo recupera la producción de nataxazol (Fig. 65b). Al igual que en los cultivos iniciales de estos mutantes en MD-Zn^{2+} no se observa producción de ácido salicílico ni de los otros dos compuestos (**9** y **10**) observados anteriormente en la cepa $\Delta\text{natAN-}\Delta\text{SS}$.

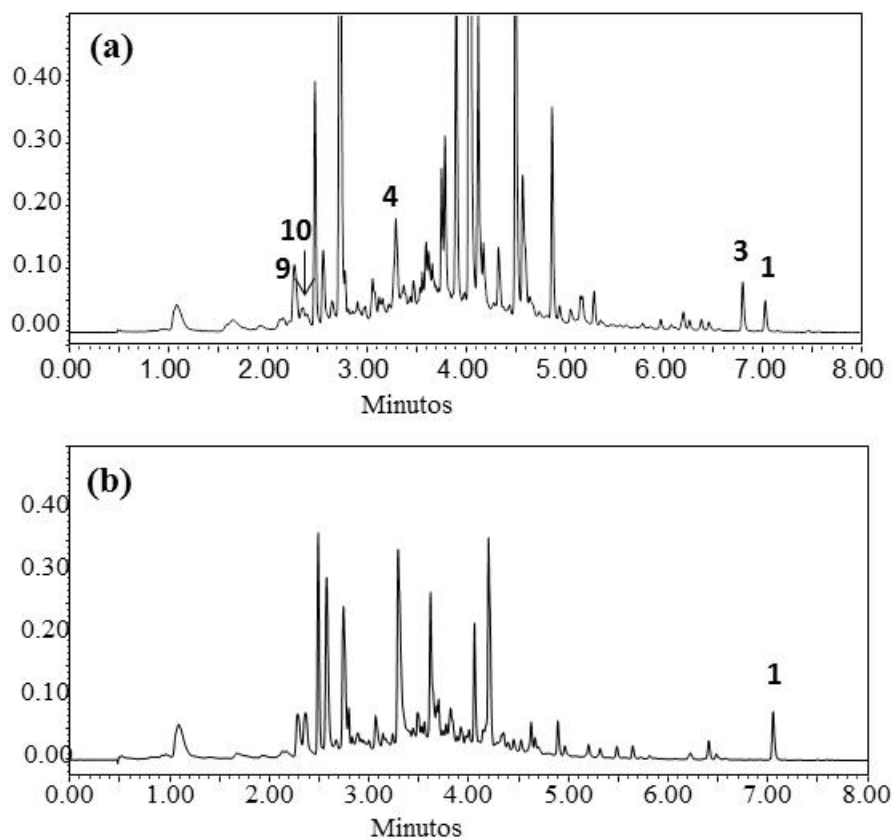


Figura 65. a) Cromatograma de extractos de ΔnatAN crecido en MD-Zn^{+2} más 5 $\mu\text{g/ml}$ de 3-HAA y b) Cromatograma de extractos de $\Delta\text{natAN-}\Delta\text{SS}$ en MD-Zn^{+2} más 5 $\mu\text{g/ml}$ de 3-HAA.

En ambos casos (MD-Zn^{2+} y $\text{MD-Zn}^{2+}/3\text{-HAA}$), se demuestra la relación entre la producción del ácido salicílico **4** y de los compuestos **9** y **10** con la salicilato sintasa CF54_20720. Con la bioconversión de 3-HAA no solo se demuestra que el ácido salicílico producido por la salicilato sintasa está implicado en la biosíntesis de UK-1 (**3**) sino también la interrelación de las rutas de biosíntesis de nataxazol y coelibactina para dar lugar a un nuevo metabolito secundario.

3.7 Implicación de *natAM* y *natL1* en la biosíntesis de nataxazol.

Para continuar con la caracterización de los genes implicados en la ruta de biosíntesis del nataxazol, se decidió delecionar la región que contiene a los genes *natAM* (codifica una amidohidrolasa), *natACI* (ACP) y *natL1* (AMP sintetasa y ligasa), que se encuentran consecutivos dentro del mismo operón.

Para llevar a cabo la delección, los tres genes se reemplazaron por el *cassette* de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) utilizando el plásmido p Δ natAM-L1 el cual se construyó amplificando un fragmento *downstream* de *natL1* y otro fragmento *upstream* de *natAM*, tal y como se describe en el apartado 2.16.2.1. Los mutantes obtenidos, *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natAM-L1 (Δ natAM-L1), se comprobaron por Southern blot (Fig. 66). Para realizar los Southern blots se realizaron dos digestiones diferentes: BamHI y EcoRI-XhoI. En el primer Southern blot se utilizó la sonda REAM-L1 obtenida por PCR con los cebadores READHL-1 y READHL-2 (Fig. 66a). En la digestión BamHI se observó una banda de 4'2 kb en el caso de la cepa silvestre y una de 2'8 kb en el mutante Δ natAM-L1, tal como se esperaba. En la digestión EcoRI-XhoI la cepa silvestre muestra una banda de 15 kb y la cepa mutante una 2'6 kb. En el segundo Southern blot se utilizó como sonda *aac(3)IV* (Fig. 66b). En ambas digestiones la cepa silvestre muestra ninguna señal mientras que Δ natAM-L1 en la digestión BamHI muestra una señal de 3 kb y en la digestión EcoRI-XhoI dos bandas: de 2'6 kb y 600 bp, respectivamente, tal como se esperaba. Tras comprobar que el mutante era correcto se procedió a analizar su perfil de producción.

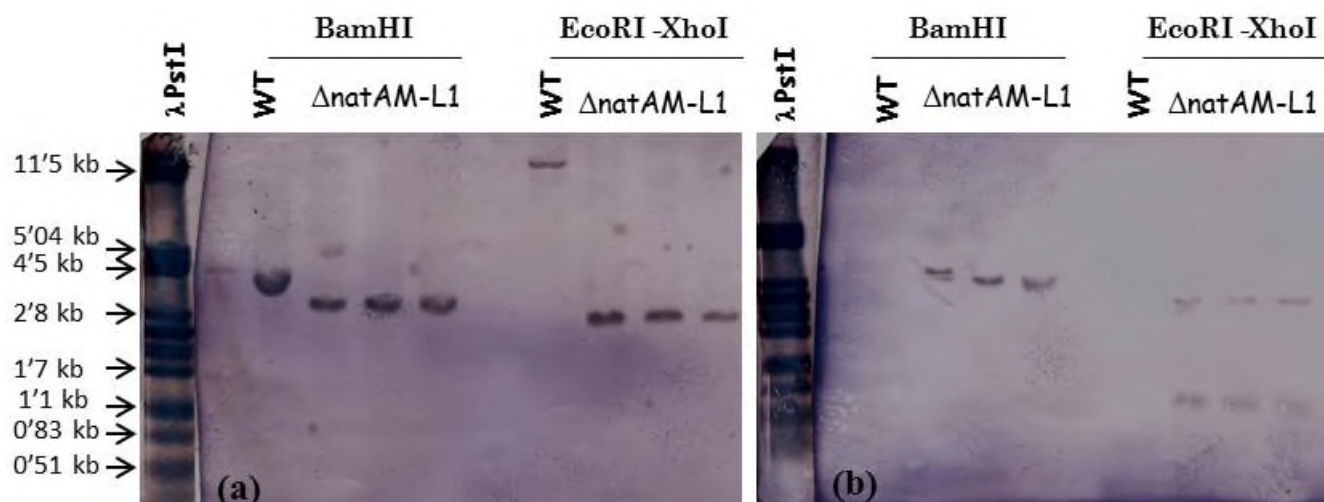


Figura 66. a) Southern blot de la cepa mutante Δ natAM-L1 utilizando como sonda el fragmento amplificado con los primers RADHL1-READHL2 b) Southern blot de la cepa mutante Δ natAM-L1 utilizando como sonda *aac(3)IV*.

El análisis por UPLC de los extractos obtenidos a partir de cultivos de Δ natAM-L1 en R5A mostró que esta cepa es no productora de benzoxazoles: nataxazol (**1**), nataxazol hidroxilado (**2**) o UK-1 (**3**) (Fig. 67). No se observa la acumulación de ningún compuesto con espectro benzoxazol lo que apunta a que alguno de estos enzimas o todos ellos participan, tal como se anticipaba, en etapas tempranas de la biosíntesis de nataxazol.

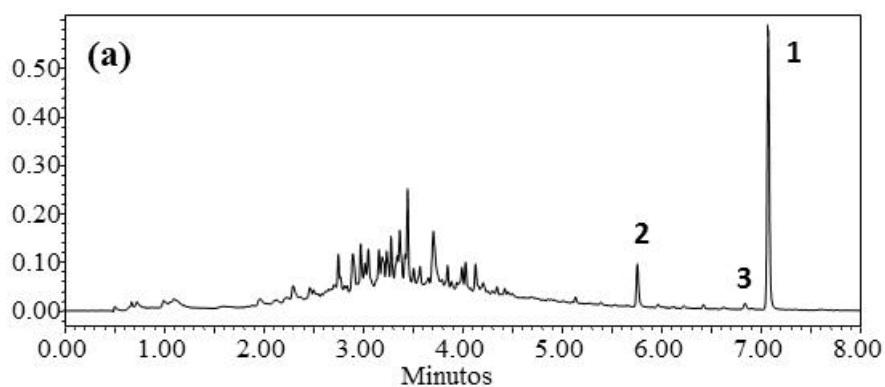


Figura 67. a) Cromatograma de UPLC del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y

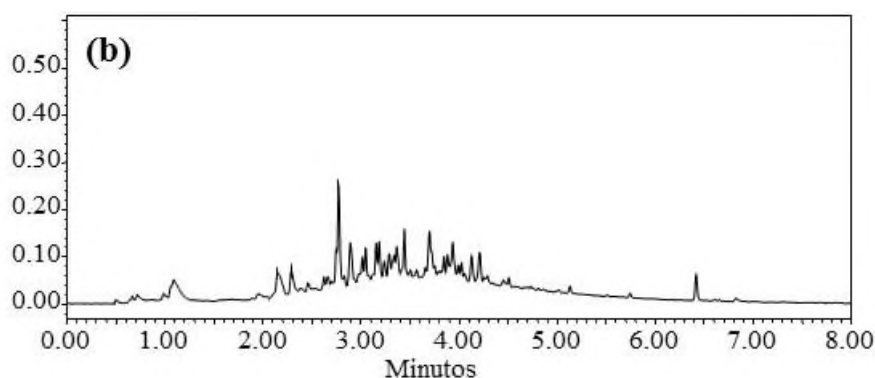


Figura 67 (continuación). **b)** Cromatograma de UPLC de Δ natAM-L1.

3.7.1 Complementación de Δ natAM-L1.

El mutante Δ natAM-L1 fue complementado utilizando diversas combinaciones de los genes delecionados para poder verificar la importancia de cada uno de ellos de forma conjunta e individual en el caso de *natAM* y *natL1*. Para ello se realizaron tres complementaciones diferentes, correspondiendo la primera de ellas a la introducción de los tres genes delecionados bajo el control del promotor constitutivo *ermE***p* para comprobar que se recuperaba la producción de nataxazol.

Para la complementación de Δ natAM-L1 se construyó el plásmido pnatAM-L1-S ϵ (aptdo. 2.17.2.1) el cual expresa conjuntamente los tres genes delecionados. El análisis de la producción mostró que en los clones Δ natAM-L1/pnatAM-L1-S ϵ se recuperaba la producción de nataxazol (1), nataxazol hidroxilado (2) y UK-1 (3) (Fig. 68).

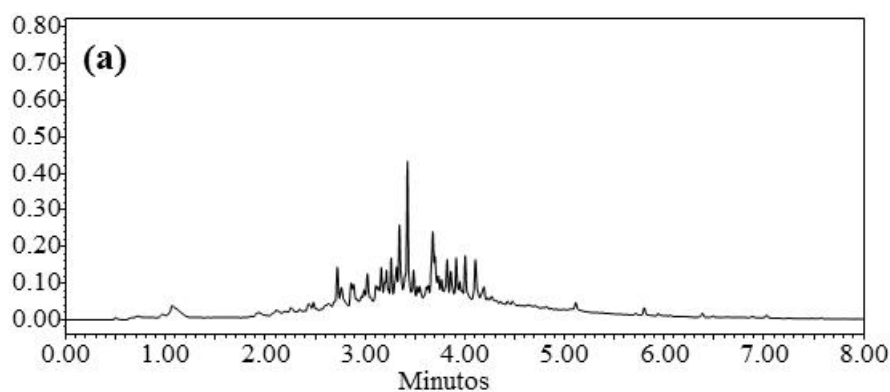


Figura 68. **a)** Cromatograma de la cepa Δ natAM-L1 sin complementar y

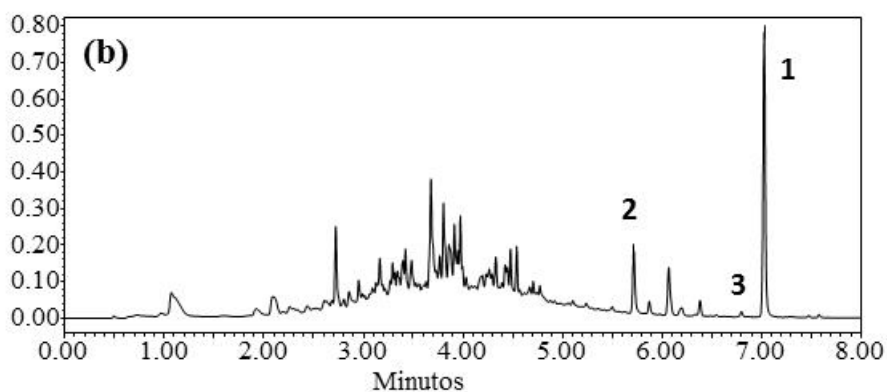


Figura 68 (continuación). **b)** Cromatograma de la cepa Δ natAM-L1 complementada con pnatAM-L1-S ϵ donde se recupera la producción.

Una vez comprobado que Δ natAM-L1 recupera la producción tras la expresión de *natAM*, *natAC1* y *natL1*, se procedió a realizar una complementación parcial en la cual se usó el plásmido pnatAC1-St, que contiene los genes *natAC1* y *natL1* bajo el control del promotor *ermE***p*. De esta forma se analizará el efecto de la ausencia de *natAM*. Se analizaron los extractos obtenidos de Δ natAM-L1/pnatAC1-St por UPLC viéndose que en ninguno de los transconjugantes analizados se recupera la producción de nataxazol ni se observa la aparición de ningún nuevo compuesto que pudiera ser un intermediario de la ruta (Fig. 69b).

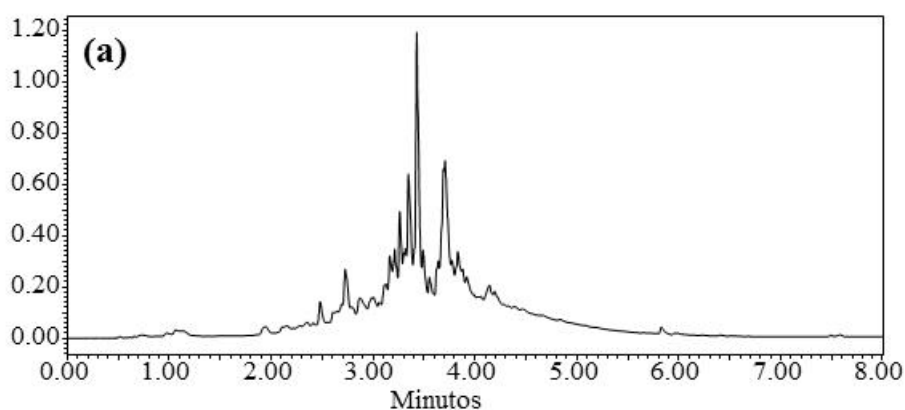


Figura 69. a) Cromatograma de la cepa Δ natAM-L1/pSETetc (control),

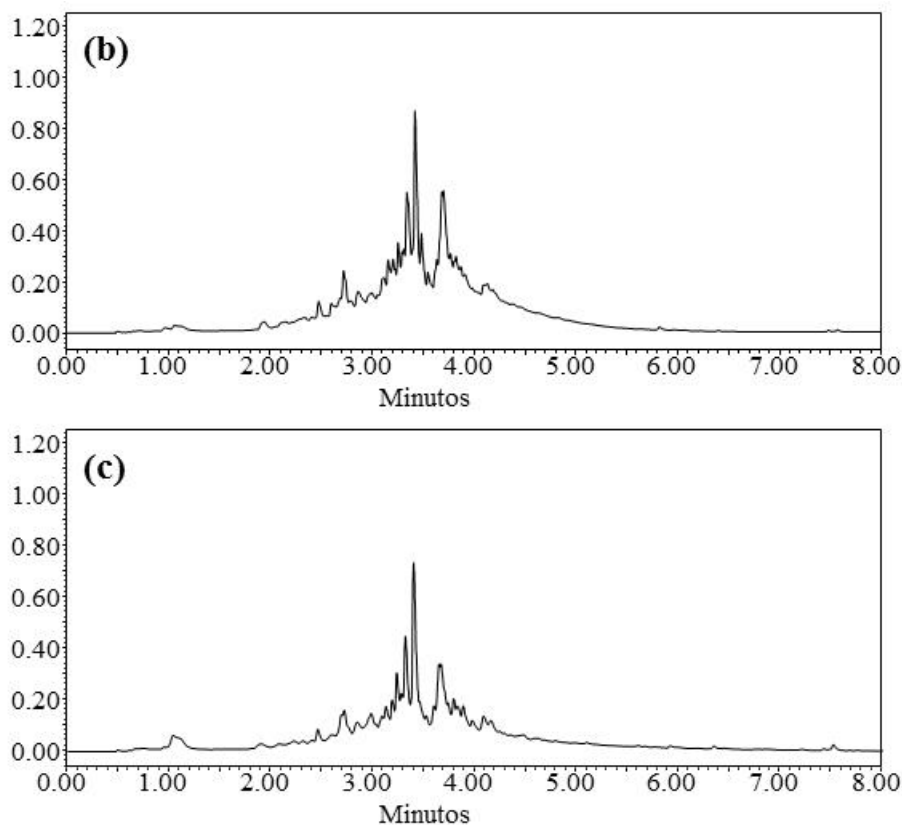


Figura 69 (continuación). **b)** Cromatograma de la cepa Δ natAM-L1/pnatAC1-St y **c)** Cromatograma de la cepa Δ natAM-L1/pnatAM-AC1t.

Esto indica que la amidohidrolasa NatAM está implicada en la biosíntesis de nataxazol, probablemente en el ensamblaje del 6-MSA con la primera molécula de 3-HAA (Fig. 39).

La última complementación parcial se realizó utilizando el plásmido pnatAM-AC1t que expresa los genes *natAM* y *natAC1*, por lo que al complementar Δ natAM-L1 se analizaría el efecto de la delección de *natL1*. El análisis por UPLC de los extractos obtenidos de Δ natAM-L1/pnatAM-AC1t muestra la ausencia de nataxazol, nataxazol hidroxilado y UK-1 (Fig. 69c). En esta ocasión se podría esperar el acumulo de algún intermediario de la ruta que se debiera a la acción de NatL2. Sin embargo, como se observa en el cromatograma no se acumula ningún nuevo compuesto. Este hecho indicaría que NatL1 se encuentra implicada en la unión del 6-MSA con la primera molécula de 3-HAA (Fig. 39).

3.8 Mejora de la producción de nataxazol usando genes reguladores específicos de ruta.

Para mejorar la producción de nataxazol primero se procedió a caracterizar la función de los genes reguladores que se localizan en el *cluster* de biosíntesis de nataxazol. Para ello, se procedió inicialmente a sobreexpresar en la cepa silvestre dichos genes.

