Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Activación de rutas de biosíntesis silenciosas en *Streptomyces albus* J1074

Activation of silent biosynthetic pathways in *Streptomyces albus* J1074

Tesis Doctoral

Jorge Fernández De la Hoz

Directores: José Antonio Salas Fernández y Carlos Olano Álvarez

Oviedo 2018

© Jorge Fernández De la Hoz, 2018

Diseño de portada

Laura Clusa

Fotografía de portada

Laura Clusa

Maquetación

Jorge Fernández De la Hoz

Edición

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo

La Tesis Doctoral ha sido financiada con un contrato predoctoral del Ministerio Español de Economía y Competitividad, MINECO (BES-2013-064704). También se ha podido realizar gracias a los proyectos de investigación del Ministerio Español de Economía y Competitividad MINECO (BIO2012-33596 y PIM2010EEI-00752) y al proyecto "Apoyo a grupos de excelencia", Principado de Asturias-FEDER (FC-15-GRUPIN14-014).

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Activación de rutas de biosíntesis silenciosas en *Streptomyces albus* J1074	Inglés: Activation of silent biosynthetic pathways in *Streptomyces albus* J1074

2.- Autor	
Nombre: Jorge Fernández De la Hoz	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Biología molecular y celular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Los productos naturales (PNs) juegan un papel importante en Biotecnología debido a sus diversas actividades biológicas y a su aplicación en clínica, veterinaria y agricultura. En los últimos años, el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de rutas de biosíntesis de PNs microbianos ha aumentado enormemente como consecuencia del desarrollo de la ingeniería genética aplicada a microorganismos. Es conocida la capacidad de muchas bacterias de generar productos bioactivos. De entre todas ellas, los actinomicetos representan el grupo de bacterias del que más se conoce su capacidad de producir dichos productos (antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, etc.). La secuenciación masiva de genomas bacterianos ha puesto de manifiesto que algunos grupos presentan un potencial oculto para la producción de nuevas moléculas bioactivas previamente desconocidas y determinadas por agrupaciones génicas silenciosas. En concreto, los actinomicetos, y en particular el género *Streptomyces*, entran dentro de esta categoría de potenciales productores de nuevas moléculas bioactivas.

Streptomyces albus J1074 presenta en su genoma al menos 27 agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios potencialmente bioactivos. De estos agrupamientos se han identificado por el momento los metabolitos determinados por 5 de ellos que corresponden a un pigmento (indigoidina), dos familias de compuestos antifúngicos (candicidinas y antimicinas), una familia de compuestos con actividad antibiótica (paulomicinas) y un compuesto citotóxico (6-*epi*-alteramida A). Los productos determinados por los 22 agrupamientos génicos restantes son por el momento desconocidos. Como ocurre en todos los estreptomicetos en estudio, la mayoría de los agrupamientos génicos presentes en *S. albus J1074* permanecen silenciosos en las condiciones habituales de crecimiento en el laboratorio o bien se expresan pobremente. Para identificar los productos cuya biosíntesis es determinada por estos agrupamientos génicos silenciosos se requiere la manipulación genética del microorganismo para activar específicamente la expresión de genes biosintéticos, bien de forma directa o bien a través de la expresión de activadores transcripcionales específicos de cada ruta.

Para este trabajo se estudió el genoma de *S. albus J1074* para la identificación de agrupaciones génicas y se seleccionaron cuatro de esos agrupamientos como objeto de estudio, uno de ellos conteniendo genes que codifican un sistema PKS-NRPS (*polyketide synthase-non-ribosomal peptide synthetase*) y tres conteniendo genes que codifican NRPSs, por su potencial biosintético de acuerdo a las predicciones bioinformáticas obtenidas con los programas Antismash y PRISM. A continuación, se llevó a cabo la manipulación genética de cada uno de los agrupamientos para la activación y expresión de las rutas de biosíntesis. Durante todo el trabajo desarrollado se ha venido aplicando el denominado método OSMAC (*One Strain Many Compounds*), que consiste en introducir variaciones en las diferentes condiciones del cultivo como temperatura de crecimiento, medio de cultivo, velocidad de agitación, etc. y estudiar si alguna de esas alteraciones o diferentes combinaciones entre ellas suponen un cambio en la pauta de producción habitual de metabolitos de una cepa bacteriana. Usando esta metodología se han identificado 4 nuevos derivados de paulomicinas (UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090) de las que, tras purificar y elucidar sus estructuras moleculares, se estudió su actividad biológica, determinando finalmente poseen una actividad antibiótica menor que las paulomicinas frente a bacterias Gram-positivas si bien de manera general muestran una mayor actividad antibiótica frente a Gram-negativas.

FOR-MAT-VOA-010-BIS-2

RESUMEN (en Inglés)

Natural products (NPs) play a main role in Biotechnology for their multiple biological activities and their applications in medical clinic, veterinary and agriculture. In recent years, knowledge of genetic and biochemical bases of microbial NPs biosynthesis pathways has greatly increased as a result of the development of genetic engineering techniques applied to producer microorganisms.

It is known the ability of many bacteria to produce bioactive products. Among bacteria, actinomycetes are the main producers of such compounds, including antitumor, antibacterial, antifungal, antiviral, etc. Massive bacterial genome sequencing projects have revealed some groups (especially actinomycetes) with a hidden potential for production of novel bioactive molecules coded by silent biosynthesis gene clusters. In particular, the genus *Streptomyces*, belonging to the phylum *Actinobacteria*, especially fall into this category of potential producers of novel bioactive molecules.

Streptomyces albus J1074 presents at least 27 gene clusters for the biosynthesis of potentially bioactive secondary metabolites. Of these clusters, the metabolites determined by five of them have been identified so far corresponding to a pigment (indigoidine), two families of antifungal compounds (candicidines and antimycins), a family of compounds with antibiotic activity (paulomicins) and a cytotoxic compound (6-*epi*-alteramide A). The products determined by the remaining 22 gene clusters are yet unknown. As in all streptomycetes under study, most of the gene clusters present in *S. albus* J1074 remain silent under normal laboratory growth conditions or are poorly expressed. To identify the products whose biosynthesis is determined by these silent gene pools, genetic manipulation of the microorganism is required to specifically activate the expression of biosynthetic genes, either directly or through the expression of specific transcription activators of each pathway.

For this work the genome of *S. albus* J1074 was studied in order to identify biosynthesis gene clusters leading to bioactive compounds. Four clusters were selected as main objective of this study, one of them containing genes that encode a PKS-NRPS system (polyketide synthase-non-ribosomal peptide synthetase) and three containing genes that encode NRPSs, all selected based in their biosynthetic potential according to the bioinformatic predictions obtained by Antismash and PRISM softwares. Genetic manipulation was carried out in each of them for the activation and expression of the biosynthetic pathways.

During all the work developed, the so-called OSMAC (*One Strain Many Compounds*) method has been applied, which consists of introducing variations in the different culture conditions such as growth temperature, culture medium, agitation speed, etc. to study if any of these alterations or different combinations between them suppose a change in the pattern of habitual production of metabolites of a bacterial strain. Using this approach, 4 new derivatives of paulomycins (UO-087, UO-088, UO-089 and UO-090) were discovered. They were purified and their molecular structures elucidated. Their biological activity was studied, determining they exert a lower antibiotic activity than paulomycins against Gram-positive bacteria, although they generally show a greater antibiotic activity against Gram-negative bacteria.

Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Activación de rutas de biosíntesis silenciosas en *Streptomyces albus* J1074

Tesis Doctoral

Jorge Fernández De la Hoz

Oviedo 2018

Universidad de Oviedo

Department of Biochemistry and Molecular Biology

PhD Programme in Molecular and Cellular Biology

Activation of silent biosynthetic pathways in *Streptomyces albus* J1074

PhD Thesis

Jorge Fernández De la Hoz

Oviedo 2018

Agradecimientos

Hace ya casi 5 años que una llamada de teléfono cambió mi vida. En un momento en el que ya pensaba que nunca tendría una oportunidad en la ciencia, mi gran pasión y para lo que me había preparado con mucho esfuerzo, se abrió una posibilidad en Oviedo. Me gustaría mostrar mi agradecimiento al apoyo de toda la gente que ha ayudado a que el trabajo realizado durante este tiempo se haya traducido en esta tesis doctoral.

Es por ello que quiero agradecer en primer lugar al Dr. José Antonio Salas y a la Dra. Carmen Méndez el haberme dado esta oportunidad, y haberme permitido hacer realidad mi sueño. Ha sido un honor compartir tan buenos momentos y haber aprendido tanto de vosotros.

En segundo lugar, tengo que agradecer al Dr. Carlos Olano el haber estado siempre ahí, no sólo como jefe, ni como compañero, sino como amigo. Porque además de todo lo que he aprendido de ti, que es mucho, me quedo con el hecho de haberte conocido y haber compartido grandes momentos, largas charlas y sobre todo muchas risas. Muchas gracias por todo Carlos.

A toda la gente con la que he coincidido estos años en el laboratorio. La gente que estaba cuando empecé que me recibieron con los brazos abiertos y me hicieron sentirme dentro de una gran familia. A todos ellos, tanto del L-16 como del L-17, que tanto buenos ratos hemos pasado, Susana, Javi, Brian, Guada, Carolina, Nacho, Leire y Adriana. Tampoco puedo olvidarme de los compañeros de TFG, Adrián y Veridiana.

A Ana, compañera de indigoidina, por estar siempre sonriendo. A Laura, verás como enseguida sin darte cuenta estarás escribiendo los agradecimientos de tu tesis, por tu energía. A Alma, por tantas conversaciones largas y tendidas. A Armando, por ser mi profesor de asturianía y además ponerme al día con las nuevas tecnologías. A Suhui, por ayudarme y enseñarme tanto en esas largas charlas con papel y boli dibujando plásmidos. A Arantxa, por ser mi maestra y mentora en albus, y una gran amiga.

A las otras dos patas del trío calavera. A Mónica, compañera de meseta, pero sobre todo amiga. Porque me has acompañado durante casi toda la tesis y tu apoyo ha sido fundamental. A mi camarada Rubén, la

alegría del laboratorio y otro amigo que me llevo para toda la vida. Por los cafés, las cervezas en días duros, las comilonas, las interminables risas que amenizaron el trabajo, … ¡¡gracias por todo chicos, sin vosotros dos esta tesis no habría sido lo mismo!!

A mi laboratorio político, del departamento de genética, por acogerme como uno más y enseñarme tanto de genética, peces y ríos. A Laura por su alegría y a Sara por ser mi hermana pequeña asturiana, mucho ánimo que ya no te queda nada y la recompensa está cerca.

A las cuadrillas de Barakaldo y de La Cavada, porque sois mi familia, aunque no compartamos ADN. Muchas gracias porque, aunque nos hemos visto mucho menos de lo que me hubiera gustado, siempre habéis estado ahí.

A mi familia, abuelos y abuelas, tíos y primos, por todo vuestro apoyo y cariño. A mi familia política, por interesarse tanto por mi trabajo, apoyarme, esas largas conversaciones sobre cómo arreglar el mundo y darme tanto y tanto cariño desde el primer día.

Muy especialmente a mis padres, por todo el esfuerzo y sacrificio que han hecho para que yo llegue aquí. Y por las ganas en intentar comprender a lo que me dedico, estando siempre preocupados por si había dado de comer todos los días a los "bichucos". A mi hermana Marta y a Manu, por estar ahí durante estos años apoyándome y dándome energía. Y a la mi güela Margarita porque, aunque ya no estés, gran parte de esto es por ti y para ti, gracias por todo.

Por último, el agradecimiento más especial es para ti, Laura. Por haber entrado en mi vida en un momento en que estaba perdido y ayudarme a encontrar el camino, por confiar en mí y enseñarme a confiar en mí mismo, por estar ahí en los buenos y en los malos momentos, por todo. Por estos más de 7 años juntos en los que incluso hemos superado dos escrituras de tesis conjuntas y, sobre todo, por todo lo que está por venir que estoy convencido de que será aún mejor y más especial que lo vivido hasta ahora, te quiero. Gracias por estar siempre a mi lado.

A ti, por creer en mí y ser mi piedra angular,

Mamá, papá, Marta y Manu

"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado".