3.8.1 Sobreexpresión de genes reguladores en *Streptomyces* sp. Tü 6176.

Con el objetivo de conocer cuál es la función de los reguladores del *cluster* del nataxazol y cercanos a él, se llevó a cabo la sobreexpresión de cada uno de ellos de forma individual en el productor de nataxazol. Se amplificó y clonó cada uno de ellos bajo el control del promotor constitutivo *ermE***p* en el plásmido integrativo pSETec (aptdo. 2.17.2.2) dando lugar a pSARP04 (*orf-4*), pnatR1, pnatR2, pnatR3 y pnatR4. En todos los casos, tras su introducción en *Streptomyces* sp. Tü 6176, se procedió a realizar un estudio de la producción de nataxazol a lo largo de 7 días en R5A líquido siguiendo los pasos descritos en apartado 2.19.2, y corrigiéndose finalmente los datos de producción obtenidos por el crecimiento del microorganismo (peso seco).

El primer regulador estudiado fue *orf-4* que codifica un regulador transcripcional de la familia SARP y se encuentra, *a priori*, fuera del agrupamiento génico implicado en la biosíntesis de nataxazol y, por lo tanto, no debería estar relacionado con la producción de este compuesto. El análisis de la sobreexpresión de este regulador a lo largo del tiempo nos muestra que, tal como esperábamos, no tiene ningún efecto sobre la producción de nataxazol (Fig. 70a). Aunque viendo los resultados de la gráfica, se podría interpretar que durante los seis primeros días hay una inhibición de la producción del nataxazol hidroxilado (Fig. 70b), como se irá mostrando en los sucesivos experimentos, la producción de nataxazol hidroxilado tiene un perfil errático y una gran variabilidad en su producción. Por ello se considera que *orf-4* no presenta un efecto

inhibitorio sobre la producción del nataxazol hidroxilado ni efecto alguno sobre la producción de nataxazol.

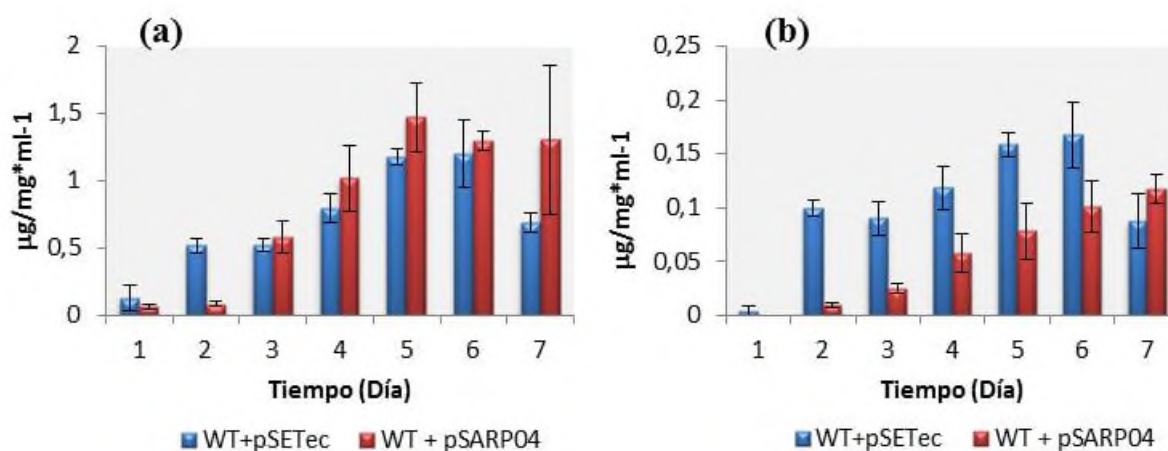


Figura 70. a) Producción de nataxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSARP04 que sobreexpresa el regulador *orf-4* y b) Producción de nataxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSARP04.

El segundo gen regulador analizado fue *natR1* el cual codifica un regulador transcripcional de tipo LuxR. La sobreexpresión de este regulador muestra un ligero aumento de la producción de nataxazol a las 24 horas (Fig. 71a). A partir de aquí el aumento de la producción se va haciendo cada vez más patente obteniendo su máximo a los 6 días de producción. De igual forma se puede observar como el nataxazol hidroxilado (Fig. 71b) presenta una producción variable, siendo mayor la producción de nataxazol hidroxilado durante tres primeros días en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1 que en la cepa silvestre. Sin embargo, al cuarto y al quinto se observa una ligera disminución en *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1 para volver a recuperarse al sexto y séptimo día. Como se puede observar en la sobreexpresión de *natR1* queda patente el perfil errático de la producción del nataxazol hidroxilado.

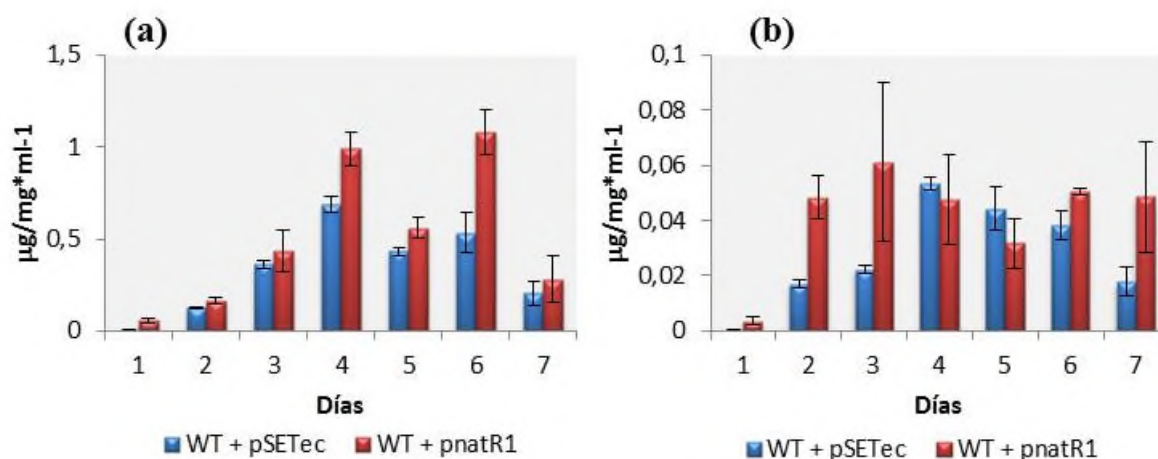


Figura 71. a) Producción de naxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1 que sobreexpresa el regulador *natR1* y b) Producción de naxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1.

El siguiente gen regulador ensayado fue *natR2* que codifica un regulador transcripcional de la familia TetR, reguladores que en su mayor parte actúan como represores. El análisis de la producción de naxazol tras la sobreexpresión de *natR2* muestra una disminución significativa de la producción del naxazol (Fig. 72a). En cambio, el naxazol hidroxilado no parece verse afectado a las 24 horas habiendo una mayor producción en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR2 (Fig. 72b). No obstante, el día 2 la producción de ambas cepas se iguala para verse en los días posteriores una ligera disminución. Al igual que en el caso de la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1 el naxazol hidroxilado presenta mucha variabilidad en su producción, hecho que sugiere que la hidroxilación del compuesto no se deba a la acción de ninguna proteína del *cluster*.

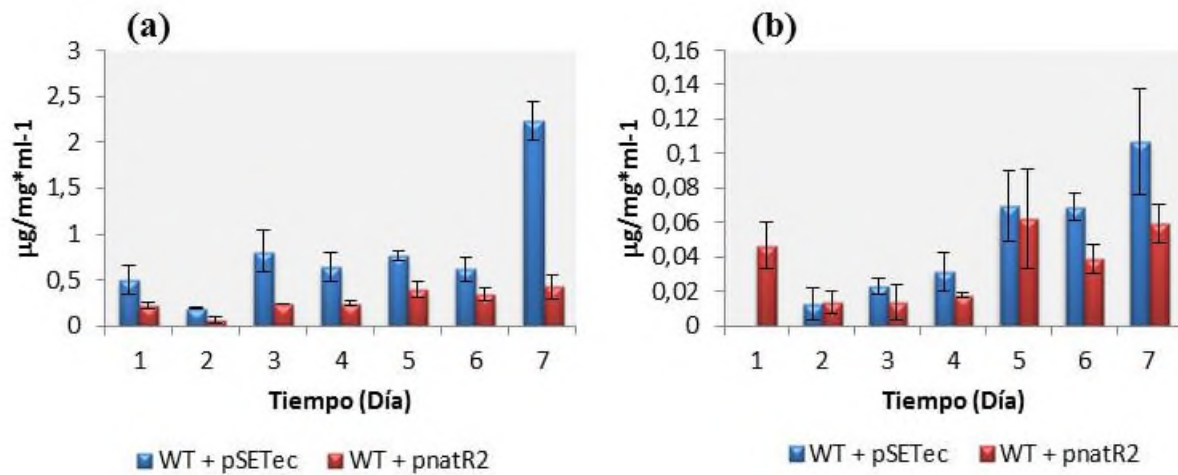


Figura 72. a) Producción de naxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR2 que sobreexpresa el regulador *natR2* y b) Producción de naxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR2.

El gen *natR3* al igual que *natR2* codifica un regulador transcripcional del tipo TetR. La sobreexpresión de este regulador, de la misma forma que *natR2*, conduce a una disminución de la producción del naxazol a lo largo del tiempo (Fig. 73a). En el caso del naxazol hidroxilado también hay una disminución con respecto al control (Fig. 73b).

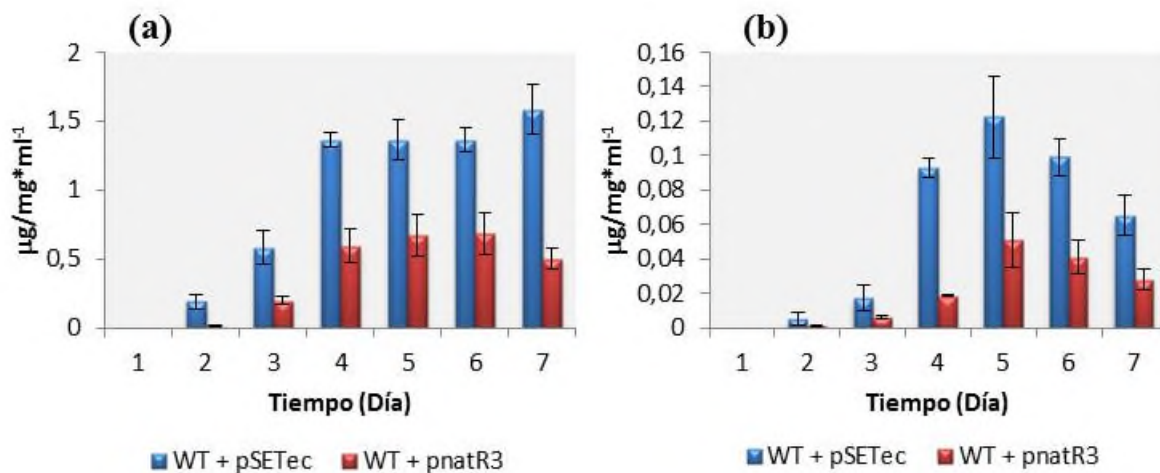


Figura 73. a) Producción de naxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR3 que sobreexpresa el regulador *natR3* y b) Producción de naxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR3.

El último gen regulador ensayado fue *natR4* que codifica una proteína con alta similitud con representantes de la familia de reguladores transcripcionales tipo SARP. El análisis de la producción de nataxazol muestra que el día 1 ambas cepas tienen una producción de nataxazol muy similar. Sin embargo, a partir del segundo día la producción del nataxazol en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4 se dispara, habiendo un aumento de la producción hasta el último día (Fig. 74a). Por otro lado, volvemos a encontrar una producción variable del nataxazol hidroxilado que en los primeros cuatro días muestra una menor producción en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4 que en el control, para aumentar ligeramente en los días finales (Fig. 74b).

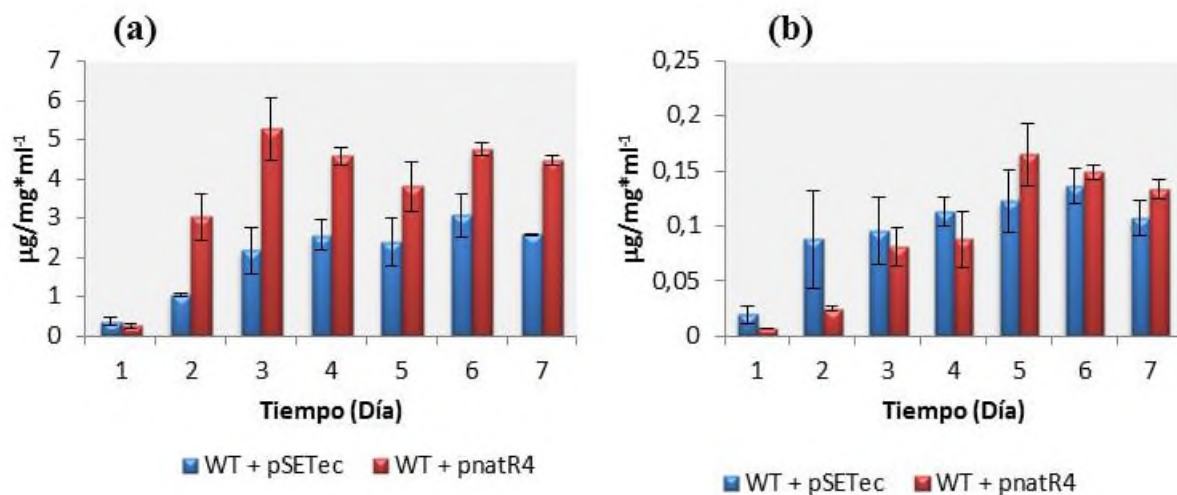


Figura 74. a) Producción de nataxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4 que sobreexpresa el regulador *natR4* y b) Producción de nataxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4.

Si comparamos todos los reguladores juntos (Fig. 75a) se observa claramente que los reguladores *natR1* y *natR4* tienen un efecto positivo sobre la producción de nataxazol mientras que *natR2* y *natR3* tienen un efecto negativo. Por otro lado, la producción de nataxazol hidroxilado es errática y muy variable a lo largo del tiempo (Fig. 75b).

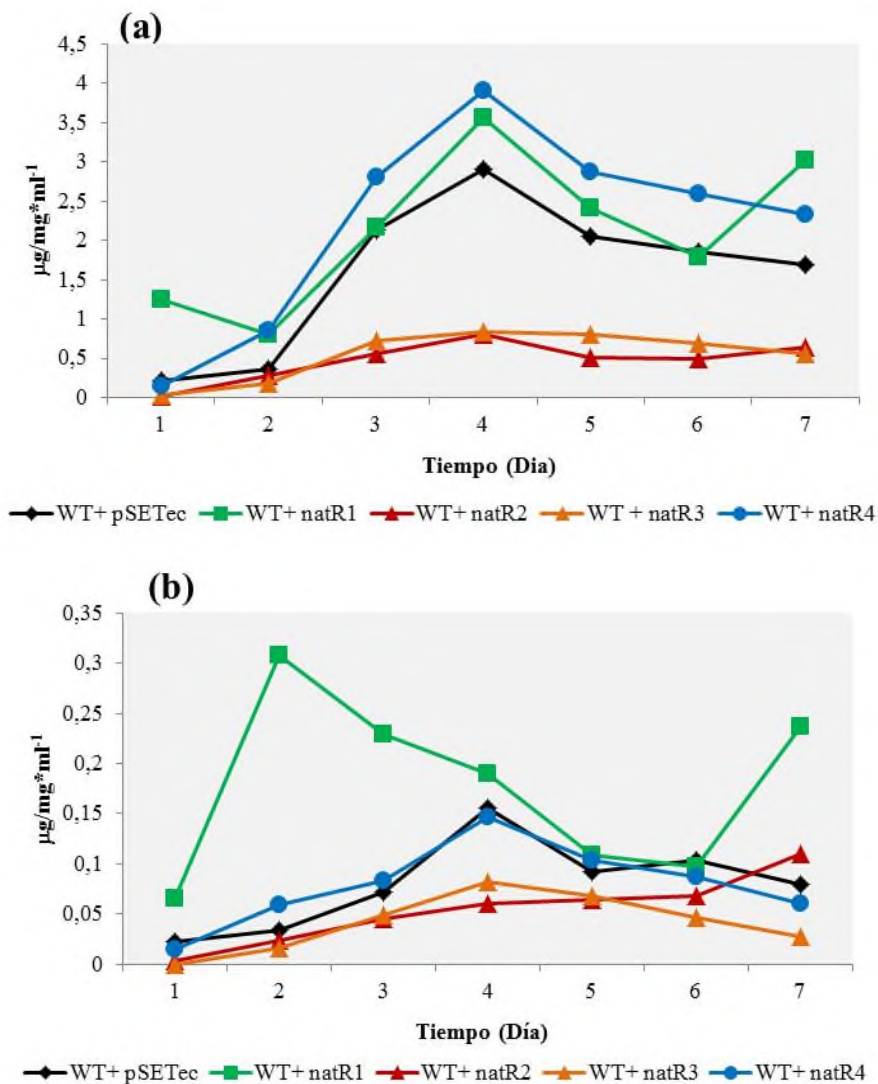


Figura 75. a) Comparación de la producción de naxazol a lo largo del tiempo entre *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR2, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR3 y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4. **b)** Comparación de la producción de naxazol hidroxilado a lo largo del tiempo entre *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR2, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR3 y *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4.

Al mismo tiempo que se estudiaba el efecto de estos reguladores sobre el naxazol, también se estudio su efecto sobre UK-1. Sin embargo, en todos los casos la producción de UK-1 no se ve alterada en las condiciones ensayadas.

3.8.2 Inactivación de *natR3* y *natR4*.

Para verificar la participación de alguno de los reguladores expresados previamente en el control de la biosíntesis de naxazol, se abordó la inactivación de *natR3* y *natR4*, considerando que marcarían el límite inferior del *cluster 3* y están

cercanos al *cluster* 4. Para lograr este objetivo se utilizaron los plásmidos p Δ natR3 y p Δ natR4 y se obtuvieron clones resistentes a apramicina. Al clon con el gen *natR3* delecionada se le denominó *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR3 (Δ natR3) mientras que a los clones con el gen *natR4* delecionado se les denominó *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR4 (Δ natR4). Se comprobó que eran correctos por PCR (Fig. 76). La PCR de comprobación de Δ natR3 se realizó utilizando los *primers* TetR27fw y TetR27rv. En la cepa silvestre *natR3* conduce a la aparición de una banda de 900 bp mientras que en la cepa Δ natR3 al haber sido sustituido el regulador por *aac(3)IV* se obtiene una banda de 1'8 kb (Fig. 76a). En el caso de la comprobación de la cepa mutante Δ natR4 se utilizaron los cebadores SARP29fw y SARP29rv. En la cepa silvestre *natR4* tiene un tamaño de 2'6 kb mientras que en la cepa Δ natR4 el tamaño de la banda obtenida es de 1'7 kb por haberse reemplazado dicho regulador por *aac(3)IV* (Fig. 76b).