Albert Szent-Györgyi

"En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender"

Marie Curie

Índice

Introducción 1

1. Actinomicetos 3
1.1. El género *Streptomyces* 5
1.1.1. Ciclo de vida de *Streptomyces* 5
1.1.2. *Streptomyces albus* J1074 7
1.1.3. Colección de cepas *Streptomyces sp. CS* 7
2. Identificación y caracterización de nuevos compuestos bioactivos 9
2.1. Productos naturales 9
2.2. Metodología tradicional 10
2.3. Minería genómica 11
2.3.1. Secuencia genómica de *Streptomyces albus* J1074 14
2.3.2. Identificación de los compuestos codificados por clústeres de biosíntesis crípticos 17
2.4. Activación o incremento de la producción de metabolitos secundarios crípticos 17
2.4.1. Método OSMAC (One Strain – Many Compounds) 17
2.4.2. Suplementación de medios de cultivo con elicitores químicos 18
3. Cuantificación de la expresión génica 19
3.1. Indigoidina 22
3.1.1. Estudio del clúster de indigoidina (9) de *S. albus* J1074 22

Objetivos 25

Materiales y métodos 29

1. Microorganismos 31
2. Plásmidos 32
3. Productos químicos 32
4. Enzimas 32
5. Antibióticos 33
6. Métodos microbiológicos 33
6.1. Medios de cultivo 33
6.1.1. Medios de cultivo empleados para *E. coli* 33
6.1.2. Medios de cultivo empleados para *Streptomyces* 34
6.1.3. Medios de cultivo empleados para levadura 37
6.2. Condiciones de cultivo 37
6.2.1. Cultivos de *E. coli* 37
6.2.2. Cultivos de *Streptomyces* 37
6.2.3. Conservación de las cepas 38
6.2.4. Cultivos para cuantificar producción de metabolitos secundarios de interés 38
7. Aislamiento de ADN 38
7.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli* 38
7.2. Minipreparaciones de plásmido de *E. coli* 38
7.3. Lisis alcalina 39
7.4. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación 40
7.5. Obtención de ADN cromosómico de *Streptomyces* 40
8. Manipulación *in vitro* de ADN 41

8.1. Digestión enzimática 41
8.2. Desfosforilación de extremos 5' de ADN 41
8.3. Generación de extremos romos 41
8.4. Ligación de ADN 42
8.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa 42
8.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa 43
8.7. Cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos 43
9. Transformación con ADN plasmídico 44
9.1. Obtención de células competentes 44
9.2. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico 44
9.3. Obtención de células electrocompetentes 45
9.4. Electroporación de células electrocompetentes de *E. coli* 45
10. Conjugación intergenérica de *Streptomyces* 45
11. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR 46
11.1. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR 46
11.2. Oligonucleótidos 47
11.3. Condiciones de reacción de PCR 56
11.3.1. PCR para la obtención de fragmentos de ADN 56
11.3.2. PCR para la comprobación de cepas recombinantes 57
11.3.3. Programa de amplificación 57
12. Secuenciación 58
12.1. Secuenciación de fragmentos de PCR y construcciones plasmídicas 58
12.2. Análisis de las secuencias de ADN 58
13. Generación de mutantes 58
13.1. Generación de mutantes por reemplazamiento génico 59
13.1.1. Mutantes en el clúster 1 de *S. albus* J1074 62
13.1.2. Mutantes en el clúster 13 de *S. albus* J1074 64
13.1.3. Mutantes en el clúster 14 de *S. albus* J1074 64
13.1.4. Mutantes en el clúster 21 de *S. albus* J1074 64
13.1.5. Mutantes realizados en el clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227 65
13.1.6. Mutantes realizados en el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227 65
13.2. Generación de dobles mutantes por reemplazamiento génico 67
14. Generación de construcciones plasmídicas 68
14.1. Sobreexpresión de genes reguladores con plásmido pOJ260p 68
14.2. Sobreexpresión de genes reguladores con plásmido multicopia pEM4T 71
14.3. Sobreexpresión de genes reguladores con plásmido integrativo pSET152Ec 73
14.4. Cuantificación de la expresión de uno o varios genes 74
14.4.1. Generación de un plásmido testigo 77
14.4.2. Cuantificación de la expresión de genes y agrupaciones génicas biosintéticas 78
14.4.3. Plásmido pOJ260ind_H 80
14.4.4. Plásmido pOJ260ind_t 81
14.4.5. Plásmido pOJ260ind_t_H 81
14.4.6. Plásmido pSET152Ec_ind_t 82
15. Extracción y análisis cromatográfico de compuestos bioactivos 83
15.1. Extracción de compuestos 83
15.2. Análisis cromatográfico por UPLC 83
15.3. Análisis cromatográfico por HPLC-MS 84
15.4. Purificación de compuestos 84

15.5. Caracterización estructural de compuestos 85
16. Análisis de actividad biológica 85
16.1. Análisis de actividad citotóxica 85
16.2. Análisis de actividad antibiótica 86
17. Ensayos de estabilidad 87

Resultados 89

1. Análisis de genomas 91
1.1. Análisis de agrupaciones biosintéticas de *Streptomyces albus* J1074 91
1.2. Búsqueda de agrupaciones génicas de biosíntesis 91
1.2.1. Estudio de clústeres biosintéticos de potencial interés 91
1.2.2. Organización genética de los clústeres 92
1.2.3. Predicciones bioinformáticas 97
1.3. Análisis comparativo de genomas en colección de cepas *Streptomyces sp. CS* 100
1.3.1. Streptomyces sp. CS227 101
2. Caracterización del clúster 1 de *S. albus* J1074 105
2.1. Caracterización del clúster 20 de *Streptomyces sp. CS227* 107
3. Caracterización del clúster 13 de *S. albus* J1074 109
4. Caracterización del clúster 14 de *S. albus* J1074 112
5. Caracterización del clúster 21 de *S. albus* J1074 115
6. Aproximaciones metabólicas a la activación de clústeres biosintéticos 119
6.1. Pruebas de diferentes medios del cultivo 119
6.1.1. Elicitores 124
7. Cuantificación de la expresión de genes en clústeres biosintéticos 126
7.1. Generación de un vector testigo 126
7.2. Cuantificación del nivel de expresión de los promotores de estudio 127
8. Caracterización estructural de nuevos metabolitos detectados mediante método OSMAC 132
8.1. Nuevos derivados de paulomicinas 133
8.1.1. Purificación de compuestos 133
8.1.2. Elucidación estructural 134
8.1.2.1. UO-087 134
8.1.2.2. UO-088 135
8.1.2.3. UO-089 136
8.1.2.4. UO-090 136
8.1.3. Análisis de actividad biológica 137
8.1.3.1. Análisis de actividad citotóxica 137
8.1.3.2. Análisis de actividad antibiótica 137
8.1.4. Ensayos de estabilidad 139

Discusión 143

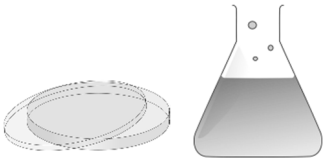
Conclusiones 155

Referencias 159

Anexos 173

1. Informe de derreplicación DRC-029 vs DRC-030 175
2. Informe de derreplicación DRC-029 vs DRC-031 189
3. Informe de derreplicación DRC-051 vs DRC-052 203
4. Informe de derreplicación DRC-062 vs DRC-063 211

Publicaciones 235



Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Actinomicetos

Los actinomicetos son un filo de bacterias Gram-positivas filamentosas, aerobias y unicelulares que presentan una gran diversidad. Los primeros actinomicetos fueron descubiertos en la segunda mitad del s. XIX y hasta casi un siglo más tarde se creía que eran un intermediario entre bacterias y hongos, hasta que se comprobó que, en realidad, son verdaderas bacterias Gram-positivas. En 1943 se publicó por primera vez un sistema de clasificación de actinomicetos (Waksman y Henrici, 1943) el cual estaba basado en el grado de ramificación del micelio que presentaba cada uno de ellos (Figura 1). En él se presentaban, basándose en las diferentes morfologías, cinco grupos.