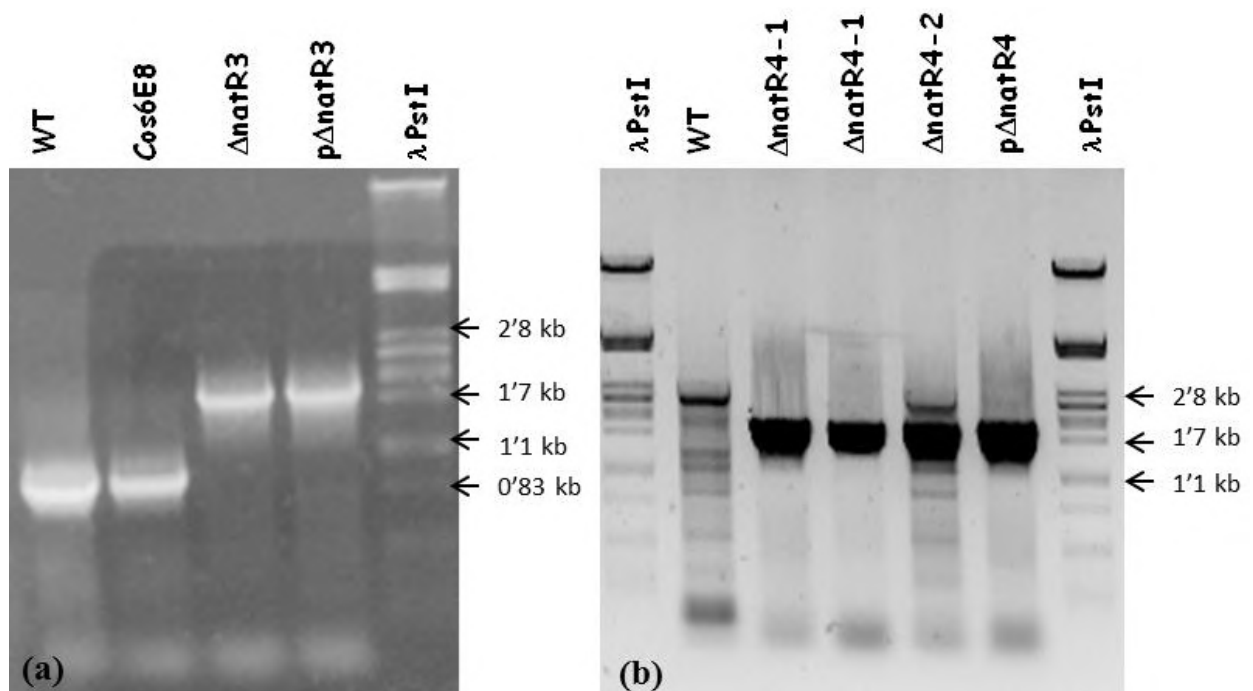


Figura 76. a) PCR de comprobación de la cepa mutante Δ natR3 b) PCR de comprobación de la cepa mutante Δ natR4.

A continuación, para el análisis de la producción de nataxazol por estos mutantes se siguieron las mismas etapas que en el caso de las sobreexpresiones, analizando la

producción de los diferentes compuestos a lo largo de 7 días de incubación en R5A líquido.

El análisis de la producción en $\Delta natR3$ mostró un aumento significativo de la producción de nataxazol a lo largo del tiempo (Fig. 77a) siendo su máxima producción al sexto día con un incremento de 2'31 veces con respecto al control. La inactivación de *natR3* tiene un efecto contrario a su sobreexpresión por lo que se puede afirmar que ejerce una función represora sobre la ruta de biosíntesis de nataxazol. Por otro lado, la producción de nataxazol hidroxilado muestra un perfil similar al de la producción nataxazol (Fig. 77b).

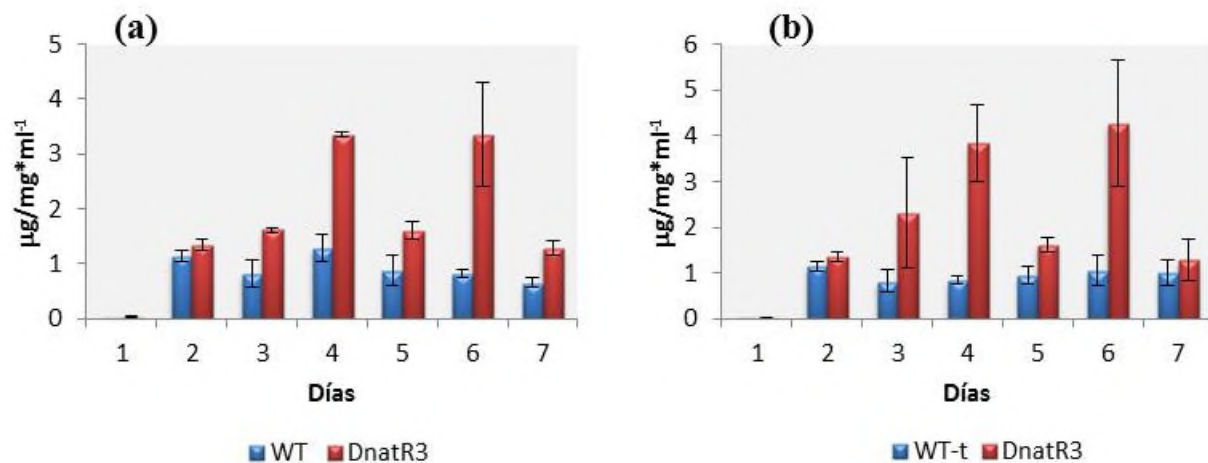


Figura 77. a) Producción de nataxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *Streptomyces* sp. Tü 6176 $\Delta natR3$ y **b)** Producción de nataxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *Streptomyces* sp. Tü 6176 $\Delta natR3$. *DnatR3: $\Delta natR3$

Con respecto a la delección de *natR4*, el análisis de la producción a lo largo de 7 días por parte de $\Delta natR4$ mostró una disminución de hasta el 56% de nataxazol. Sin embargo, a las 24 horas la producción de nataxazol es mayor en la cepa $\Delta natR4$ que en el control, a partir de ese momento la producción de nataxazol en la cepa mutante se mantiene constante sin aumentos y por debajo de la producción de la cepa silvestre (Fig.78a). En este caso, la producción de nataxazol hidroxilado mantiene un perfil errático (Fig. 78b).

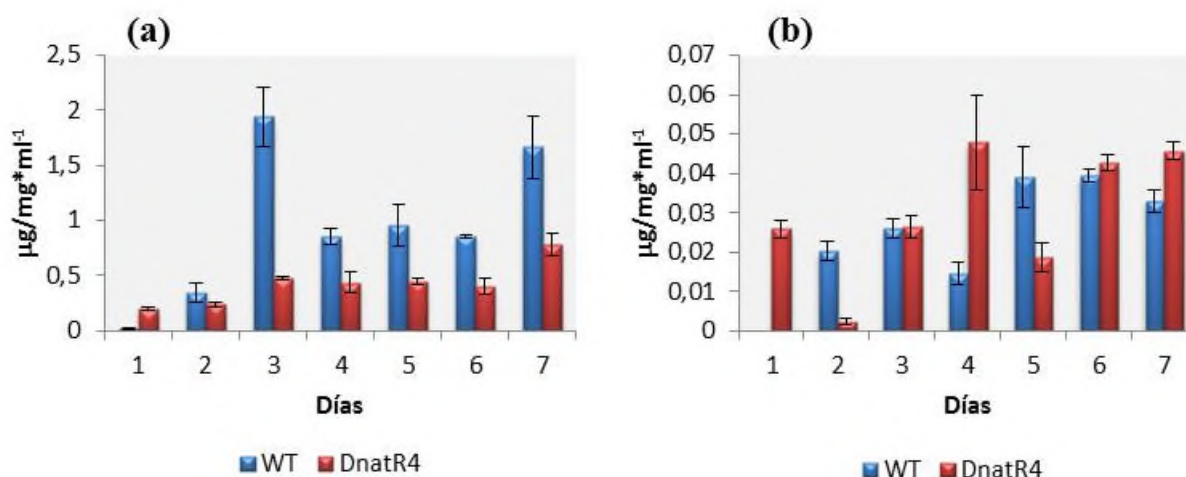


Figura 78. a) Producción de nataxazol a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR4 y b) Producción de nataxazol hidroxilado a lo largo del tiempo por *Streptomyces* sp. Tü 6176 y *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR4. *DnatR4: Δ natR4

Del mismo modo que en las sobreexpresiones de los reguladores, se estudio también en este caso el efecto de la inactivación de *natR3* y *natR4* sobre la producción de UK-1. En ambos casos se observó que en estas condiciones de cultivo los reguladores estudiados no afectan a la producción de UK-1, probablemente debido a la pobre expresión del gen *cf54_20720* que codifica la salicilato sintasa del *cluster 25*.

3.8.3 Producción de AJI9561 por *Streptomyces* sp. Tü 6176.

Durante la realización de los experimentos de sobreexpresión de los genes reguladores y su inactivación en *Streptomyces* sp. Tü 6176 se observó en algunos casos la aparición de un nuevo benzoxazol a las 24 horas de cultivo que, en tiempos posteriores, iba desapareciendo a medida que se acumulaba nataxazol (1). Este compuesto (14) presenta una movilidad en UPLC de 6'2 min y se observó, principalmente en las cepas que presentan un aumento de la producción de nataxazol: *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR1, *Streptomyces* sp. Tü 6176/pnatR4 y *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR3 (Fig. 79a).

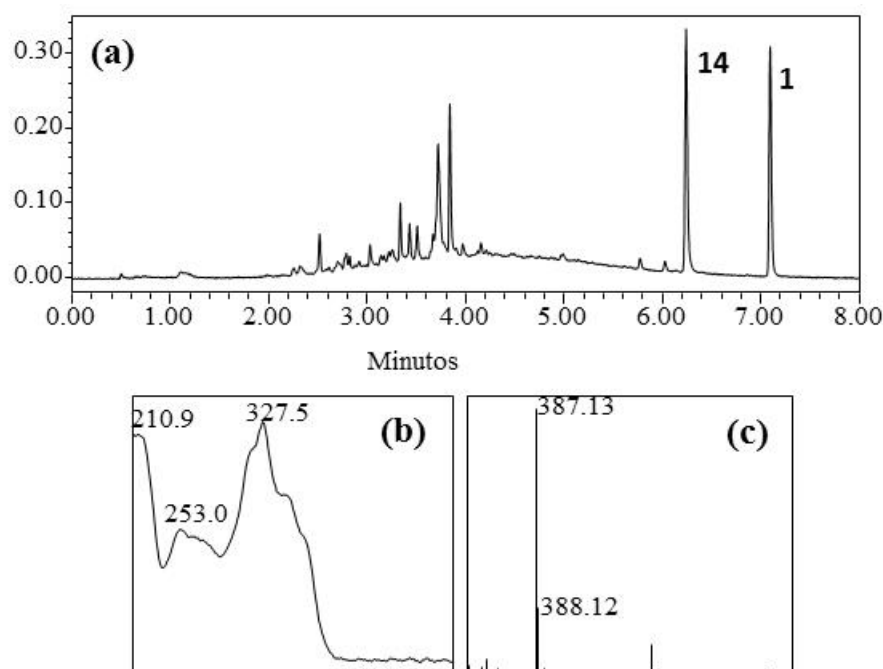


Figura 79. a) Cromatograma de extractos obtenidos a las 24 horas de cultivo de Δ natR3. b) Espectro de absorción del compuesto **14**. c) Espectro de masas del compuesto **14**.

Se utilizó la muestra correspondiente a la cepa Δ natR3 para analizar este compuesto mediante HPLC-MS siendo el resultado de 387 m/z $[M+H]^+$. Este compuesto presenta la misma masa que el UK-1 pero una movilidad diferente. Teniendo en cuenta todos estos datos lo más probable es que el compuesto **14** corresponda a AJI9561, previamente descrito por Sato y colaboradores (2001), debido a que es estructuralmente muy parecido al nataxazol y sería intermediario de la biosíntesis de éste, siendo necesaria únicamente la metilación del grupo carboxilo de la segunda unidad de 3-HAA para dar lugar al compuesto final.

3.9 Caracterización de *natX*.

La única actividad que faltaría por identificar en el cluster de biosíntesis de nataxazol es la metiltransferasa necesaria para transformar AJI9561 (**14**) en nataxazol (**1**). No se ha localizado ningún gen dentro del agrupamiento génico que codifique una metiltransferasa, tal como se explica en el apdo. 3.3. Por otro lado, en el *cluster* de biosíntesis de nataxazol se localiza el gen *natX* el cual no tiene función asignada pues no presenta similitud con proteínas previamente descritas. NatX podría tratarse de una metiltransferasa atípica encargada de la conversión de AJI9561 en nataxazol.

Con el objetivo de caracterizar esta posible función de NatX, se procedió a realizar un experimento de bioconversión con AJI9561 y caboxamicina. Para ello, primero se procedió a purificar el AJI9561 utilizando la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natR3 (aptdo 2.19.5). Al mismo tiempo, se construyó el plásmido pnatX usando el vector pEM4T. El plásmido se introdujo en *S. albus* J1074, se seleccionó un transconjugante positivo y se cultivó en tres matraces con R5A líquido durante 24 horas utilizando como control *S.albus* J1074/pEM4T. Tras ese periodo se procedió a añadir a los matraces 5 μ g de AJI9561 o 5 μ g de caboxamicina, manteniendo el último como control. Los seis matraces se volvieron a incubar durante 24 horas obteniéndose posteriormente extractos, usando acetato de etilo/1% ácido fórmico, de cada uno de ellos. En el caso de la bioconversión del AJI9561 se esperaba que este se transformara en nataxazol lo que indicaría que el gen *natX* codifica una metiltransferasa. Del mismo modo, en el caso de la bioconversión de caboxamicina se espera su metilación dando lugar a una caboxamicina metilada.

Los correspondientes extractos fueron analizados mediante UPLC observándose que en ningún caso los compuestos se habían metilado transformando AJI9561 o caboxamicina en sus correspondientes productos metilados nataxazol o caboxamicina metilada (Fig. 80).

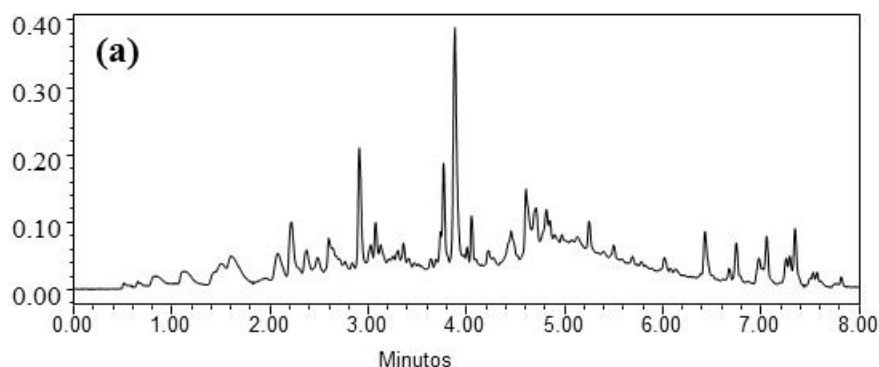


Figura 80. a) Cromatograma del extracto de *S. albus* J1074/pnatX (control).

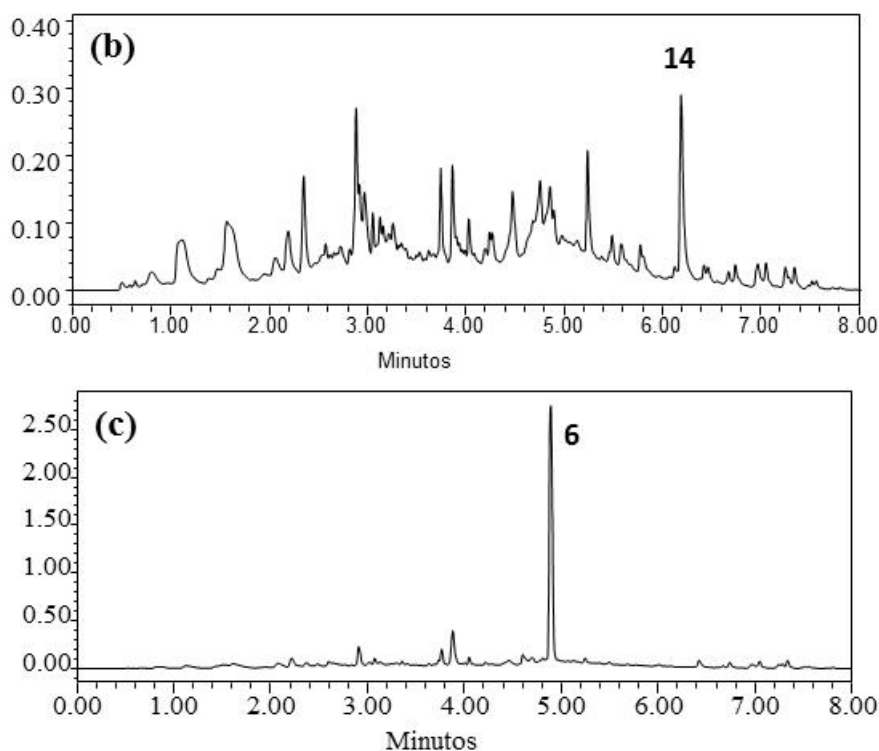


Figura 80 (continuación). **a)** Cromatograma del extracto de *S. albus* J1074/pnatX (control). **b)** Cromatograma del extracto de *S. albus* J1074/pnatX al que se ha añadido AJI9561(14). **c)** Cromatograma del extracto de *S. albus* J1074/pnatX al que se le ha añadido caboxamicina (6).

3.10 Expresión heteróloga del *cluster* de biosíntesis del nataxazol.

3.10.1 Expresión secuencial del *cluster*.

Con el objetivo de reconstruir la ruta de biosíntesis de nataxazol paso a paso y de este modo delimitar los límites del agrupamiento génico, se decidió expresar los genes del *cluster* de forma secuencial en *S. albus* J1074. La elección de esta cepa se debe a que ya posee los genes necesarios para la biosíntesis de 3-HAA (Olano *et al*, 2014b). De esta forma, *a priori* solo sería necesario introducir *natPK* y los demás genes para la unión de los precursores. Para ello, se realizaron distintas combinaciones de genes utilizando los vectores pEM4T y pSETec en los cuales la expresión de los correspondientes genes se realizó bajo el control del promotor constitutivo *ermE***p* (Tabla 17).

Tabla 17. Tabla resumen de todas las combinaciones que se hicieron de forma secuencial y los resultados obtenidos

Genes en pEM4T	Genes en pSETec
<i>natPK</i> (p <i>natPK</i>)	<i>natAM</i> , <i>natAC1</i> , <i>natL1</i> y <i>natS</i> (p <i>natAM-L1-Sε</i>)
<i>natPK</i> , <i>natL2</i> , <i>natX</i> (p <i>natL2-PK</i>)	
<i>natPK</i> , <i>natL2</i> , <i>natX</i> (p <i>natL2-PK</i>)	<i>natAM</i> , <i>natAC1</i> (p <i>natAM-AC1t</i>)
<i>natPK</i> , <i>natL2</i> , <i>natX</i> (p <i>natL2-PK</i>)	<i>natAC1</i> , <i>natL1</i> y <i>natS</i> (p <i>natAC1-St</i>)
<i>natPK</i> , <i>natL2</i> , <i>natX</i> (p <i>natL2-PK</i>)	<i>natAM</i> , <i>natAC1</i> , <i>natL1</i> y <i>natS</i> (p <i>natAM-L1-St</i>)

La primera combinación que se realizó fue la expresión de *natPK* junto con *natAM*, *natAC1*, *natL1* y *natS* donde se esperaba la formación de algún compuesto intermediario de la ruta. Sin embargo no hubo producción de ningún intermediario ni tampoco de 6-MSA (compuesto que sabemos produce NatPK, aptdo. 3.2). Por otro lado, se procedió a expresar *natPK* junto con *natL2* y *natX* con el mismo objetivo. En esta ocasión aunque no hubo producción de ningún intermediario, si se acumuló 6-MSA (Fig. 81). De modo que se le introdujo en la cepa anterior los genes *natAM* y *natAC1* (p*natAM-AC1t*), que como se ha visto en el aptdo. 3.8 serían necesarios para la unión de los precursores. En este caso el resultado volvió a ser negativo y no se obtuvieron ni intermediarios de nataxazol ni la acumulación del precursor 6-MSA. La siguiente combinación de genes incluía *natPK*, *natL2* y *natX* (p*natL2-PK*) junto con *natAC1*, *natL1* y *natS* (p*natAC1-St*) pero el resultado fue también negativo. No obstante en esta ocasión el resultado era previsible ya que faltaba el gen *natAM* que codifica la amidohidrolasa. De tal forma que, finalmente, se introdujeron todos los genes juntos excepto los encargados de la formación de 3-HAA esperando obtener AJI9561. El resultado fue también negativo.

Tras estos resultados, se pensó que podía ocurrir que no se estaba incorporando 3-HAA de la célula huésped en la producción de benzoxazoles, por lo que se decidió suplementar el medio de cultivo con 3-HAA. Sin embargo, tampoco en este caso se observó la producción de AJI9561 o cualquier otro intermediario de la ruta de biosíntesis de nataxazol.

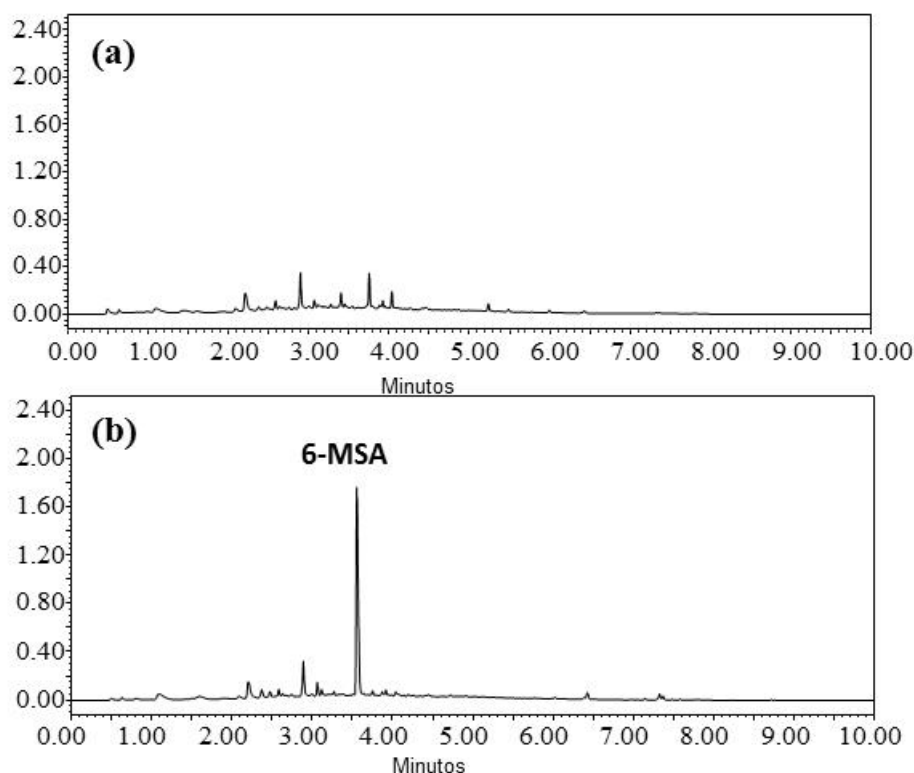


Figura 81. a) Cromatograma de UPLC de extracto de *S. albus* J1074/pEM4T b) Cromatograma UPLC de extracto de *S. albus* J1074/pnatL2-PK

3.10.2 Expresión heteróloga del *cluster* completo.

Puesto que la aproximación anterior resultó fallida, se procedió a la expresión heteróloga del agrupamiento génico 3 completo. Para ello, se llevaron a cabo dos estrategias diferentes. En primer lugar se utilizó el cósmido cos6E8 clonándolo en pEBZ333 (aptdo. 2.17.3) obteniéndose la construcción BAC-6E8. La segunda estrategia consistió en rescatar gran parte del agrupamiento génico, desde el regulador *natR2* hasta *orf+1*, como un fragmento AvrII-NheI de 32 kb que fue clonado en pEBZ333 digerido NheI obteniéndose así la construcción BAC-natT1/AC2.

Ambas construcciones se introdujeron en *S. albus* J1074 utilizando la técnica de transformación de protoplastos (aptdo. 2.12). Los transconjugantes obtenidos se sembraron en R5A sólido durante 7 días a 30°C realizando posteriormente extractos usando acetato de etilo/1%de ácido fórmico. Al analizar los extractos mediante UPLC se observó que no había producción de nataxazol, AJI9561, ni cualquier otro posible intermediario con espectro de benzoxazol. Tampoco se observó la producción de 6-

MSA. Para comprobar que la construcción utilizada estaba realmente presente e intacta en *S. albus* se procedió a extraer el ADN total de los transconjugantes para realizar comprobaciones por PCR. Para ello, se realizaron cuatro PCRs diferentes. El primero de ellos consistió en comprobar que el plásmido estaba en el interior usando los cebadores Aprafw y Aprarv los cuales amplifican las 600 bp del gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* (Fig. 82a). Se utilizó como controles el ADN de pEBZ333 (**calle 1**) y del plásmido BAC-6E8 (**calle 2**) y luego, se analizó el ADN de dos clones de *S.albus*/BAC-6E8 (**calle 3 y 4**). Por otro lado, se utilizaron 3 parejas de oligonucleótidos para amplificar tres genes situados en distintas posiciones dentro del *cluster*. La primera pareja, TetR27fw y TetR27rv, amplifica 900 bp correspondiente al gen *natR3* localizado cerca del extremo 3' (Fig. 82b). Se utilizó como control el plásmido BAC-6E8 (**calle 6**) y, además, el plásmido pnatR3 (**calle 5**) y se analizaron los dos clones de *S.albus*/BAC-6E8 (**calle 7 y 8**). La siguiente pareja, TetR14afw y TetR14arv, amplifica las 900 bp correspondientes a *natR2* cercano al extremo 5' del *cluster* (Fig. 82c). En este caso, se mantuvo el control BAC-6E8 (**calle 10**) incluyó como control adicional el plásmido pnatR2 (**calle 9**), además de los clones de *S.albus*/BAC-6E8 (**calle 11 y 12**). En la última PCR de comprobación se usó la pareja de oligonucleótidos ACPsintfw y ACPsintrv que amplifica 1'2 kb de *natS* localizado en el centro del agrupamiento génico. En esta ocasión como control solo se utilizó el BAC-6E8 (**calle 13**) (Fig. 82d).

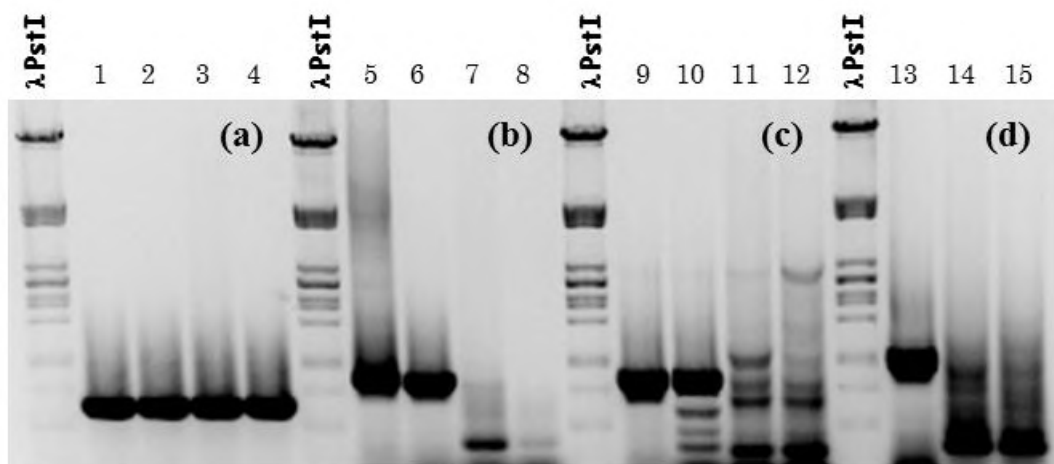


Figura 82. Comprobación por PCR de los clones de *S.albus* + BAC-6E8. a) PCR para la amplificación del gen de resistencia a apramicina b) PCR para la amplificación de *natR3* c) PCR para la amplificación de *natR2*. Y d) PCR para la amplificación de *natS*.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con la construcción BAC-natT1/AC2 obteniéndose los mismos resultados. Los diferentes clones de *S. albus* J1074/BAC-natT1/AC2 no produjeron nataxazol, AJI9561 ni ningún intermediario de la ruta. La comprobación por PCR de estas cepas se obtuvo el mismo resultado que en las cepas *S. albus* J1074/BAC-6E8 (Fig. 82). En ambos casos queda claro se ha delecionado el *cluster* de biosíntesis de nataxazol al introducirlo en *S. albus* J1074, ya que las construcciones iniciales (BAC-6E8 y BAC-natT1/AC2) son estables en *E. coli*.

Se procedió entonces a introducir ambas construcciones en otros estreptomicetos: *S. argillaceus* (productor de mitramicina), *S. lividans* JT46 y *Streptomyces* sp. NTK 937 (productor de caboxamicina). De cada una de estas cepas se analizaron por UPLC entre 10 y 12 colonias, siendo el resultado, en todos los casos, el mismo que con *S. albus* J1074. Tres representantes de cada estreptomicetos fueron analizados por PCR para comprobar la estabilidad de la construcción, siendo de nuevo el resultando la deleción de la ruta de biosíntesis de nataxazol.

3.10.3 Expresión heteróloga de la ruta a través del plásmido integrativo pNATAR.

Tras los resultados negativos obtenidos a la hora de expresar la ruta de biosíntesis de nataxazol utilizando BAC-6E8 o BAC-natT1/AC2, se decidió construir un nuevo plásmido, pNATAR, utilizando un vector integrativo el cual fuera más estable dentro de *Streptomyces* spp. Para ello, se utilizó la técnica *TAR cloning* (aptdo. 2.17.3.1). La región clonada en este plásmido incluye desde el gen regulador *natR1* hasta el último gen de la ruta *natAC2*, conteniendo por lo tanto únicamente la región propuesta para la biosíntesis de nataxazol.

De igual forma que se hizo con los plásmidos BAC-6E8 y BAC-natT1/AC2, pNATAR se introdujo por transformación de protoplastos en *S. albus* J1074 siendo el resultado de los clones obtenidos el mismo que cuando se introdujo BAC-6E8 y BAC-natT1/AC2. Los clones obtenidos presentaban el agrupamiento génico delecionado. Del

mismo modo, se procedió a introducirlo en *S. argillaceus* obteniéndose el mismo resultado.

Después de los resultados obtenidos con *S. albus* J1074 y *S. argillaceus* se decidió obtener el plásmido pNATAR Δ AM con *natAM* delecionado y sustituido por URA3 por lo que la cepa no debe ser capaz de producir ni nataxazol ni AJI9561 ni ningún intermediario de la ruta. Este plásmido y pNATAR se introdujeron dentro de la cepa *S. lividans* JT46 que tiene una baja tasa de recombinación (Tsai y Chen, 1987). Los clones obtenidos se cultivaron en R5A y se analizaron sus extractos por UPLC observándose que en algunos de los clones de *S. lividans*/pNATAR aparecía un compuesto con la movilidad y el espectro del compuesto **14**, previamente identificado como AJI9561 (Fig. 83b). Este compuesto se analizó también por HPLC-MS siendo la masa de 387 m/z $[M+H]^+$, lo cual coincide con la masa de AJI9561. Por otro lado, los clones de *S. lividans*/ pNATAR Δ AM no acumulaba ni nataxazol ni AJI9561 ni de ningún intermediario pero sí se observa la acumulación de 6-MSA (Fig. 83c). Tras este resultado se introdujo el plásmido pNATAR Δ AM también en *S. albus* J1074 observandose también la acumulación de 6-MSA en todos los clones analizados.

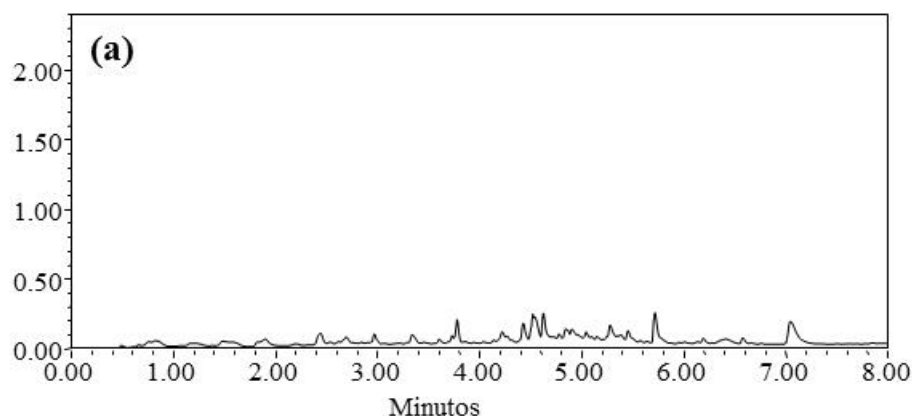


Figura 83. a) Cromatograma de UPLC del extracto obtenido de *S. lividans*/pCAP1 (control) y

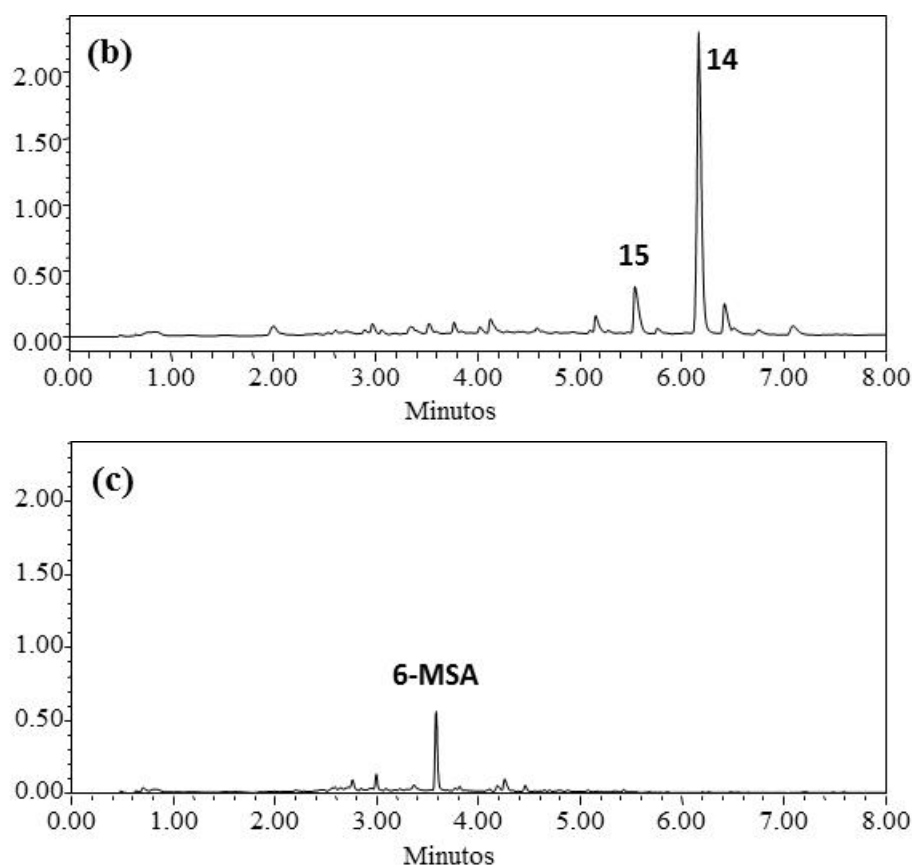


Figura 83 (continuación). **b)** Cromatograma de UPLC del extracto obtenido de *S. lividans*/pNATAR.

En estos experimentos se observó un compuesto adicional (**15**) con una movilidad de 5'6 min y espectro de benzoxazol (Fig. 83). El análisis de este compuesto mediante HPLC-MS mostró una masa de 403 m/z $[M+H]^+$, 16 unidades más que AJI9561 por lo que éste puede estar sufriendo una hidroxilación inespecífica por parte de alguna hidroxilasa de *S. lividans* JT46 ya que el cluster carece de alguna proteína que pueda realizar esta función.

Una observación importante en este experimento fue que *S. lividans*/pNATAR, productor de AJI9561, alcanzó en todos los experimentos realizados pesos secos finales un 40-50% inferiores a aquellos observados con la cepa control *S. lividans*/pCAP1 y en *S. lividans*/pNATAR Δ AM que mantiene peso secos semejantes a la cepa control. Esto nos podría estar indicando una posible actividad antibiótica ejercida por AJI9561.

3.10.4 Actividad antibiótica de AJI9561.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que el compuesto final de la ruta biosíntesis del agrupamiento génico 3 es el AJI9561 mientras que el nataxazol es el resultado de la acción de una metiltransferasa de otro *cluster* sobre el AJI9561. Además, se observó que el clon *S. lividans*/pNATAR, capaz de producir AJI9561 crecía mucho menos que la cepa control y que la cepa con *natAM* delecionada, *S. lividans*/pNATAR Δ AM por lo que se hipotetizó que AJI9561 podría tener actividad antibiótica frente a *Streptomyces* spp.

Para demostrar que AJI9561 presenta actividad antibiótica se realizaron bioensayos frente a todas las cepas de *Streptomyces* spp. en las que se pretendió introducir la ruta de biosíntesis de nataxazol. Se utilizó como control el nataxazol ya que se conoce que no presenta actividad antibiótica. Las cantidades utilizadas fueron 0 μ g, 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g y 25 μ g.

Todas las cepas muestran sensibilidad frente al AJI9561 desde 1 μ g (dato no mostrado) hasta 25 μ g mientras que todas ellas son resistentes a nataxazol (Fig. 84). Este resultado explica por qué la cepa *S. lividans*/pNATAR crece mucho menos que la cepa control y además, las deleciones sufridas cuando se intentó introducir la ruta a través de los plásmidos BAC-6E8, BAC-natT1/AC2 y pNATAR en los distintos *Streptomyces* spp. Posiblemente la metilación de AJI9561 para su conversión en nataxazol constituya un mecanismo de resistencia como pueden ser las acetilaciones y otras modificaciones de antibióticos descritas en la literatura (Wright, 2005).

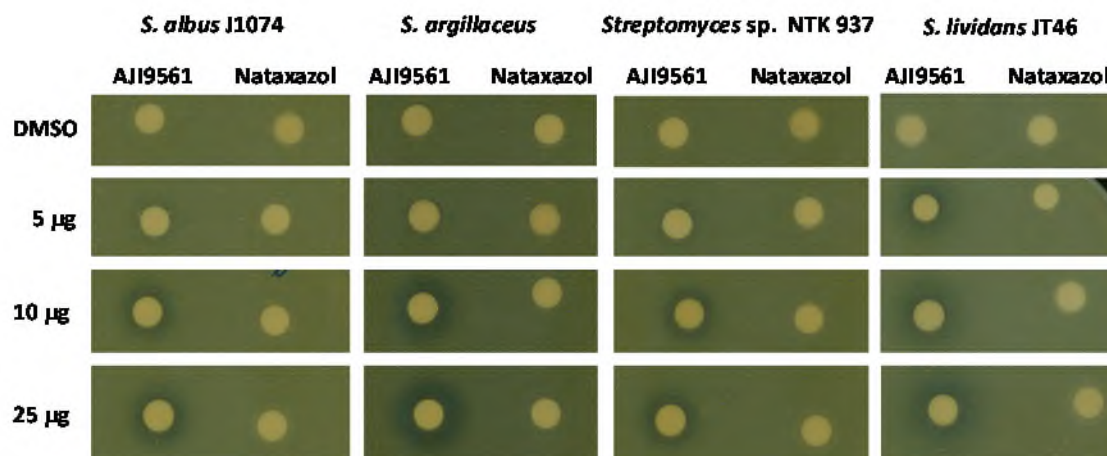


Figura 84. Bioensayos realizados para comprobar la actividad antibacteriana de AJI9561.

Por otro lado AJI9561 también presenta actividad frente a *Micrococcus luteus* (Gram positiva) a partir de 5 µg pero no presenta actividad frente a *E. coli* ni ante *Candida albicans*.

3.11 Nataxazol y Nataxazol hidroxilado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente el producto final del *cluster* 3 de biosíntesis de nataxazol es en realidad AJI9561. En este agrupamiento génico no están presentes los genes que codifican la metiltransferasa encargada de transformar AJI9561 en nataxazol, ni la oxigenasa que determina la conversión de nataxazol en nataxazol hidroxilado. Por lo tanto se procedió a tratar de identificar los genes responsables de estas actividades. Para ello, centramos nuestra atención de nuevo en el *cluster* 25 el cual ya se ha demostrado interacciona con la ruta de biosíntesis de nataxazol para la producción de UK-1. En este *cluster* (Fig. 49) se localizan los genes *cf54_20690*, *cf54_20695* y *cf54_20685* que codifican respectivamente una metiltransferasa, un citocromo P450 y una oxidoreductasa que eventualmente podrían metilar AJI9561 e hidroxilar nataxazol.