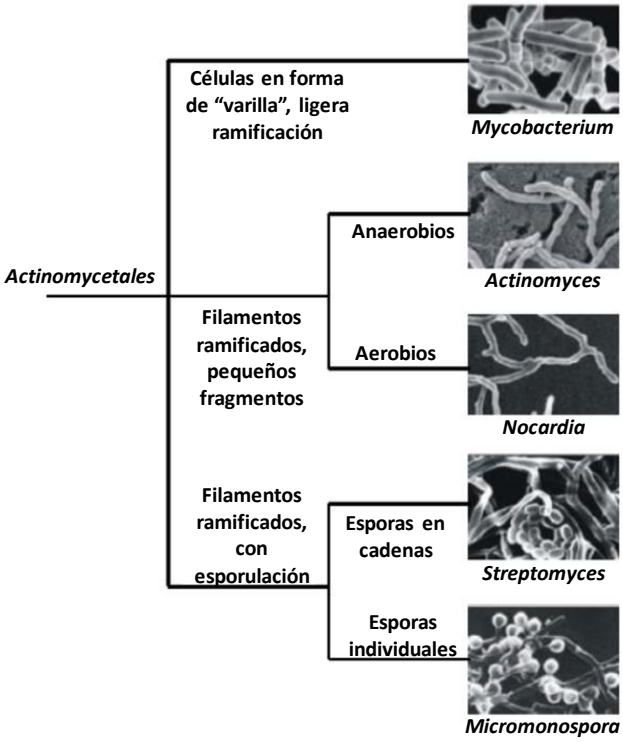


Figura 1. Clasificación de los actinomicetos propuesta por Waksman y Henrici en 1943 basada en características morfológicas. Modificado de Hopwood (2007).

A partir de los años 50 del siglo XX hubo un gran desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular que permitieron a su vez implementar el análisis filogenético basado en análisis de secuencias de ARN ribosómico (Olsen *et al.*, 1986), lo que supuso un avance importantísimo en el estudio de los actinomicetos. Gracias a la secuenciación del ARN ribosomal de las subunidades 16S y 23S y la constante secuenciación de genomas completos de muchas especies bacterianas, el estudio sistemático de éstas ha avanzado a pasos agigantados. En la última edición publicada en el año 2012 del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica (IX

edición) aparece un volumen dedicado exclusivamente a actinomicetos, donde aparece el taxón clasificado en 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 222 géneros (Gao y Gupta, 2012) (Figura 2). Esta información está continuamente actualizándose debido a aportaciones de nuevos estudios y puede ser consultada a través de la página web http://www.bacterio.net/*Streptomyces*.html. En esta clasificación se destaca como productor de metabolitos secundarios al género *Streptomyces*.

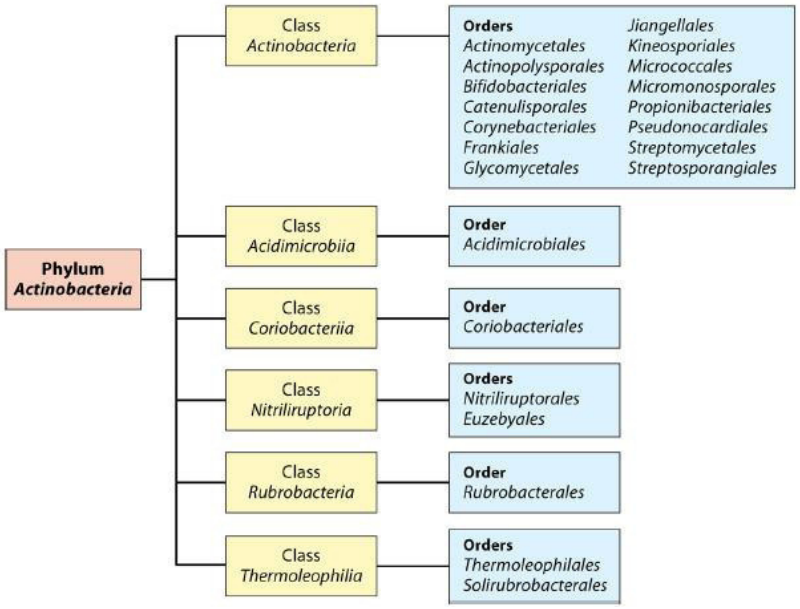


Figura 2. Clasificación taxonómica propuesta para actinomicetos en la IX edición del *Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica* (Gao y Gupta, 2012)

Como característica diferencial los actinomicetos presentan un genoma muy rico en G+C (llega a alcanzar hasta el 70-75%), que podría interpretarse como una respuesta adaptativa impulsora del uso de codones no reconocibles por determinados bacteriófagos (Chater y Chandra, 2006). Poseen forma filamentosa formando filamentos ramificados que dan como resultado una estructura denominada micelio, parecida a la presentada por los hongos filamentosos (Chater, 1998).

Los actinomicetos pueden aislarse tanto del suelo como de sedimentos marinos. Pese a que la industria farmacéutica lleva más de 50 años muestreando y analizando los provenientes del suelo, sólo se han recogido muestras en una pequeña fracción de la superficie terrestre y sólo una insignificante fracción de los actinomicetos presentes en ella ha sido descubierta hoy en día (Baltz, 2005; Baltz, 2007).

También se han encontrado actinomicetos en sedimentos marinos (Morán *et al.*, 1995) de hábitats muy diversos, llegando incluso alguno de ellos a considerarse extremos por sus condiciones. Algunos productos generados por estas especies marinas presentan unas características químicas no observadas en los generados por las especies terrestres a día de hoy, como la abissomicina C, aislada de una nueva especie de *Verrucosispora* del Mar de Japón, que inhibe la biosíntesis del ácido *para*-aminobenzoico (Fiedler *et al.*, 2005). Un detalle también

observado en muchos de estos metabolitos aislados de especies marinas es que frecuentemente poseen actividad citotóxica, lo cual se cree que podría ser debido a su estrecha relación con organismos eucariotas marinos (Baltz, 2008).