El gen *cf54_20690*, codifica una metiltransferasa que presenta similitud con la metiltransferasa SCO7688 de *S. coelicolor* A3 (2), con la metiltransferasa SMCF_620 (EHN79792.1) de *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 que puede estar implicada en la biosíntesis de la acarviostatina (Guo *et al.*, 2012) y con una metiltransferasa

SACTE_0735 (AEN08666.1) de *Streptomyces* sp. SirexAA-E. Las metiltransferasas se caracterizan con poseer un dominio XGXGXG implicado en el proceso de metilación (Singh *et al*, 2011). Se realizó un alineamiento de CF54_20690 con diferentes O-metiltransferasas de estreptomicetos, incluida Irp3, observándose que todas ellas presentan el dominio característico (Fig. 85).

CF54_20690	LEIGAGTGRITEVIAAALPDAEILAAEPSATMRAMLTSRVARDPDLRRRVTVVDGAAQDL	120
SCO7688	LEIGAGTGRVTEVVAAALPEAEILAAEPSATMRAMLTSRVARDPDLRRRVTVVDGAAQDL	120
SMCF_620	LEIGAGTGRVTEVIASALPGAELAAEPSATMRAMLTSRVARDPDLRRRVTVVDGAAQDL	120
SACTE_0735	LEIGAGTGRVTEVIAAALPDAEILAAEPSASMRAMLTSRVARDPDLRRRVTVVDGAAQDL	120

Figura 85. Alineamiento parcial de CF54_20690 con SCO2670 (*S. coelicolor* A3(2)), SCO7688 (*S. coelicolor* A3(2)) y Irp3 (*S. lividans* 1326) y localización del dominio XGXGXG.

Los citocromos P450 son una familia de oxigenasas distribuida ampliamente en estreptomicetos (Zhao *et al*, 2012) que tienen la capacidad de catalizar una gran cantidad de reacciones (Guengerich, 2001). El citocromo P450 CF54_20695 presenta una alta similitud con el citocromo P450 SCO7686 del cluster de coelibactina en *S. coelicolor* A3(2), tal como era de esperar por la gran similitud entre ambos agrupamientos. Estudios *in vitro* realizados por Lim y colaboradores (2012) demuestran que este citocromo SCO7686 introduce una hidroxilación sobre el estradiol para dar lugar a estriol. Para verificar que CF54_20695 presenta los dominios característicos de otros citocromos P450 se realizó un estudio comparativo entre secuencias de citocromos P450 descritas en la bibliografía como hidroxilasa, entre ellos el citocromo P450 SCO7686 y los citocromos P450 del estudio de Yu y colaboradores (2014): HerG (ruta de biosíntesis de herboxidieno, *Streptomyces chromofuscus*), PIKC (ruta de biosíntesis de la picromicina, *Streptomyces venezuelae*), PdmJ (ruta de biosíntesis de la pradimicina, *Actinomadura hibisca*) y EryF (ruta de biosíntesis de la eritromicina, *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338). Se buscó principalmente el dominio A/GGXD/ET (Fig. 86) el cual está descrito como el sitio de unión del oxígeno con el grupo hemo (Xue *et al*, 1998). También, se buscaron otros dominios muy conservados como EXXR encargado de la estabilidad de la unión del grupo hemo y como XXGXXXCXG con el punto de unión del grupo hemo.

CF54_20695	EPRDD-----LISRLVTEHLVPG-RLTMDQLLSTLGITINAGRETTTSMIALSTLLL	300
SCO7686	EPRDD-----LISKLVTDHLVPG-NVTTEQLLSTLGITINAGRETTTSMIALSTLLL	300
HerG	TGQGAAGTEESGDLALSALI AVRDTDEGR LSEHELVSMAVQLLIAGHETT VNGIGNAVLNL	300
PIKC	QDGED-----LLSALVRTSDEEDGSRLTSEELLGMAHILLVAGHETT VNL IANGMYAL	300
PdmJ	APADD-----LLSLLSRAHADDG--LSEEE LLTFGMTLLAAGYHTTTAAI THSVYHL	300
EryF	TEPGD-----DLLSALIRVQDDDDGRLSADELTSIALVLLLAGFEASVSLIGIGTYLL	300
CF54_20695	LERPELMEELRRDPSLMPAAVDELLRVLSVAD-SIPLRVA AEIELSGRTIPADDGVIAL	360
SCO7686	LDRPELPAELRKDPDLMPAAVDELLRVLSVAD-SIPLRVA AEIELSGRTVPADDGVIAL	360
HerG	LRHPEQLAALRAEPALLPRAVDELLRFEGPLE-TAILRVATEPIPLGDQVVPAGALVKVV	360
PIKC	LSHPDQLAALRADMTLLDGAVEEMLRYEGPVE-SATYRFPVEPVDLDGTVIPAGDTVLVV	360
PdmJ	LREPSRYARLREDPSGIPAAVEELLRYGQIGGGAGAIRI AVEDVEVGGLTVRAGEAVIPL	360
EryF	LTHPDQLALVRRDPSALPNAVEEILRYIAP-P-ETTRFAAEVEIGGVAIPQYSTVLVA	360
CF54_20695	LAGANHDPEQFDDPGRVDFRRTDNHHVAFGHGVHQCVGQHLARLELEIALETLVRRVPAL	420
SCO7686	LAGANHDPEQFDDPERVDFHRTDNHHVAFGYGVHQCVGQHLARLELEVALETLLRRVPTL	420
HerG	LAAANRDPDRFAAPDTLDITRKNEGHLQFGHGIHNCLGAFLARMETEIAISSLLRRYPGL	420
PIKC	LADAHRTPERFPDPHRFDIRRD TAGHLAFGHGIHF CIGAPLARLEARI AVRALLERC PDL	420
PdmJ	FNAANRDPEVFADPEELDLGRTDNPHIALGHGIHYCLGAPLARLELQVVLETLVERTPAL	420
EryF	NGAANRDPKQFPDPHRFDVTRDTRGHLSFGQGIHF CMCGRPLAKLEGEVALRALFGRFPAL	420

Figura 86. Alineamiento parcial de CF54_20695 con SCO7686, HerG, PIKC, PdmJ y EryF y localización de los dominios implicados en el proceso de hidroxilación.

Finalmente, el gen *cf54_20685*, que codifica una oxidoreductasa que presenta similitud con la oxidorreductasa SSRG_01430 (EFL38626.1) de *Streptomyces griseoflavus* Tü 4000 y particularmente con tiazonilil imida reductasas como SmtA de *Streptomyces* sp. Amel2xE9 (WP_019980105.1) y *Streptomyces globisporus* (WP_030593079.1). Sin embargo, lo que más llama la atención es su similitud con PchG de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 87). La oxidorreductasa PchG de la ruta de biosíntesis de la piochelina se encarga de la reducción de un grupo imida y de la liberación de piochelina de la NRPS (Reimman *et al.*, 2001).

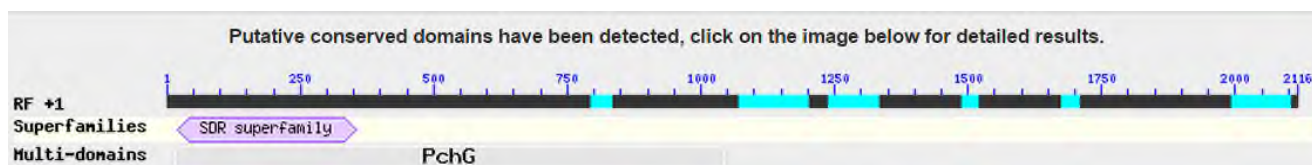


Figura 87. Dominios conservados en CF54_20685.

3.11.1 Expresión heteróloga de *cf54_20690*.

Para confirmar si CF54_20690 está relacionada con la metilación de AJI9561 para generar nataxazol se construyó el plásmido pCoe-MT utilizando el vector pEM4T. Tras

su introducción en *S. albus* J1074 y verificar la presencia del plásmido, se eligió uno de los clones positivos y se creció en TSB durante 24 horas para obtener un preinóculo que se utilizó para inocular dos matraces con 50 ml de R5A líquido los cuales se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones. Eso mismo se hizo con el control *S. albus* J1074/pEM4T. Posteriormente, a uno de los matraces se le adicionó 5 μg de AJI9561 manteniendo el otro como control. Se tomó 1 ml de muestra de cada matraz a las 24 horas y los extractos generados se analizaron por UPLC.

En el análisis por UPLC de los extractos obtenidos se observó que AJI9561 (**14**) no se había transformado en nataxazol (Fig. 88) descartándose por lo tanto que la metiltransferasa CF54_20690 sea la responsable de la metilación de AJI9561.

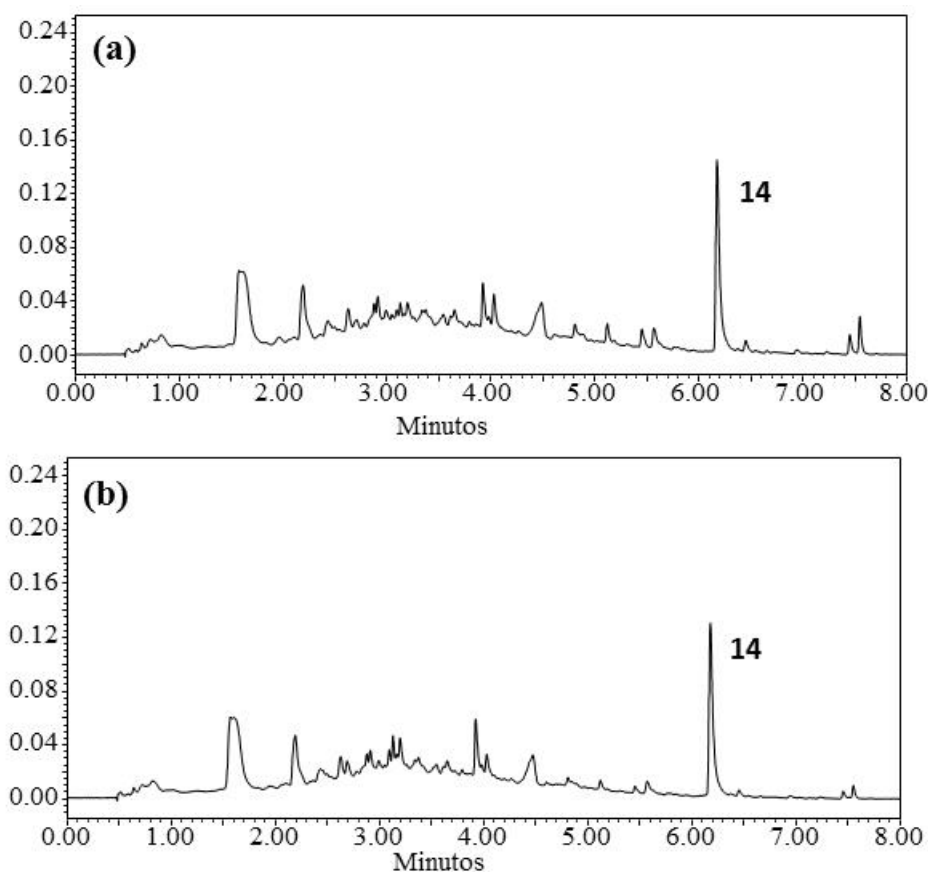


Figura 88. a) Cromatograma de la cepa *S. albus* J1074/pEM4T con 5 μg de AJI9561 y b) Cromatograma de la cepa *S. albus* J1074/pCoe-MT con 5 μg de AJI9561.

3.11.2 Sobreexpresión de *cf54_20695*.

El gen *cf54_20695* del *cluster 25*, que codifica un citocromo P450, se sobreexpresó en *Streptomyces* sp. Tü 6176 con el objetivo de ver si aumentaba la producción de nataxazol hidroxilado en detrimento de nataxazol que debería por lo tanto disminuir. Para ello se construyó el plásmido pCoe-citp450 y se introdujo en *Streptomyces* sp. Tü 6176 por conjugación de micelio. Se incubó durante 7 días a 30°C para obtener transconjugantes resistentes a apramicina que una vez comprobados se cultivaron en R5A sólido durante 7 días para obtener posteriormente extractos que fueron analizados por UPLC.

El análisis por UPLC mostró que no se producía un aumento de nataxazol hidroxilado en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pCoe-citp450. Aunque observando los cromatogramas se puede apreciar una disminución de nataxazol (**1**) en la cepa *Streptomyces* sp. Tü 6176/pCoe-citp450 con respecto al control, esta disminución no está acompañada de un aumento de la producción de nataxazol hidroxilado (**2**) (Fig. 89). Esta disminución de la producción de nataxazol pudo deberse a variaciones normales previamente observadas en *Streptomyces* sp. Tü 6176.

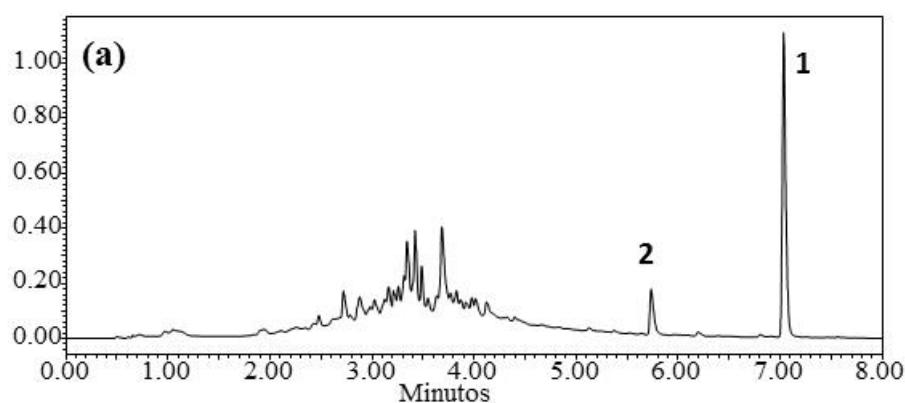


Figura 89. a) Cromatograma de UPLC del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y

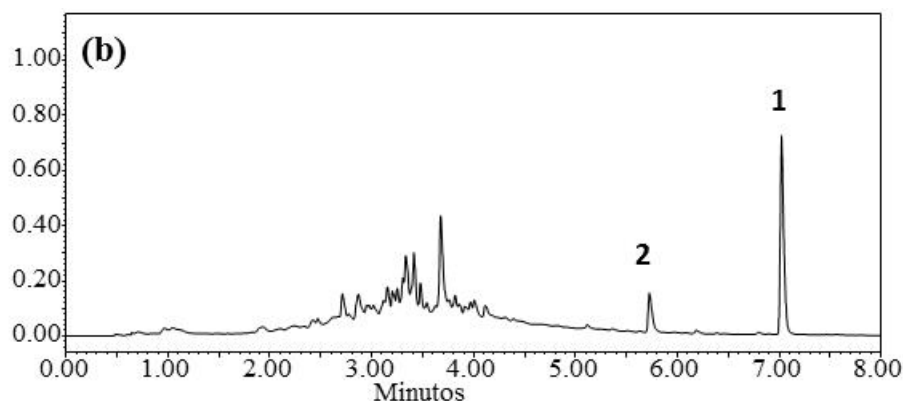


Figura 89 (continuación). b) Cromatograma de UPLC del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176/pCoe-citp450.

Para confirmar este resultado y que las diferencias en la producción de nataxazol se debían a la variabilidad de producción, se decidió introducir la construcción en *S. albus* J1074 y añadirle 5 μg nataxazol para ver si se observaba en este caso su bioconversión en nataxazol hidroxilado. El análisis de los extractos de ULPC mostró que no se produjo tal bioconversión (Fig. 90). De modo que, posiblemente CF54_20695 tenga la capacidad para hidroxilar intermediarios de coelibactina durante su proceso de biosíntesis pero no tiene la flexibilidad de sustrato necesaria para ser la encargada de hidroxilar nataxazol.

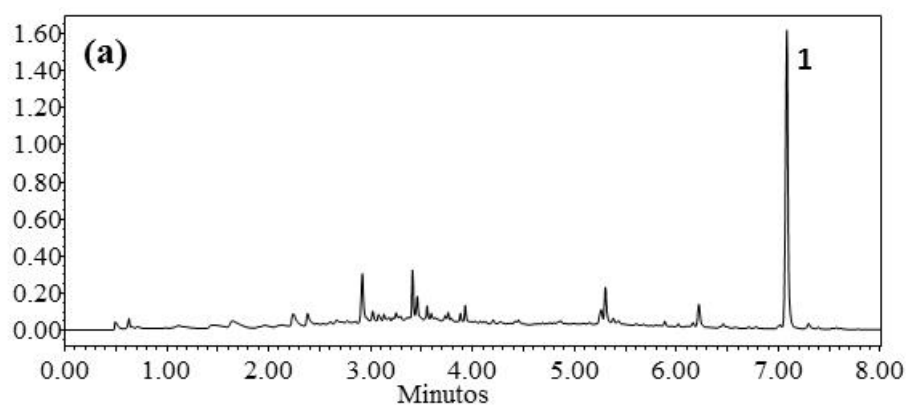


Figura 90. a) Cromatograma de UPLC del extracto de *S. albus* J1074/pSETec + 5 μg de nataxazol y

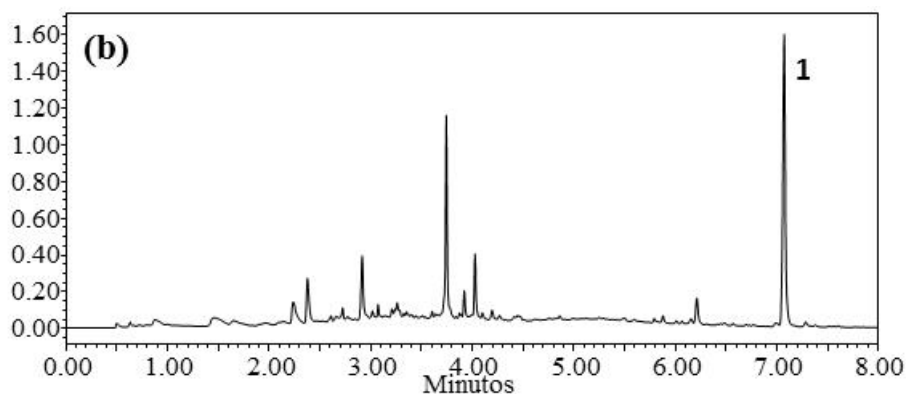


Figura 90 (continuación). **b)** Cromatograma de UPLC del extracto *S. albus* J1074 + 5 μ g de nataxazol.

3.11.3 Sobreexpresión de *cf54_20685*.

El gen *cf54_20685* que codifica una oxidoreductasa, podría estar implicado en la hidroxilación del nataxazol. Para comprobarlo se realizó una sobreexpresión de dicho gen utilizando el plásmido pCoe-oxi. Los extractos de los clones de *Streptomyces* sp. Tü 6176/pCoe-oxi analizados por UPLC no mostraron un aumento del nataxazol hidroxilado al igual que ocurrió con el gen *cf54_20690* (Fig. 91).