Los actinomicetos son productores de una cantidad muy amplia y heterogénea de gran parte de los productos naturales (PNs) relevantes para la industria farmacéutica. Más del 50% de todos los compuestos antiinfectivos y antineoplásicos desarrollados en los últimos 40 años han sido PNs o derivados de ellos.

1.1. El género *Streptomyces*

La primera referencia al género *Streptomyces* fue dada en 1875 por el botánico y bacteriólogo polaco Ferdinand Julius Cohn (Cohn, 2005). Basándose en su aspecto filamentoso le asignó el nombre de *Streptothrix* (pelo enrollado). No fue hasta 1943 cuando dicha denominación se cambió por la empleada actualmente, *Streptomyces* (hongo enrollado).

La actual taxonomía del género *Streptomyces* es la siguiente (Ludwig W. *et al.*, 2012 a y b): Dominio Bacteria; Filo XXVI. *Actinobacteria;* Clase I. *Actinobacteria*; Orden XIV. *Streptomycetales*; Familia I. *Streptomycetaceae*; Género I. *Streptomyces.*

1.1.1. Ciclo de vida de *Streptomyces*

El ciclo de vida se *Streptomyces* es complejo ya que presenta varias fases caracterizadas por cambios tanto en su morfología como en su fisiología. El estudio de este ciclo de vida se ha realizado principalmente en medio sólido debido a que en medio líquido la mayoría de las especies no esporulan.

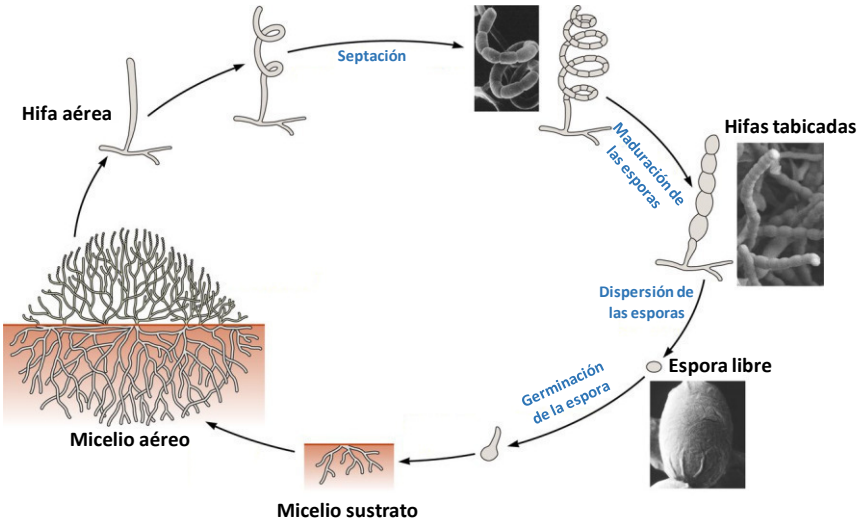


Figura 3. Modelo clásico del ciclo de vida de *Streptomyces* (modificado de Barka *et al.*, 2016)

El modelo clásico de este ciclo de vida (Figura 3) comienza con la germinación de una espora, una vez ésta se encuentra en un ambiente con condiciones favorables. A continuación,

a partir de la espora germinada crece el tubo germinativo que termina por generar un entramado de hifas ramificadas multigenómicas que se insertan en el sustrato para nutrirse. Este modelo clásico se basaba en la idea de que la diferenciación se produce de manera vertical (de abajo hacia arriba) e implica la formación de dos tipos diferentes de micelio. En primer lugar, un micelio vegetativo (sustrato) que crece dentro y sobre el agar hasta que se somete a un proceso de muerte, después de lo cual las hifas comienzan a diferenciarse para formar un micelio reproductivo (aéreo) que crece en el aire hasta finalmente desembocar en la formación de esporas individuales (Méndez *et al.*, 1985; Miguélez *et al.*, 1999; Fernández y Sánchez, 2002). Tradicionalmente se asumía que el inicio del desarrollo es en gran medida homogéneo en todas las áreas de la superficie de la placa.

Estudios posteriores han mostrado que el modelo aceptado hasta ahora no funciona tal cual se pensaba y se ha ampliado (Manteca *et al*., 2008; Manteca y Sánchez, 2009). Mediante estudios de transcriptómica y proteómica se ha probado que existen fases previamente desconocidas dentro del proceso de diferenciación. Una vez las esporas germinan se desarrolla el micelio primario (MI), un micelio joven y septado, donde coexisten células vivas y muertas debido a un proceso de muerte celular programada. La muerte se produce de dentro hacia fuera y son las células vivas periféricas las que dan paso a un micelio secundario (MII) multinucleado, en el cual se han localizado dos estadios. En el primero de ellos, denominado MII temprano, el micelio crece dentro del medio de cultivo (coincide con lo que tradicionalmente se consideraba micelio sustrato) hasta que comienza a generar una capa hidrofóbica envolvente que permite que crezca fuera del medio de cultivo dando paso al MII tardío (micelio aéreo) (Manteca *et al.*, 2007). Antes de producirse la esporulación acontece una segunda muerte celular programada que afecta tanto al micelio sustrato como al aéreo (MII tardío) (Figura 4). Durante la etapa de micelio II se producen antibióticos claves (metabolitos secundarios) para la supervivencia de la bacteria frente a otros microorganismos (Yagüe *et al.*, 2013).

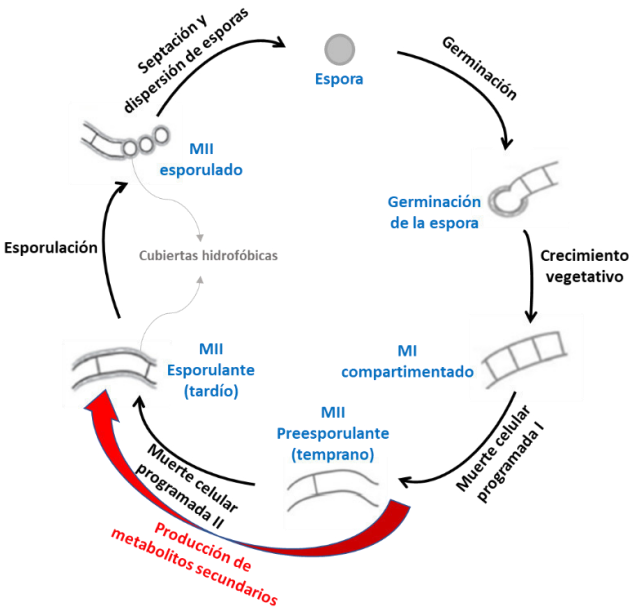


Figura 4. Ciclo de vida de *Streptomyces* actualizado propuesto por Manteca *et al*., 2009 (imagen modificada de Yagüe *et al*., 2013).

1.1.2. *Streptomyces albus* J1074

La cepa bacteriana sobre la que gira el trabajo llevado a cabo durante esta tesis doctoral es *Streptomyces albus* J1074 productora de antibióticos de la familia de las paulomicinas. Generalmente en condiciones de laboratorio estándares la producción de paulomicinas u otros metabolitos secundarios es poco relevante, lo que unido a su rápido crecimiento y esporulación la ha convertido en una cepa tradicionalmente empleada como hospedadora para la expresión heteróloga de genes individuales y rutas de biosíntesis de compuestos bioactivos como fredericamicina, napiradiomicina, tiocoralina (Baltz, 2010) o espinosina (Tan *et al.*, 2017). Además, cada vez es tenida más en cuenta como una cepa modelo para el estudio de la biología general de actinomicetos en temas como crecimiento, morfogénesis, división celular, formación de la pared celular y resistencia a los antibióticos (Zaburannyi *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha estudiado la producción de algunos de los metabolitos secundarios propios de *S. albus* J1074 mediante la activación de sus agrupaciones génicas silenciosas o crípticas (Olano *et al*., 2014).

S. albus J1074 fue obtenida a partir de *S. albus* G, cepa productora de la endonucleasa de restricción SalI (Arrand *et al*., 1978), la cual impide la infección por algunos bacteriófagos (Chater y Wilde, 1976; Rodicio y Chater, 1988). A partir de *S. albus* G se aisló un mutante defectivo en el enzima de restricción SalI, comprobándose que este mutante contenía una inserción de IS*112* en el gen SalI-R (Chater y Wilde, 1980; Rodicio *et al*., 1991). Se determinó que la nueva cepa *S. albus* J1074, defectiva en SalI-R, permitía la infección por varios bacteriófagos de estreptomicetos (Cox y Baltz, 1984) y también que favorecía una eficiente regeneración de protoplastos (Baltz y Matsushima, 1981), requisito indispensable para poder llevar a cabo la transformación de protoplastos. Otro factor que favorece el hecho de emplear esta cepa como modelo de estudio es la facilidad de su manipulación genética debido a la deficiencia en el enzima de restricción-modificación, lo que le impide diferenciar si el ADN es metilado (propio) o no metilado (exógeno) (Chater y Wilde, 1976).

En cuanto a su genoma cabe destacar que *S. albus* J1074 presenta una peculiaridad dentro de los estreptomicetos secuenciados hasta ahora, y es que contiene uno de los genomas más pequeños (6,84 Mb) (Baltz, 2011; Zaburannyi *et al.*, 2014), pudiendo ser considerado como un genoma minimizado. Sus brazos terminales tienen una longitud de tan solo 0.4 y 0.3 Mb e incluyen TIR (*Terminal inverted* repeat) muy cortos (30 pb) (Myronovskyi *et al.*, 2013). Incluso la región central, que presenta genes altamente conservados en estreptomicetos, es más pequeña que las observadas en otros representantes del género, ya que *S. albus* posee en su genoma un menor número de copias de ciertos genes metabólicos primarios redundantes.

1.1.3. Colección de cepas *Streptomyces sp. CS*

Hasta ahora se han localizado actinomicetos en muy diversos ambientes como ecosistemas marinos, de agua dulce, terrestres y extremófilos. Ante la necesidad de encontrar nuevos PNs de interés cobra especial importancia la ecología bacteriana, que persigue localizar nuevas especies en ambientes no explorados hasta ahora (Figura 5). Una de las fuentes más prometedoras para proporcionar nuevos metabolitos son los microorganismos que establecen

relaciones de simbiosis con otros organismos, como por ejemplo bacterias, hongos u organismos superiores como hormigas y avispas (Poulsen *et al*., 2011; Behie *et al*., 2017).

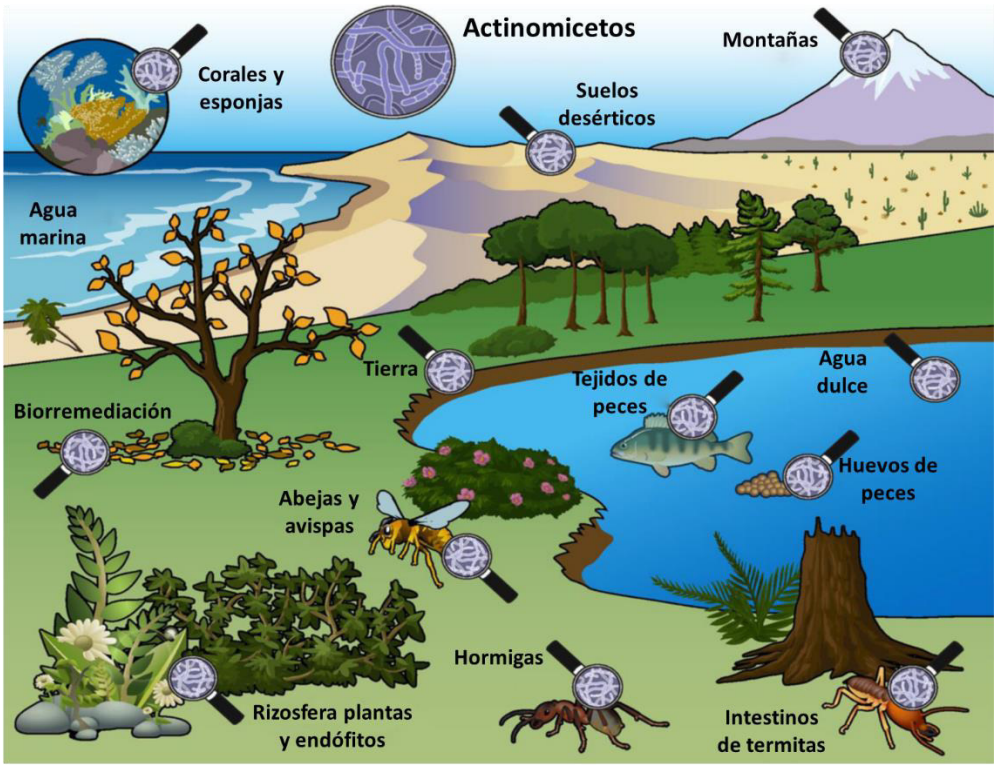


Figura 5. Ambientes estudiados por la ecología bacteriana donde localizar nuevos microorganismos productores de compuestos bioactivos naturales (imagen adaptada de van der Meij *et al*., 2017).