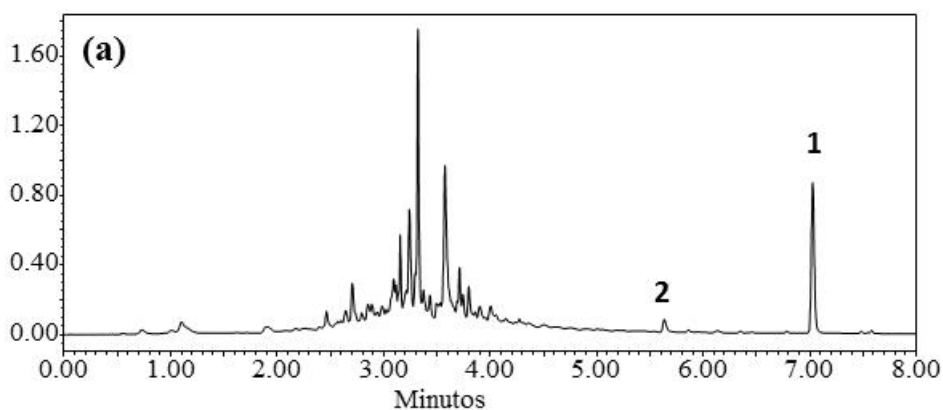


Figura 91. a) Cromatograma de UPLC del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176/pSETec y

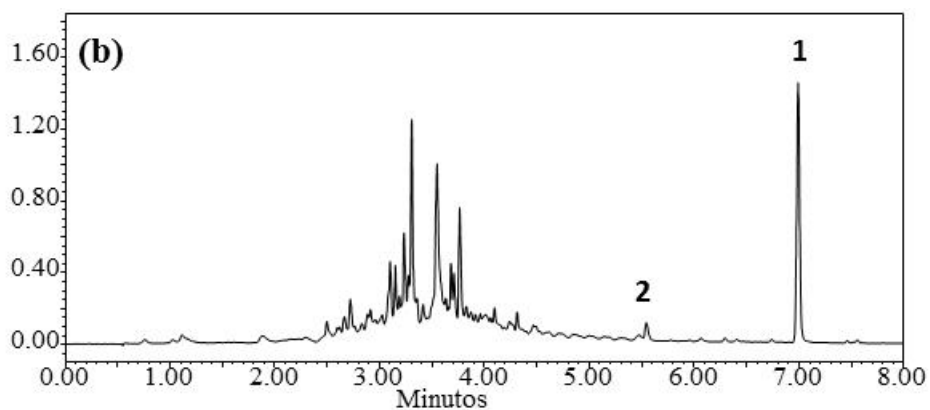


Figura 91 (continuación). **b)** UPLC del extracto de *Streptomyces* sp. Tü 6176/pCoe-oxi.

Estos tres experimentos, cuyos resultados no han sido los esperados, apuntan que no solamente los agrupamientos génicos 10 (biosíntesis de enterobactina) y 25 (biosíntesis de coelibactina) están interrelacionando con el *cluster* 3 (AJI9561) sino que probablemente haya agrupamientos génicos adicionales que están actuando conjuntamente para la generación de nataxazol y nataxazol hidroxilado.

DISCUSIÓN

Caracterización de la ruta de biosíntesis de nataxazol/AJI9561.

La identificación del agrupamiento génico implicado en la biosíntesis del benzoxazol nataxazol se llevó a cabo por la combinación de diferentes técnicas de minería genómica y la predicción de posibles proteínas implicadas en la biosíntesis de sus precursores tras el análisis de su estructura química.

En la última década, el uso de la minería genómica, gracias a la mejora y el abaratamiento de las técnicas de secuenciación de genomas, ha permitido la identificación de *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios que se encontraban silenciados en condiciones de laboratorio. Un ejemplo reciente de ello han sido los estudios realizados con el genoma de *S. albus* J1074. Este estreptomiceto, que ha sido ampliamente utilizado como hospedador para la expresión heteróloga de genes y agrupamientos génicos (Baltz, 2010), no se había descrito como productor de metabolitos secundarios en condiciones de laboratorio. Olano y colaboradores (2014) identificaron y aumentaron la expresión de diferentes agrupamientos génicos de biosíntesis de metabolitos secundarios a través de estudios de minería genómica y la aplicación de técnicas de manipulación genética. Del mismo modo Myronovskyi y colaboradores (2014) activaron un *cluster* de biosíntesis de carotenoides en *S. albus* J1074. Otro ejemplo lo encontramos en *Streptomyces* sp. M10 en el que se han identificado 20 potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios (Tang *et al.*, 2015) de los cuales el *cluster pks1* es productor de un polieno con gran actividad antifúngica y el cluster de mayor tamaño. Por otro lado, utilizando técnicas basadas en minería genómica Zhou y colaboradores (2015) han activado en *Streptomyces chattanoogensis* un *cluster* silenciado que determina la producción de las anguciclinas chatamicinas A y B. Sin embargo, cuando se habla de minería genómica hay dos especies de estreptomicetos por excelencia, *S. coelicolor* A3(2) y *S. avermitilis*. El genoma de *S. coelicolor* A3(2), estreptomiceto modelo y ampliamente estudiado, fue secuenciado y depositado en 2002, presentando 30 potenciales agrupamientos génicos

de biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos el de la actinorrodina (Nett *et al.*, 2009). En el caso de *S. avermitilis*, la secuenciación de su genoma permitió la identificación de 38 potenciales clusters de biosíntesis de metabolitos secundarios entre los que se incluyen los de avermectina y oligomicina (Ikeda *et al.*, 2014).

Tras la secuenciación del genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176, el análisis bioinformático de la secuencia y el estudio estructural de la molécula de nataxazol y de sus posibles precursores permitió identificar el agrupamiento génico 3 como el más probable para la biosíntesis de nataxazol. Este *cluster* presenta un tamaño de 34'33 kb y está constituido por 21 genes que codifican: 12 proteínas estructurales, 4 proteínas reguladoras, 4 proteínas posiblemente implicadas en el transporte del compuesto y una proteína hipotética de función desconocida. Los genes que codifican proteínas estructurales se localizan en el centro de esta región, estando flanqueados por los genes que codifican las proteínas reguladoras y las de transporte.

La confirmación de la implicación del *cluster* 3 como el encargado de la biosíntesis de nataxazol se obtuvo por la inactivación de *natPK*. NatPK se encarga de la producción del precursor de nataxazol ácido 6-metilsalicílico (6-MSA), tal y como se confirmó posteriormente mediante su expresión en *S. albus* J1074. La inactivación de *natPK* también permitió observar la desaparición de otro compuesto de la familia de los benzoxazoles producido por *Streptomyces* sp. Tü 6176, que se ha caracterizado como nataxazol hidroxilado y que es un derivado de nataxazol. La utilización de una sonda procedente de *natPK* permitió posteriormente la localización del cluster de biosíntesis de nataxazol en el cósmido cos6E8.

La inactivación del gen *natAN* confirmó su participación en la transformación de corismato, sintetizado a través de la ruta de sikimato, en el precursor de nataxazol ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA). En este proceso participaría inicialmente la aldolasa 3-deoxi-D-arabinosa-heptulosónico 7-fosfato sintasa (o adolasa) NatAL. Esta proteína es el primer enzima de la ruta del sikimato que da lugar a corismato. En el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 se localizan dos aldolasas: NatAL y CF54_24340. NatAL

proporcionaría corismato de forma específica para la ruta de biosíntesis de nataxazol y se encontraría regulada por la ruta de biosíntesis de nataxazol mientras que CF54_24340 correspondería a la aldolasa principal de la ruta de sikimato implicada en el metabolismo primario para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Krämers *et al*, 2003) y sería regulada por sustrato (Bongaerts *et al*, 2001).

Después actuaría NatAN transformando corismato en 2-amino-2-deoxiisocorismato (ADIC) (Fig. 39). Seguidamente, la isocorismatasa NatIS modificaría ADIC para transformarlo en *trans*-2,3-dihidro-3-hidroixantranilato, último intermediario antes de la formación de 3-HAA. Éste se formaría, finalmente, gracias a la acción de NatDB, 2,3-dihidrobenczoato-3-dehidrogenasa (Fig. 39).

A continuación, ambos precursores, 6-MSA y 3-HAA, serían activados para su posterior condensación. Este proceso implicaría la actuación de la sintetasa y ligasa dependiente de AMP NatL1 (Fig. 39). La delección conjunta de *natL1*, *natAM* y *natAC1* y la posterior complementación parcial de la cepa con los genes *natAM* y *natAC1*, quedando así sólo inactivado el gen *natL1*, mostró incapacidad del mutante para producir nataxazol y nataxazol hidroxilado, no observándose la acumulación de ningún intermediario de la ruta. De modo que NatL1 probablemente esté implicada en la adenilación de uno de los precursores. NatL1 estaría adenilando 6-MSA, por su similitud con EsmD6 de la ruta de biosíntesis de esmeraldina y safenamicina (Rui *et al*, 2012), formándose el complejo AMP-6-MSA. Por otro lado, 3-HAA sería adenilado a través de la segunda sintetasa y ligasa dependiente de AMP, NatL2, formando así el complejo AMP-3HAA. Seguidamente, NatS se encargaría de transferir 6-MSA del unir al complejo AMP-6MSA a NatAC1 (ACP) dando lugar a la forma activada del precursor, NatAC1-6MSA. Al mismo tiempo, NatS uniría NatAC2 (ACP) a 3HAA procedente de AMP-3HAA dando lugar a AC2-3HAA (Fig. 39).

Posteriormente se produciría la condensación de los precursores activados NatAC2-3HAA y NatAC1-6MSA. Esta condensación puede realizarse de forma espontánea como se propone en la biosíntesis de calcimicina (Wu *et al*, 2011). Sin

embargo, la inactivación del gen *natAM* junto con *natLI* y *natACI* y la posterior complementación parcial con los genes *natLI* y *natACI*, mostró que *natAM* se encuentra implicado en la unión de los precursores teniendo una función similar a la descrita por Hao y colaboradores (2014) donde las amidohidrolasas presentan una función deacetilasa rompiendo enlaces S-PCP, aunque en este caso, sería un enlace S-ACP. Así, se formaría el primer intermediario de la ruta (Fig.39), un compuesto de similar estructura a la caboxamicina pero con un grupo metilo en su motivo salicilato. A este hipotético compuesto se le ha denominado 6-metilcaboxamicina y estaría unido a NatC2. Además, la implicación de NatAM en la condensación de los precursores se confirmó en la expresión heteróloga de la ruta con *natAM* delecionada donde se observa que no hay acumulación de ningún intermediario pero sí del 6-MSA. A continuación se condensaría una segunda molécula de NatAC2-3HAA seguida por la eliminación de NatAC2 por parte de NatAM (Fig. 39). Esto daría lugar al compuesto final AJI9561, benzoxazol descrito con anterioridad y producido por *Streptomyces* sp. AJ9561 (Sato *et al.*, 2001).

La expresión heteróloga del *cluster* 3 a través del plásmido pNATAR muestra que el compuesto final de la ruta de biosíntesis de este *cluster* es el AJI9561. Los ensayos de actividad antibiótica frente a diferentes estreptomicetos, tanto de AJI9561 como de nataxazol, mostraron que AJI9561 presenta una clara actividad antibiótica mientras que el nataxazol es inactivo. Este hecho apunta a que el nataxazol pudiera tratarse de la forma inactiva de AJI9561 tras su metilación, siendo por lo tanto dicha metilación un posible mecanismo de resistencia. Diversos antibióticos son modificados por diferentes medios, por ejemplo acetilaciones o fosforilaciones, para su inactivación (Wright, 2005). Este hecho podría ser el determinante de que al introducir BAC-6E8, BAC-natT1/AC2 y pNATAR en diferentes estreptomicetos éstas no son capaces de crecer y solo se obtienen clones con el agrupamiento génico delecionado. Únicamente se ha obtenido la producción de AJI9561 en *S. lividans* JT46, observándose que la presencia de pNATAR y como consecuencia la producción de AJI9561 afecta claramente al

crecimiento de *S. lividans*. Por otro lado es importante tener en cuenta que *S. lividans* JT46 es una cepa con menor tasa de recombinación que la parental (Tsai y Chen, 1987).

Por otro lado, la producción heteróloga de AJI9561 usando pNATAR, que incluye el gen *natX* (de función desconocida), junto con la expresión heteróloga de *natX* y los intentos fallidos de bioconversión de AJI9561 en nataxazol, mostraron que NatX no tiene actividad metiltransferasa y por lo tanto la actividad requerida para transformar AJI9561 en nataxazol es realizada por una metiltransferasa codificada por un gen presente en el genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 y localizado fuera del cluster 3 de biosíntesis de nataxazol.

Mejora de la producción de nataxazol

Para la mejora de metabolitos secundarios en actinomicetos se han descrito diversas estrategias: la distribución del flujo de precursores, la desregulación de la ruta de biosíntesis o la sobreexpresión de genes estructurales (Olano *et al.*, 2008). En el presente trabajo, se ha buscado la mejora de la producción del nataxazol utilizando como estrategia la desregulación de la ruta. La sobreexpresión de los cuatro reguladores de la ruta mostró resultados diversos. Mientras que NatR2 y NatR3 disminuían la producción de nataxazol, NatR1 y NatR4 aumentaron levemente la producción de nataxazol en 1'78 y 1'37 veces, respectivamente.

Por otro lado, la inactivación de *natR4* condujo a una disminución de la producción de nataxazol confirmando así su papel como activador de la ruta. La inactivación de *natR3* dio lugar a un aumento de 2'31 veces la producción de nataxazol siendo por el momento la mejor estrategia para mejorar la producción de nataxazol. Además, estos resultados muestran indicios de una regulación compleja de la ruta de biosíntesis, ya que ninguno de los reguladores con los que se ha trabajado produjo una inhibición total de la producción.

Mediante a la sobreexpresión de los dos reguladores positivos y a la inactivación del regulador negativo *natR3*, se pudo confirmar la producción de AJI9561 en

Streptomyces sp. Tü 6176. Esto nos permitió confirmar que AJI9561 es intermediario de nataxazol, ya que se observaba su disminución al tiempo que aumenta la acumulación de nataxazol. Se observó un pico claro de producción a las 24 horas, en mayor cantidad que nataxazol, inclinándose posteriormente el balance hacia una mayor producción de nataxazol y una desaparición casi total del AJI9561.

Interacción entre diferentes rutas de biosíntesis en *Streptomyces* sp. Tü 6176

Es poco habitual localizar genes implicados en la biosíntesis de un metabolito secundario fuera del agrupamiento génico, aunque hay ejemplos descritos como el de la biosíntesis de eritrochelina por parte de *S. erythraea* NRRL2338 que es un sideróforo codificado por el *cluster nrps5*. Para la biosíntesis de eritrochelina es necesario la acción N-acetiltransferasa del dominio GNAT de Mcd localizada en el *cluster nrps1* (Lazos *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, la inactivación de *natPK* puso de manifiesto la producción del benzoxazol UK-1. Al mismo tiempo, la inactivación de *natAN* permitió observar que ambos benzoxazoles, nataxazol y UK-1, compartían como precursor común el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) el cual es suministrado por la ruta de biosíntesis de nataxazol quedando patente que las diferencias estructurales entre UK-1 y nataxazol se deben a la utilización de un segundo precursor diferente en cada caso. Mientras que para el nataxazol es el ácido 6-metilsalicílico para el UK-1 es el ácido salicílico.

Un nuevo análisis de los *clusters* localizados en *Streptomyces* sp. Tü 6176 y los genes que contienen permitió localizar un gen, *cf54_20720*, que codifica una salicilato sintasa en el *cluster* 25. Este agrupamiento génico determinaría la producción de un compuesto estructuralmente análogo al zincóforo coelibactina de *Streptomyces coelicolor* A3(2), cuya estructura no ha sido descrita. La inactivación de *cf54_20720* en la cepa no productora de nataxazol *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natAN, generando de

este modo un doble mutante, confirmó que dicha proteína está implicada en la biosíntesis de de UK-1, verificándose además que el producto de esta salicilato sintasa es efectivamente ácido salicílico mediante la expresión heteróloga de *CF54_20720* en *S. albus* J1074.

Para la mejora de la producción de UK-1, se llevaron a cabo dos estrategias. La primera de ellas fue el aporte del precursor, ácido salicílico, y del potencial intermediario de la ruta del UK-1, caboxamicina, a *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK. La adición de la caboxamicina no mostró un aumento significativo de dicho compuesto mientras que la adición de ácido salicílico dio lugar a un ligero aumento del UK-1 y permitió observar un nuevo benzoxazol cuya masa sugiere que sea una versión no metilada, carente del grupo metoxilo, de UK-1. La segunda estrategia se basó en los estudios realizados por Hesketh y colaboradores (2009) quienes observaron que el *cluster* de coelibactina en *S. coelicolor* A3(2) presenta una mayor transcripción en condiciones limitantes de zinc. De este modo, se asumió que dándose las mismas premisas en *Streptomyces* sp. Tü 6176, limitación de zinc, la producción de UK-1 aumentaría ya que habría una mayor expresión del *cluster* 25 y, por tanto, de *cf54_20720*. La hipótesis se confirmó cuando se creció la cepa no productora de nataxazol *Streptomyces* sp. Tü 6176 Δ natPK en MD-Zn²⁺ y se observó que aumentaba la producción de UK-1 hasta 88 veces con respecto a lo observado en MD. Sin embargo, es posible que *cf54_20720* no sea el único gen del *cluster* 25 implicado en la biosíntesis de UK-1 puesto que debería estar implicado también *cf54_20660* que codifica una sintetasa y ligasa dependiente de AMP. *CF54_20660* realizaría la misma función que NatL1 formando el complejo AMP-SA el cual por acción de NatS se activaría dando lugar al complejo NatAC1-SA, siguiendo posteriormente las mismas etapas que para la formación de nataxazol (Fig. 92). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en condiciones normales la bioconversión de ácido salicílico por Δ natPK no es completa y por lo tanto no conduce a un gran incremento en la producción de UK-1, mientras que cuando Δ natPK se crece en ausencia de zinc sí aumenta la producción

de UK-1 considerablemente. Si en la biosíntesis de UK-1 únicamente participara la salicilato sintasa CF54_20720 el aporte extra de ácido salicílico exógeno debería conducir al mismo resultado que la inducción de la expresión de *cf54_20720* en condiciones limitantes de zinc.

Al mismo tiempo que se realizó la mejora de producción de nataxazol, a través de la desregulación de la ruta de biosíntesis, se observó el efecto que tenían los reguladores específicos de la ruta sobre la producción de UK-1. En ningún caso, ni en las sobreexpresiones ni en la inactivación de *natR3* y *natR4*, se observó un efecto sobre la producción de UK-1. La explicación más razonable para este resultado es que tanto *cf54_20660* y *cf54_20720* no se están expresando al no encontrarse en condiciones limitantes de zinc.

Por otro lado, la inactivación de *natAN* no solo permitió relacionar el UK-1 y el nataxazol sino que se observó el aumento de la producción de enterobactina y, especialmente, de su precursor, el ácido 2,3-dihidroxibenzoico. La enterobactina es un sideróforo descrito principalmente en enterobacterias, sin embargo también ha sido descrito en diversas cepas de estreptomicetos (Fielder *et al*, 2001). Este sideróforo se caracteriza por estar constituido por tres unidades diméricas. Cada dímero se encuentra formado por una molécula de ácido 2,3-dihidrobenczoico, sintetizado a partir de corismato mediante la acción de una isocorismato sintasa, una isocorismatasa y una 2,3-dihidrobenczoato-3-dehidrogenasa, y por el amino ácido serina el cual es incorporado por la acción de una NRPS. La delección de *natAN* conduciría a una mayor disponibilidad de corismato en la célula y su derivación hacia la producción de ácido 2,3-dihidrobenczoico permitiendo a su vez una mayor producción de enterobactina ya que en condiciones normales el corismato utilizado por la isocorismato sintasa del *cluster* 10 provendría del metabolismo primario.