Muchos actinomicetos presentes en entornos naturales han variado las que se consideran sus pautas tradicionales de vida adaptándose a nuevas condiciones. Mucho de ellos han evolucionado de manera que viven en simbiosis con otros organismos como plantas, hongos, insectos, corales o esponjas (Figura 5). Gracias a esta cooperación los organismos hospedadores se benefician de los PNs sintetizados por los actinomicetos que pueden servir de ayuda frente a agentes patógenos, favorecer la degradación de polímeros naturales complejos como la lignocelulosa e incluso ayudar a un correcto y sano crecimiento del propio organismo. A su vez el inquilino simbionte también se beneficia de recursos aportados por el hospedador. Conforme avanzan los estudios sobre estas interacciones se está comprobando que éstas determinan frecuentemente la expresión de los agrupamientos de genes biosintéticos y tienen un papel importante en la evolución de la alta diversidad química de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos. Muchos de estos agrupamientos biosintéticos no se expresan o lo hacen pobremente en condiciones de laboratorio, pero se está observando que en la naturaleza es probable que se expresen en respuesta a las demandas específicas del hospedador en cada momento (van der Meij *et al*., 2017).

Nuestro laboratorio alberga una colección de cepas de *Streptomyces* aisladas en la región de Lambayeque (Perú) a partir de hormigas cortadoras de hojas de la Tribu *Attini*. Este tipo de hormigas son originarias de América y aglomeran un total de 230 especies. Se ha

observado que las consideradas como *Attini* superiores (géneros *Acromyrmex* y *Atta*) cultivan y se alimentan de hongos de la familia *Lepiotaceae* (agaricales). Para la consecución de este proceso denominado fungicultura, las hormigas transportan hojas del entorno en que viven y las trocean para que éstas actúen como sustrato del cultivo. Los hongos cultivados coexisten con hongos patógenos del género *Escovopsis*, que son parásitos que afectan tanto a los hongos que cultivan como a las propias hormigas (Mueller y Gerardo, 2002). Para tratar de combatir esta amenaza las hormigas han desarrollado procesos de simbiosis-mutualismo con actinomicetos del suelo (Taerum *et al*., 2007). De tal forma que la quitina que conforma el exoesqueleto de las hormigas es colonizada por los actinomicetos que protegen a la colonia gracias a la cantidad de metabolitos secundarios que son capaces de generar, como por ejemplo fungicidas, minimizando de este modo la amenaza de microorganismos patógenos que afecta tanto a las hormigas como a su alimento.

Se ha observado que existe una enorme variedad tanto de géneros como de especies dentro de las bacterias simbiontes con las hormigas *Attini*. Al principio se creía que sólo se trataba de *Pseudonocardia spp*. (Currie *et al*., 1999), pero estudios posteriores han revelado que otros muchos microorganismos se asocian en esta actividad de simbiosis mutualista como, por ejemplo, *Streptomyces* o *Burkholderia* (Kost *et al*., 2007; Mueller *et al*., 2008). Este hecho se debe a la continua movilidad de estas colonias, ya que sus miembros exploran nuevos territorios en busca de alimento y en esos trayectos se produce un continuo intercambio entre los microorganismos residentes en su exoesqueleto y nuevas bacterias que se encuentran en el suelo por el que pasan, con el consiguiente intercambio tanto de bacterias como de información genética.

2. Identificación y caracterización de nuevos compuestos bioactivos

2.1. Productos naturales

El descubrimiento de la capacidad para generar PNs por parte de los actinomicetos supuso una enorme contribución a la biotecnología debido a sus diversas actividades biológicas y a su aplicación en diversos campos como salud humana, veterinaria y agricultura. En los últimos años, el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de rutas de biosíntesis de PNs microbianos ha aumentado enormemente como consecuencia del desarrollo de la ingeniería genética aplicada a microorganismos.

Es conocida la capacidad de muchas bacterias para generar productos bioactivos. De entre todas ellas, los actinomicetos representan el grupo de bacterias del que más se conoce su capacidad de producir tales productos bioactivos (antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, etc.). El estudio de genes biosintéticos de antibióticos ha revelado la presencia de agrupaciones génicas que contienen genes estructurales relacionados con la síntesis del antibiótico y genes no estructurales que están asociados con la regulación y la resistencia, ayudando en la supervivencia del microorganismo productor del antibiótico. Por otro lado, la secuenciación masiva de genomas bacterianos ha puesto de manifiesto que muchos grupos presentan un potencial oculto para la producción de nuevas moléculas bioactivas previamente desconocidas y determinadas por agrupaciones génicas silenciosas o crípticas. En concreto, los

actinomicetos, y en particular el género *Streptomyces*, entran dentro de esta categoría de potenciales productores de nuevas moléculas bioactivas.

La continua secuenciación de nuevos genomas de especies de *Streptomyces* está mostrando que estos poseen un enorme potencial llegando a contener más de 20 tipos de agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios, como policétidos, péptidos no ribosomales, terpenos, etc. (Nett *et al.*, 2009). Sin embargo, la gran mayoría de las agrupaciones génicas encargadas de producir estos metabolitos secundarios o no se expresan o apenas lo hacen en condiciones de laboratorio (Arakawa, 2018), por ello se les denomina silenciosas o crípticas, ya que su baja o nula expresión se debe a que necesitan unas condiciones muy concretas para activarse y alcanzar un nivel de expresión alto que permita la producción de los metabolitos cuya biosíntesis determinan.

Continuamente aparecen referencias acerca de la identificación de nuevos metabolitos producidos por diferentes especies de *Streptomyces*. Como ejemplo destacado y además esperanzador de cara al futuro de este campo de estudio de búsqueda de nuevos metabolitos secundarios recientemente se ha publicado un nuevo estudio en el que se ha identificado una cepa de *Streptomyces* que produce ácido nalidíxico (Arora *et al.*, 2018), un antibiótico que hasta ahora era de producción sintética. El ácido nalidíxico, estructuralmente englobado en la familia de las quinolonas, es activo frente a la mayoría de bacterias Gram-negativas (*Enterobacter spp., Escherichia coli, Morganella morganii*, etc.), fue descubierto en 1962 y empleado, en principio, para combatir infecciones del tracto urinario, pero con el paso del tiempo se le han ido encontrando nuevas aplicaciones no sólo en medicina, sino también en biología molecular, a la hora de hacer conjugaciones o de realizar aislamiento selectivo de actinomicetos para detener el crecimiento de bacterias Gram-negativas (Hane 1971; Mazodier *et al*. 1989).