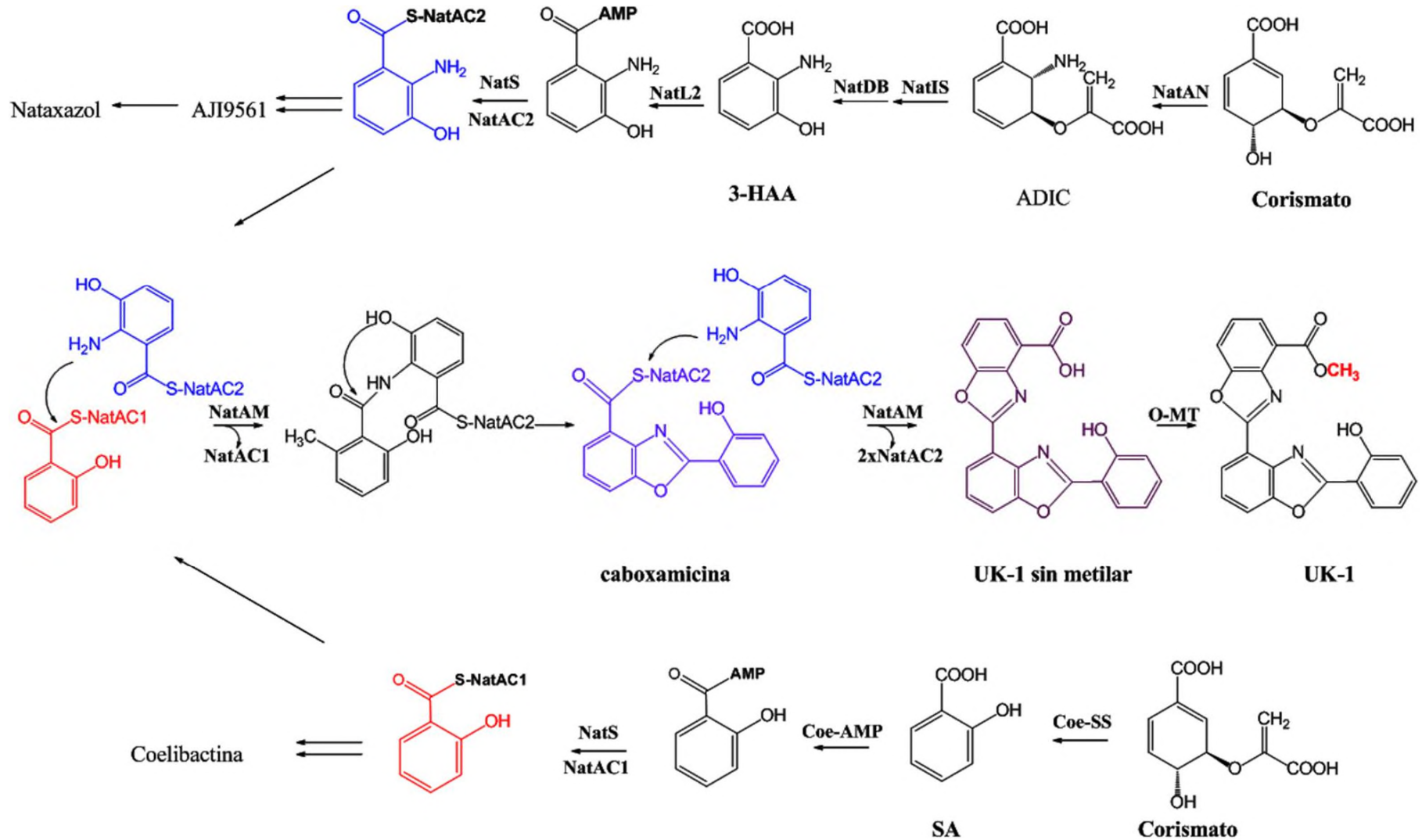


Figura 92. Ruta de biosíntesis del UK-1 en *Streptomyces* sp. Tü 6176. ADIC: 2-amino-2 deoxiisocorismato. 3-HAA: ácido 3-hidroxiantranílico. SA: ácido salicílico. Coe-SS: salicilato sintasa del cluster 25. Coe-AMP: sintetasa y ligasa dependiente de AMP del cluster 25

La relación de la isocorismato sintasa del *cluster* 10, codificada por el gen *cf54_12675*, con la producción de enterobactina se confirmó mediante su inactivación. Esta inactivación conduce a una gran disminución de la acumulación de enterobactina y a una completa desaparición de sus precursores. La producción de pequeños niveles de enterobactina en el mutante se debería a isocorismato sintasas adicionales de *Streptomyces* sp. Tü 6176 que estuviesen generando ácido 2,3-dihidrobenczoico para otras rutas metabólicas y que podría ser captado por la ruta de biosíntesis de enterobactina. Uno de los candidatos identificados que podría participar en este efecto cooperativo es la isocorismato sintasa CF54_07485 (*cluster* 5).

Finalmente, con todos estos datos se ha podido comprobar que en *Streptomyces* sp. Tü 6176 existen dos tipos de relaciones entre *clusters*. La primera de ellas es la relación entre dos *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios que tras biosintetizar uno de los precursores del correspondiente compuesto final utilizan la maquinaria genética de ambos *clusters* para dar lugar a un nuevo compuesto (*cluster* 3 y 25). La segunda estrategia se basa en la utilización de un precursor biosintético común (corismato) que queda disponible al ser inactiva la producción de un metabolito secundario y puede ser usado por otra ruta de biosíntesis de otro metabolito secundario (enterobactina) (Fig. 93). Además, se intuye una interrelación entre *clusters* más compleja que las expuestas pues una metiltransferasa no localizada y una hidroxilasa que tampoco se ha localizado se encargan de metilar AJI9561 para dar nataxazol y éste para dar nataxazol hidroxilado, respectivamente.

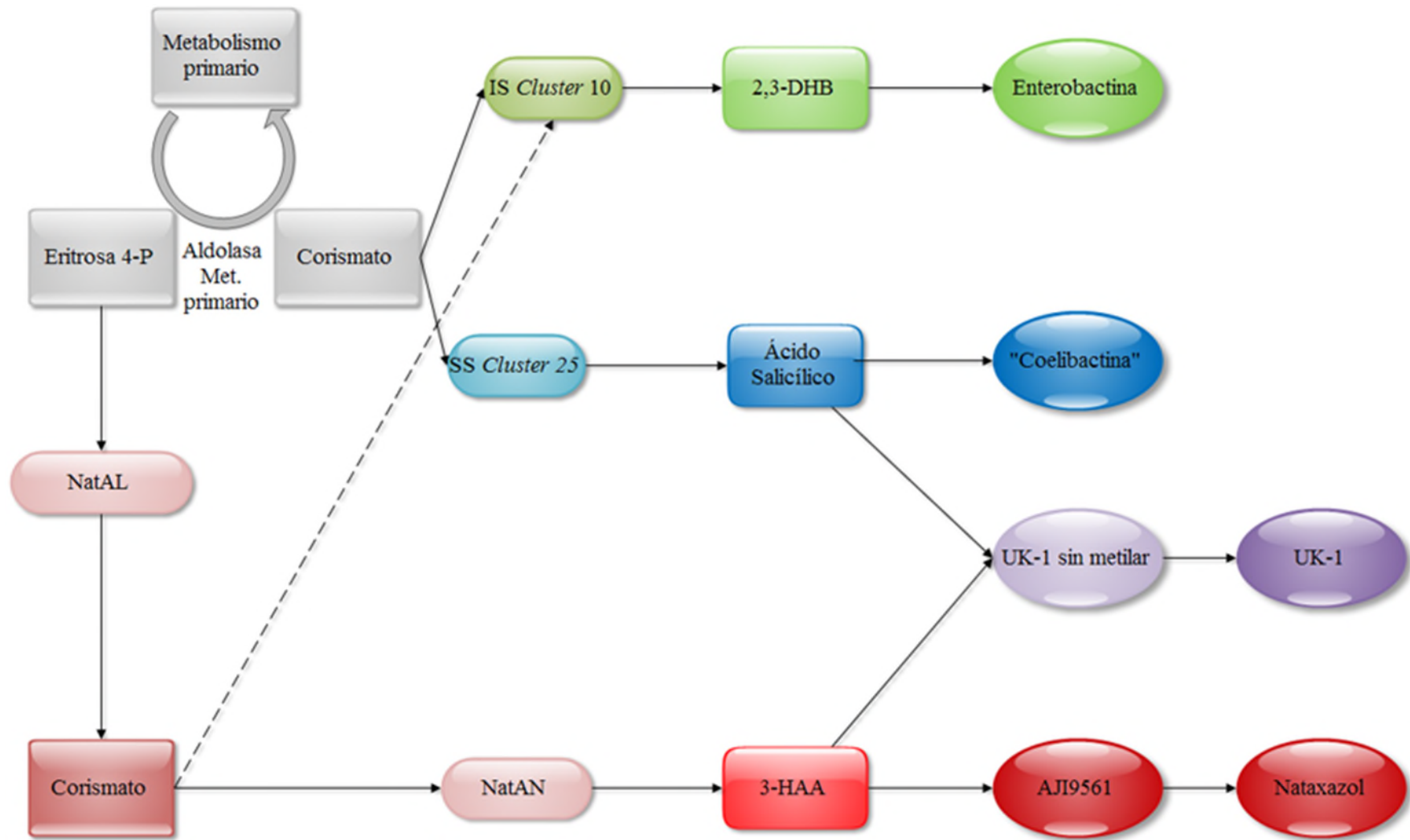


Figura 93. Relación entre clusters de *Streptomyces* sp. Tü 6176 **IS:** Isocorismato sintasa. **SS:** salicilato sintasa. **Met:** Metabolismo. **Eritrosa 4-P:** Eritrosa 4-fostato. **2,3-DHB:** ácido 2,3-dihidroxibenzoico. **3-HAA:** ácido 3-hidroxiantranílico.

CONCLUSIONES

1. El genoma de *Streptomyces* sp. Tü 6176 presenta un tamaño de 8'8 Mb y contiene potencialmente 38 agrupamientos génicos de biosíntesis de metabolitos secundarios.
2. El *cluster* 3 está formado por 21 genes que codifican 4 proteínas reguladoras, 4 de transporte, 1 de función desconocida y 12 proteínas estructurales. Entre ellas, NatAN está implicada en la biosíntesis del precursor de nataxazol ácido 3-hidroxiantranílico y NatPK en la biosíntesis de ácido 6-metilsalicílico, segundo precursor de nataxazol.
3. El *cluster* 3 determina la biosíntesis del benzoxazol AJI9561 intermediario biosintético de nataxazol.
4. El nataxazol es producto de la metilación de AJI9561, mecanismo que podría conferir resistencia a AJI9561 en *Streptomyces* sp. Tü 6176.
5. La sobreexpresión de los genes reguladores positivos *natR1* y *natR4* determinan una mejora de la producción de nataxazol, aunque los aumentos más considerables se obtienen inactivando el gen regulador negativo *natR3*.
6. *Streptomyces* sp. Tü 6176 produce el benzoxazol UK-1. Para ello, combina el ácido 3-hidroxiantranílico procedente de la ruta de biosíntesis de nataxazol con el ácido salicílico originado por la ruta de biosíntesis de coelibactina.
7. La mayor producción del UK-1 se obtiene cultivando un mutante de *Streptomyces* sp. Tü 6176, alterado en la producción de ácido 6-metilsalicílico, en condiciones de baja disponibilidad de zinc.

8. El *cluster* 10 está implicado en la biosíntesis del sideróforo enterobactina, cuya producción normalmente inducible en condiciones de limitación de hierro, se vuelve constitutiva en mutantes de *Streptomyces* sp. Tü 6176 con la producción de 3-hidroxiantranílico alterada y por lo tanto no productores de nataxazol.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA DE PÁGINAS WEB CONSULTADAS

AECC. <https://www.aecc.es/sobreelcancer/elcancer/paginas/comosediagnostica.aspx>

American Cancer Society:

<http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/examsandtestdescriptions/tumormarkers/tumor-markers-t-m-blood-urine>

http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_celular02.jpg

http://www.monografias.com/trabajos65/cancer/cancer_image004.jpg

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi

OMS. <http://www.who.int>

TMHMM Server v2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

PKS/NRPS Analysis: <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, B.J., Fukuda, D.S., Dorman, D.E., Occolowitz, J.L., Debono, M., Farhner, L. (1979). Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 808-812.

Abdelgawad, M.A., Belal, A., Omar H.A., Hegazy L., Rateb M.E. (2013). Synthesis, anti-breast cancer activity, and molecular modeling of some benzothiazole and benzoxazole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* 346: 534-541.

Akbay, A., Oren, I., Temiz-Arpaci, O., Aki-Şener, E., Yalçın, I. (2003). Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibitor activity of some 2,5,6-substituted benzoxazole, benzimidazole, benzothiazole and oxazolo(4,5-b)pyridine derivatives. *Arzneimittelforschung* 54: 266-271.

Akechi, T., Kugaya, A., Okamura, H., Yamawaki, S., Uchitomi, Y. (1999). Fatigue and its associated factors in ambulatory cancer patients: a preliminary study. *J Pain Symptom Manage* 17: 42-48.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Angiuoli, S.V., Gussman, A., Klimke, W., Cochrane, G., Field, D., Garrity, G., Kodira, C.D., Kyrpides, N., Madupu, R., Markowitz, V., Tatusova, T., Thomson, N., White, O. (2008). Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS* 12: 137-141.

- Arisoy, M., Temiz-Arpaci, O., Kaynak-Onurdag, F., Ozgen, S. (2013).** Novel benzoxazoles: synthesis and antibacterial, antifungal, and antitubercular activity against antibiotic-resistant and -sensitive microbes. *Z Naturforsch C* 68: 453-460.
- Atlas, R.M. (2010).** Handbook of microbiological media; 4^a Edicion; CRC Press.
- Awada, A., Mano, M., Hendlisz, A., Piccart, M. (2004).** New anticancer agents and therapeutic strategies in development for solid cancers: a clinical perspective. *Expert Rev Anticancer Ther* 4: 53-60.
- Balis, F.M. (2002).** Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening. *J Natl Cancer Inst* 94: 78-79.
- Baltz, R.H. (2010)** *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37: 759-772.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
- Bérdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot* 58: 1-26.
- Bérdy, J. (2012).** Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot* 65: 385-395.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N., Schoner, B.E. (1992).** Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
- Bimboin, H.C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1613-1623.
- Blin, K., Medema, M.H., Kazempour, D., Fischbach, M.A., Breitling, R., Takano, E., Weber, T. (2013).** antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res* 41: W204-212.
- Bongaerts, J., Krämer, M., Müller, U., Raeven, L., Wubbolts, M. (2001)** Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng.* 3:289-300.
- Chater, K.F., Wilde, L.C. (1980).** *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *J Gen Microbiol* 116: 323-334.

- Chater**, K.F., Chandra, G. (2008). The use of the rare UUA codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J Microbiol* 46: 1-11.
- Chen**, X.J. Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene*. 172:131-6.
- Corre**, C., Challis, G.L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* 26: 977-986.
- Cragg**, G.M., Boyd, M.R., Khanna, R., Kneller, R., Mays, T.D., Mazan, K.D., Newman, D.J., Sausville, E.A. (1999). International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure Appl Chem* 71: 1619-1633.
- Craney**, A., Ahmed, S., Nodwell, J. (2013). Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot* 66: 387-400.
- Crosa**, J.H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* 53:517-530.
- Daum**, M., Peintner, I., Linnenbrink, A., Frerich, A., Weber, M., Paululat, T., Bechthold, A. (2009). Organisation of the biosynthetic gene cluster and tailoring enzymes in the biosynthesis of the tetracyclicquinone glycoside antibiotic polyketomycin. *ChemBioChem* 10: 1073-1083.
- David**, L., Emadzadeh, S. (1982). Biosynthesis of the ionophorous antibiotic A23187. *J Antibiot* 35: 1616-1617.
- David**, L., Kergomard, A. (1982). Production by controlled biosynthesis of a novel ionophore antibiotic, cezomycin (demethylamino A23187). *J Antibiot* 35: 1409-1411.
- de Crécy-Lagard**, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J., Thibaut, D., (1997). Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol* 179: 705-713.
- DeLuca**, M.R., Kerwin, S.M. (1997). The total synthesis of UK-1. *Tetrahedron Letters* 38: 199-202.
- DeVita**, V.T.Jr. (1978). The evolution of therapeutic research in cancer. *N Engl J Med* 298: 907-910.
- Domenech**, P., Reed, M.B., Barry, C.E. 3rd. (2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun* 73: 3492–3501.
- Duarte**, M., Ferreira-da-Silva, F., Lünsdorf, H., Junca, H., Gales, L., Pieper, D.H., Nunes, O.C. (2011). *Gulosibacter molinativorax* ON4^T molinate hydrolase, a novel cobalt-dependent amidohydrolase. *J Bacteriol* 193: 5810-5816.

- Eberz G., Möhrle V., Fröde R., Velten R., Salas J.A. (2007).** A vector for heterologous expression of a gene cluster for spinosyn biosynthesis; can provide data which can be employed within the framework of a genome sequencing project and metabolic engineering, based thereupon, for increasing spinosyn production. Patente US7285653 B1 (<http://www.google.com/patents/US7285653#backward-citations>).
- Ehmann, D.E., Gehring, A.M., Walsh, C.T. (1999).** Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of α -amino adipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* 38: 6171-6177.
- Fernández, E., Weissbach, U., Sánchez Reillo, C., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., Salas, J.A. (1998).** Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol* 180: 4929-4937.
- Fiedler, H.P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K., Zeeck, A. (2001).** Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol Lett* 196: 147-151.
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., Serre, M.C. (2007).** Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 89: 427-446.
- Gautam, M.K., Sonal, N.K.S., Priyanka, K.K.J. (2012).** Pharmacological profile and pharmaceutical importance of substituted benzoxazoles: A comprehensive review. *Chem Tech Res* 4: 640-650.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (2002).** *Genética 7ª Edición*. McGraw-Hill.
- Guengerich F.P. (2001).** Uncommon P450-catalyzed reactions. *Curr Drug Metab* 2: 93-115.
- Guo, X., Geng, P., Bai, F., Bai, G., Sun, T., Li, X., Shi, L., Zhong, Q. (2012)** Draft genome sequence of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 reveals the putative biosynthetic gene cluster of acarviostatin family α -amylase inhibitors. *Lett Appl Microbiol*. 55:162-169.
- Hao, C., Huang, S., Deng, Z., Zhao, C., Yu, Y. (2014).** Mining of the pyrrolamide antibiotics analogs in *Streptomyces netropsis* reveals the amidohydrolase-dependent "iterative strategy" underlying the pyrrole polymerization. *PLoS One* 9: e99077.
- Hayashi, Y., Onaka, H., Itoh, N., Seto, H., Dairi, T. (2007).** Cloning of the gene cluster responsible for biosynthesis of KS-505a (longestin), a unique tetraterpenoid. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 3072-3081.
- Hesketh, A., Kock, H., Mootien, S., Bibb, M. (2009).** The role of *absC*, a novel regulatory gene for secondary metabolism, in zinc-dependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 74: 1427-1444.

- Hohmann**, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A.T., Jones, A.L., Brown, R., Stach, J.E., Goodfellow, M., Beil, W., Krämer, M., Imhoff, J.F., Süßmuth, R.D., Fiedler, H.P. (2009). Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J Antibiot* 62: 99-104.
- Hopwood**, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual, (Norwich).
- Horna**, D.H., Gómez, C., Olano, C., Palomino-Schätzlein, M., Pineda-Lucena, A., Carbajo, R.J., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A. (2011). Biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin in *Streptomyces lydicus*: tailoring modification of 3-methyl-aspartate. *J Bacteriol* 193: 2647-2651.
- Huang**, S., Tong, M.H., Qin, Z., Deng, Z., Deng, H., Yu, Y. (2015). Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of thiolutin, a tumor angiogenesis inhibitor, in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Anticancer Agents Med Chem*. En prensa.
- Ikeda**, M. (2006). Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 615-626.
- Ikeda**, H., Kazuo, S.Y., Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 233-250
- Jenke-Kodoma**, H., Böner, T., Dittmann, E. (2006). Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Comput Biol* 2:e132.
- Jia**, X.Y., Tian, Z.H., Shao, L., Qu, X.D., Zhao, Q.F., Tang, J., Tang, G.L., Liu, W. (2006). Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetronate antibiotic biosynthesis. *Chem Biol* 13: 575-585.
- Kieser**, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics, (Norwich).
- Kim**, C.G., Yu, T.W., Fryhle, C.B., Handa, S., Floss, H.G. (1998). 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in ripamycin and related antibiotics. *J Biol Chem* 273: 6030-6040.
- Knaggs**, A.R. (1999). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 16: 525-560.
- Krämer**, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Müller, U., Orf, S., Wubbolts, M., Raeven, L. (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng*. 5:277-283.

- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-580.
- Kumar, D., Jacob, M.R., Reynolds, M.B., Kerwin, S.M.** (2002). Synthesis and evaluation of anticancer benzoxazoles and benzimidazoles related to UK-1. *Bioorg Med Chem* 10: 3997-4004.
- Kouprina, N., Larionov, V.** (2008). Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc.* 3: 371-377.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C.T.** (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* 3: 923-936.
- Lazos, O., Tosin, M., Slusarczyk, A.L., Boakes, S., Cortés, J., Sidebottom, P.J., Leadlay, P.F.** (2010). Biosynthesis of the putative siderophore erythrochelin requires unprecedented crosstalk between separate nonribosomal peptide gene clusters. *Chem. Biol.* 17:160-173.
- Lee, S., Jung, S.R., Heo, K., Byl, J.A., Dewese, J.E., Osheroff, N., Hohng, S.** (2012). DNA cleavage and opening reactions of human topoisomerase II α are regulated via Mg²⁺-mediated dynamic bending of gate-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 2925-2930.
- Lewin, B.** (2004). *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall.
- Li, W., Chou, S., Khullar, A., Gerratana, B.** (2009). Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microbiol* 75: 2958-2963.
- Lim, Y.R., Hong, M.K., Kim, J.K., Doan, T.T., Kim, D.H., Yun, C.H., Chun, Y.J., Kang, L.W., Kim, D.** (2012) Crystal structure of cytochrome P450 CYP105N1 from *Streptomyces coelicolor*, an oxidase in the coelibactinsiderophore biosynthetic pathway. *Arch Biochem Biophys.* 528:111-117.
- Liu, J., Duncan, K., Walsh, C.T.** (1989). Nucleotide sequence of a cluster of *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis genes: identification of *entA* and purification of its product 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase. *J Bacteriol* 171: 791-798.
- Loman, N.J., Constantinidou, C., Chan, J.Z. Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C.W., Robinson, E.R., Pallen, M.J.** (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* 10: 599-606.
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., MacNeil, T.** (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111: 61-68.

- Marahiel**, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* 97: 2651-2674.
- Margulies**, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bembien, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Mast**, Y., Weber, T., Gölz, M., Ort-Winklbauer, R., Gondran, A., Wohlleben, W., Schinko, E. (2011). Characterization of the 'pristinamycin supercluster' of *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microb Biotechnol* 4: 192-206.
- McKee**, M.L., Kerwin, S.M. (2008). Synthesis, metal ion binding, and biological evaluation of new anticancer 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazoleanalogs of UK-1. *Bioorg Med Chem* 16: 1775-1783.
- Méndez**, C., Salas, J.A. (2001). The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res Microbiol* 152: 341-250.
- Menéndez**, N., Nur-e-Alam, M., Fischer, C., Braña, A.F., Salas, J.A., Rohr, J., Méndez, C. (2006). Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. *Appl Environ Microbiol* 72: 167-177.
- Michel**, K.H., Boeck L.D., Hoehn M.M., Jones N.D., Chaney M.O. (1984). The discovery, fermentation, isolation, and structure of antibiotic A33853 and its tetraacetyl derivative. *J Antibiot* 37: 441-445.
- Moriguchi**, T., Kezuka, Y., Nonaka, T., Ebizuka, Y., Fujii, I. (2010). Hidden function of catalytic domain in 6-methylsalicylic acid synthase for product release. *J Biol Chem* 285: 15637-15643.
- Murray**, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M. (2010). Harper: Bioquímica ilustrada. 28° Edición McGraw-Hill.
- Myronovskyi**, M., Tokovenko, B., Brötz, E., Rückert, C., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A. (2014). Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 795-806.
- Nett**, M., Ikeda, H., Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26: 1362-1384.

- Ochi, K., Hosaka, T. (2013).** New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 87-98.
- Ogasawara, Y., Katayama, K., Minami, A., Otsuka, M., Eguchi, T., Kakinuma, K. (2004).** Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicenistatin in *Streptomyces halstedii*. *Chem Biol* 11: 79-86.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J.A. (2008).** Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng* 10: 281-292.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. (2009a).** Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar Drugs* 7: 210-248.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. (2009b).** Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 26: 628-660.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J. A. (2010).** Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 27: 571-616.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. (2011).** Gene clusters for bioactive natural products in actinomycetes and their use in combinatorial biosynthesis. In *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Craister Academic Press, UK, pp. 195-232.
- Olano, C., Cano-Prieto, C., Losada, A. A., Bull, A.T., Goodfellow, M., Fiedler, H.P., Méndez, C., Salas, J.A. (2014a).** Draft genome sequence of marine actinomycete *Streptomyces* sp. strain NTK 937, producer of the benzoxazole antibiotic caboxamycin. *Genome Announc* 2: e00534-14.
- Olano, C., García, I., González, A., Rodríguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A. (2014b).** Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol* 7: 242-256.
- Ostash, B., Saghatelian, A., Walker, S. (2007).** A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A. *Chem Biol* 14: 257-267.
- Papac, R. (2001).** Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 74: 391-398.
- Puel, O., Tadríst, S., Galtier, P., Oswald, I.P., Delaforge, M. (2005).** *Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. *Appl Environ Microbiol*. 71: 550-553.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Nihira, T. (2007).** Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene* 393: 31-42.

- Ramos**, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 326-356.
- Rang**, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). *Rang y Dale Farmacología*. 6ª Edición. Elversier.
- Raymond**, K.N., Dertz, E.A., Kim, S.S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3584-3588.
- Reimann**, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T., Haas, D. (2001). Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183: 813-820.
- Rui**, Z., Ye, M., Wang, S., Fujikawa, K., Akerele, B., Aung, M., Floss, H.G., Zhang, W., Yu, T.W. (2012). Insights into divergent phenazine biosynthetic pathway governed by a plasmid-born esmeraldin gene cluster. *Chem Biol* 19: 1116-1125.
- Sambrook**, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook**, J., Russell, D.W., Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, (New York).
- Sato**, S., Kajiura, T., Noguchi, M., Takehana, K., Kobayashi, T., Tsuji, T. (2001). AJI9561, a new cytotoxic benzoxazole derivative produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 54: 102-104.
- Schneemann**, I., Wiese, J., Kunz, A.L., Imhoff, J.F. (2011). Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria. *Mar Drugs* 9: 772-789.
- Schwarzer**, D., Marahiel, M.A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* 88: 93-101.
- Seibert**, C.M., Raushel, F.M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 44: 6383-6391.
- Shao**, L., Qu, X.D., Jia, X.Y., Zhao, Q.F., Tian, Z.H., Wang, M., Tang, G.L., Liu, W. (2006). Cloning and characterization of a bacterial iterative type I polyketide synthase gene encoding the 6-methylsalicylic acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 133-139.
- Shen**, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7: 285-295.
- Shibata**, K., Kashiwada, M., Ueki, M., Taniguchi, M. (1993). UK-1, a novel cytotoxic metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. II. Structural elucidation. *J Antibiot* 46: 1095-1100.
- Silakowski**, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G., Müller, R. (2000). The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur. J. Biochem.* 267:6476-6485.

- Singh, S., Chang, A., Goff, R.D., Bingman, C.A., Grüschow, S., Sherman, D.H., Phillips, G.N. Jr., Thorson, J.S. (2011).** Structural characterization of the mitomycin 7-O-methyltransferase. *Proteins* 79: 2181-2188.
- Soca, R. (2012).** La fascinante historia de las palabras. Ed. Interzona.
- Sommer, P.S., Almeida, R.C., Schneider, K., Beil, W., Süßmuth, R.D., Fiedler, H.P. (2008).** Nataxazole, a new benzoxazole derivative with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. Tü 6176. *J Antibiot* 61: 683-686.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Sporn, M.B. (1996).** The war on cáncer. *The Lancet* 347: 1377-1381.
- Sun, Y., He, X., Liang, J., Zhou, X., Deng, Z. (2009).** Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. *Appl Microbiol Biotechnol* 82: 303-310.
- Suzuki, K., Ogishima, M., Sugiyama, M., Inouye, Y., Nakamura, S., Imamura, S. (1992).** Molecular cloning and expression of a *Streptomyces* sarcosine oxidase gene in *Streptomyces lividans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 432-436.
- Tang, J., Liu, X., Peng, J., Tang, Y., Zhang, Y. (2015).** Genome sequence and genome mining of a marine-derived antifungal bacterium *Streptomyces* sp. M10. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 2763-2772.
- Thomas, B., George, J., Sugunan, S. (2009).** Synthesis of benzoxazole via the beckmann rearrangement of salicylaldehyde on protonated zeolites: a green continuous process. *Ind Eng Chem Res* 48: 660-670.
- Tipparaju, S.K., Joyasawal, S., Pieroni, M., Kaiser, M., Brun, R., Kozikowski, A.P. (2008).** In pursuit of natural product leads: synthesis and biological evaluation of 2-[3-hydroxy-2-[(3-hydroxypyridine-2-carbonyl)amino]phenyl] benzoxazole-4-carboxylic acid (A-33853) and its analogues: discovery of N-(2-benzoxazol-2-ylphenyl)benzamides as novel antileishmanial chemotypes. *J Med Chem* 51: 7344-7347.
- Tsai, J.F., Chen, C.W. (1987).** Isolation and characterization of *Streptomyces lividans* mutants deficient in intraplasmid recombination. *Mol Gen Genet* 208: 211-218.
- Udwary, D.W., Gontang, E.A., Jones, A.C., Jones, C.S., Schultz, A.W., Winter, J.M., Yang, J.Y., Beauchemin, N., Capson, T.L., Clark, B.R., Esquenazi, E., Eustáquio, A.S., Freel, K., Gerwick, L., Gerwick, W.H., Gonzalez, D., Liu, W.T., Malloy, K.L., Maloney, K.N., Nett, M., Nunnery, J.K., Penn, K., Prieto-Davo, A., Simmons, T.L., Weitz, S., Wilson, M.C., Tisa, L.S., Dorrestein, P.C., Moore, B.S. (2011).** Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus *Frankia*, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. *Appl Environ Microbiol* 77: 3617-3625.
- Ueki, M., Ueno, K., Miyadoh, S., Abe, K., Shibata, K., Taniguchi, M., Oi, S. (1993).** UK-1, a novel cytotoxic metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. I. Taxonomy,

fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 46: 1089-1094.

- Valentine, R.C.,** Valentine, D.L. (2004). Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog. Lipid Res.* 43: 383-402.
- Ventura, M.,** Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495-548.
- Vior N.M.,** Olano C., García I., Méndez C., Salas J.A. (2014). Collismycin A biosynthesis in *Streptomyces* sp. CS40 is regulated by iron levels through two pathway-specific regulators. *Microbiology* 160: 467-478.
- Wang, B.B.,** Maghami, N., Goodlin, V.L., Smith, P.J. (2004). Critical structural motif for the catalytic inhibition of human topoisomerase II by UK-1 and analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 3221-3226.
- Wang, S.,** Chen, Y., Zhao, S., Xu, X., Liu, X., Liu, B.F., Zhang, G. (2014). Synthesis and biological evaluation of a series of benzoxazole/benzothiazole-containing 2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxine derivatives as potential antidepressants. *Bioorg Med Chem Lett* 24: 1766-1770.
- Wright, G.D.** (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 1451-1470.
- Wu, Q.,** Liang, J., Lin, S., Zhou, X., Bai, L., Deng, Z., Wang, Z. (2011). Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 974-982.
- Xie, Y.,** Wang, B., Liu, J., Zhou, J., Ma, J., Huang, H., Ju, J. (2012). Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridogrisein in *Streptomyces griseoviridis*. *ChemBioChem.* 13: 2745-2757.
- Xue, Y.,** Wilson, D., Zhao, L., Liu, H.W., Sherman, D.H. (1998). Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the *pikC*-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezuelae*. *Chem Biol* 5: 661-667.
- Yamanaka, K.,** Reynolds, K.A., Kersten, R.D., Ryan, K.S., Gonzalez, D.J., Nizet, V., Dorrestein, P.C., Moore, B.S. (2014). Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111: 1957-1962.
- Zhang, X,** Alemany, L.B., Fiedler, H.P., Goodfellow, M., Parry, R.J. (2008). Biosynthetic investigations of lactonamycin and lactonamycin z: cloning of the biosynthetic gene clusters and discovery of an unusual starter unit. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 574-585.

- Zhao, B.,** Moody, S.C., Hider, R.C., Lei, L., Kelly, S.L., Waterman, M.R., Lamb, D.C. (2012). Structural analysis of cytochrome P450 105N1 involved in the biosynthesis of the zincophore, coelibactin. *Int J Mol Sci* 13:8500-8513.
- Zhao, Q.,** He, Q., Ding, W., Tang, M., Kang, Q., Yu, Y., Deng, W., Zhang, Q., Fang, J., Tang, G., Liu, W. (2008). Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chem Biol* 15: 693-705.
- Zhou, Z.,** Xu, Q., Bu, Q., Guo, Y., Liu, S., Liu, Y., Du, Y., Li, Y. (2015). Genome mining-directed activation of a silent angucycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chattanoogensis*. *ChemBioChem* 16: 496-502.
- Ziebart, K.T.,** Toney M.D. (2010). Nucleophile specificity in anthranilate synthase, aminodeoxychorismate synthase, isochorismate synthase, and salicylate synthase. *Biochemistry* 49: 2851-2859.
- Zmijewski, M.J.Jr.** (1980). Biosynthesis of antibiotic A23187. Incorporation of precursors into A23187. *J Antibiot* 33: 447-450.

ANEXO

NATAXAZOL HIDROXILADO

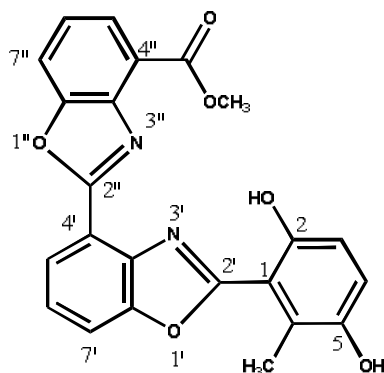


Figura 94. Estructura de nataxazol hidroxilado.

Tabla 18. Datos de RMN de nataxazol hidroxilado

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	112.6	-		
2	151.8	-		
3	115.0	6.82	d	8.7
4	120.7	7.02	d	8.7
5	148.2	-		
6	124.3	-		
2'	164.9	-		
3'a	138.2	-		
4'	117.2	-		
5'	125.6	8.34	d	7.8
6'	126.1	7.71	t	7.8
7'	115.5	8.15	d	115.5
7'a	150.5	-		
2''	161.8	-		
3''a	141.0	-		
4''	122.1	-		
5''	127.2	8.01	d	7.7
6''	125.8	7.61	t	7.8
7''	115.9	8.16	d	7.8
7''a	151.1	-		
Me	14.2	2.40	s	-
COOMe	165.6	-		
COOMe	52.7	4.03	s	-

UK-1

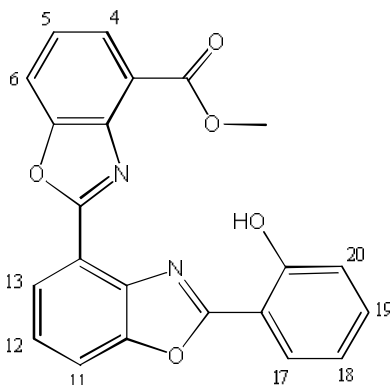


Figura 95. Estructura de UK-1.

Tabla 19. Datos de RMN de UK-1

Posición	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C (ppm)
4	8.11 (dd, 7.8, 0.7)	127.4
5	7.49 (m)	124.9
6	7.88 (dd, 8.0, 0.7)	115.1
11	7.81 (dd, 8.0, 0.6)	113.9
12	7.55 (t, 7.9)	125.3
13	8.37 (br d, 7.8)	125.3
17	7.21 (d, 8.2)	117.9
18	7.50 (m)	134.3
19	7.05 (t, 7.6)	119.6
20	8.09 (dd, 7.9, 1.5)	127.4
OMe	4.17 (s)	52.7

Enterobactina, 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina y ácido 2,3-dihidroxibenzoico

➤ Enterobactina

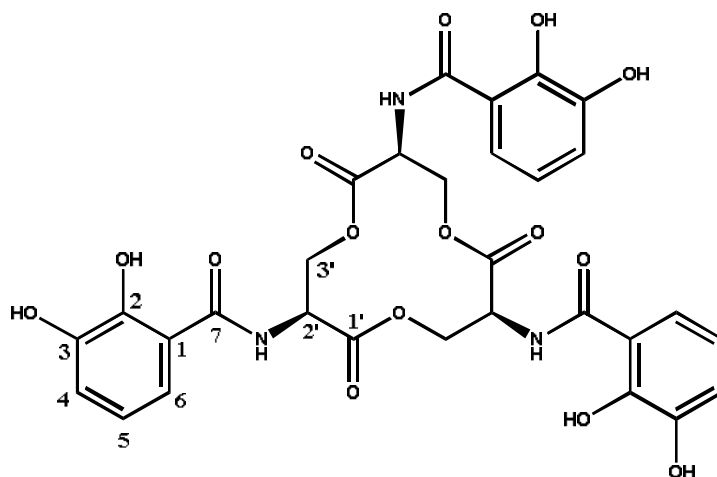
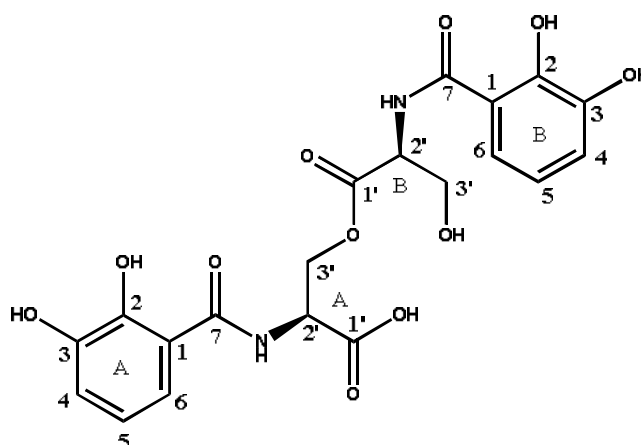


Figura 96. Estructura de enterobactina.**Tabla 20.** Datos de NMR de enterobactina

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	115.3	-		
2	145.7	-		
3	147.9	-		
4	118.6	6.98	dd	8.0, 1.3
5	118.6	6.74	t	8.0
6	118.3	7.25	dd	8.0, 1.3
7	169.1	-		
1'	169.1	-		
2'	52.3	5.05	t	5.1
3'	64.4	4.67	br d	5.1

➤ 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina**Figura 97.** Estructura de 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina.**Tabla 21.** Datos de RMN de 2,3-dihidroxi-*N*-benzoilserina

Monómero	Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
A	1	115.4	-		
	2	145.7	-		
	3	148.0	-		
	4	118.6	6.96	br t	8.0
	5	118.4	6.74	t	8.0
	6	118.3	7.34	dd	8.0, 1.2
	7	169.2	-		
	1'	170.5	-		
	2'	51.9	5.01	dd	5.5, 5.3
	3'a	64.0	4.87	m	
3'b	4.58		dd	11.2, 5.5	
B	1	115.4	-		
	2	145.7	-		
	3	148.4	-		
	4	118.6	6.96	br t	8.0
	5	118.4	6.75	t	8.0
	6	118.1	7.31	dd	8.0, 1.2
	7	169.4	-		
	1'	169.9	-		

	2'	55.1	4.78	t	4.4
	3'a	61.4	4.05	dd	11.5, 5.0
	3'b		3.96	dd	11.5, 4.0

➤ Ácido 2,3-dihidroxibenzoico

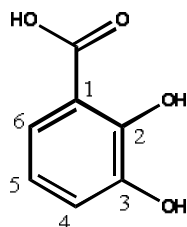


Figura 98. Estructura del ácido 2,3-dihidroxibenzoico

Tabla 22. Datos de RMN del ácido 2,3-dihidroxibenzoico

Posición	δ ¹ H (ppm)	multiplicidad	<i>J</i> (Hz)
4	7.02	dd	8.0, 1.4
5	6.75	t	8.0
6	7.37	dd	8.0, 1.4