2.2. Metodología tradicional

En los años 40 y 50 del s. XX hubo una enorme inversión por parte de las compañías biotecnológicas y farmacéuticas para desarrollar nuevas técnicas de cribado para la identificación de especies de actinomicetos, mejorar sus tasas de producción y aislar los compuestos naturales que estos producían. El *a priori* simple hecho de lograr que las bacterias crecieran en cultivos y que replicaran en condiciones de laboratorio el comportamiento y la producción de metabolitos que mostraban en la naturaleza ya fue un primer logro importante. Pero todo ese esfuerzo tanto humano como económico repercutió en una explosión de nuevos compuestos antibióticos como la eritromicina a partir de *Saccharopolyspora erythraea* (Eli Lilly, 1949) o la vancomicina a partir de *Amycolatopsis orientalis* (Eli Lilly, 1953). Además de nuevos antibióticos se lograron aislar compuestos naturales con funciones diferentes como rapamicina (Vézina *et al.*, 1975) o las estatinas (Endo, 1992) con actividad inmunomoduladora o anticolesterolémica, respectivamente.

La implementación de la secuenciación de ARN ribosomal (Olsen *et al.*, 1986) supuso una revolución en el campo ya que destapó una enorme diversidad de nuevos microbios no conocidos hasta entonces. Estudios en los que se combinaron perfiles 16S rRNA (Langer-Safer *et al.*, 1982) y cinéticas de reasociación de ADN (Torsvik *et al.*, 1990a, 1990b) mostraron cálculos

de los que se deducía que por cada gramo de muestra tomada en suelo había unas 10^5 especies bacterianas no cultivadas aún en laboratorio y además desenterró una vasta variedad de especies bacterianas únicas no cultivadas en ambientes marinos y termófilos (Britschgi y Giovannoni, 1991; Giovannoni *et al.*, 1990; Liesack y Stackebrandt, 1992; Ward *et al.*, 1990; Weller *et al.*, 1991).

A mediados de los años 90 del s. XX parecía que con la mejora de las técnicas de secuenciación que comenzaba a permitir la secuenciación de genomas bacterianos iba a haber una nueva explosión en cuanto al descubrimiento de nuevos compuestos naturales. Muchas empresas mejoraron las ya existentes librerías de productos químicos y PNs con cribados de alto rendimiento y con librerías de química combinatoria para suplementar las muestras en busca de nuevos metabolitos. Sin embargo, cada vez era más complicado encontrar nuevos productos naturales o derivados de estos y a finales de siglo las empresas farmacéuticas comenzaron a perder interés en el desarrollo de nuevos fármacos empleando esta vía, con lo que sus inversiones en este campo se redujeron drásticamente (Baker *et al.*, 2007).

En los últimos años, tanto la secuenciación masiva de genomas así como el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de rutas de biosíntesis de PNs microbianos ha aumentado enormemente como consecuencia del desarrollo de la ingeniería genética aplicada a microorganismos. Estudios metagenómicos han mostrado que aún queda por descubrir una ingente cantidad de péptidos no ribosomales (NRPs) y policétidos (PKs) y que la metagenómica pues ser verdaderamente útil para localizar interrelaciones de familias de genes y ambientes ricos donde encontrar agrupaciones génicas de NRPs y PKs desconocidos hasta ahora (Charlop-Powers *et al.*, 2015).

2.3. Minería genómica

Los primeros pasos dados en el estudio de rutas de biosíntesis de PNs por actinomicetos mostraron que los genes que determinaban su producción formaban agrupaciones en los genomas (Hopwood y Merrick, 1977; Martín y Liras, 1989). La aparición y desarrollo de diversas técnicas denominadas comúnmente *-ómicas* (genómica, transcriptómica, metabolómica, epigenómica, proteómica, etc.) abrieron posteriormente la posibilidad de llevar a cabo estudios bioinformáticos y genéticos inversos en cuanto a la biosíntesis de los posibles metabolitos generados (Zhou *et al*., 2011). De esta manera, gracias a esos avances ya es posible conocer en primer lugar el genoma completo de una especie, luego localizar agrupamientos génicos que determinen la potencial producción de un PN, estudiar individualmente la posible función de estos genes y finalmente predecir o proponer un producto final generado de acuerdo con la acción conjunta de todos los genes agrupados.

El mayor obstáculo que presentaban la gran mayoría de estas nuevas técnicas, sobre todo la secuenciación masiva, era el elevado coste que suponían, impidiendo en muchos casos llevarlo a cabo. Sin embargo, con el continuo descenso del precio de la secuenciación de ADN y su continuo avance y mejora han provocado ahora sí una revolución en la búsqueda de nuevos PNs. Cada vez se secuencia una mayor cantidad de genomas bacterianos y como ejemplo claro está el dato publicado en 2013 por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI,

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, MD, E.E.U.U.), que señala que durante ese año se depositaron en su base de datos una media de 500 secuencias diarias, la mayoría secuencias parciales (NCBI, 2013). El análisis bioinformático de esas secuencias muestra la existencia de una gran cantidad de agrupaciones génicas silenciosas o crípticas, incluso en cepas altamente estudiadas en cuanto a la química de los PNs conocidos que producen (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003).

La minería genómica añade una novedad a la búsqueda de PNs como es el hecho de poder realizar comparaciones bioinformáticas de múltiples secuencias con el fin de localizar genes que codifiquen enzimas involucrados en la biosíntesis de PNs de interés presentes en un genoma particular o en un conjunto de genomas secuenciados. Los estreptomicetos son considerados como un gran candidato para actuar como modelo en esta metodología ya que, como se ha descrito anteriormente, poseen un enorme potencial para la producción de PNs de diversa naturaleza. También cabe destacar que se considera que aún falta por encontrar el 97% de posibles productos naturales sintetizados a partir de actinomicetos de acuerdo con los estudios de su potencial génico (Duncan *et al*. 2015), lo cual da una idea clara del, *a priori*, enorme potencial biosintético que posee este género. Conforme aparecen nuevos estudios de minería genómica se confirma la presencia de genes o agrupaciones génicas con potencial de sintetizar nuevos metabolitos, aunque a la hora de conseguir obtener esos nuevos PNs se afronta el hecho de que una gran parte de estos clústeres se encuentran silenciados, lo que conlleva un nuevo reto como es el de desarrollar nuevas vías para conseguir su activación (Baltz 2011; Ye *et al*., 2017; Horbal *et al*., 2018). En la tabla 1 se muestran algunos de los metabolitos publicados recientemente cuyos genes o clústeres biosintéticos silenciosos fueron localizados mediante minería genómica en diferentes cepas de actinobacterias y para los que se identificaron o desarrollaron condiciones específicas de activación.

Un aspecto fundamental para la producción de metabolitos secundarios es la regulación de la expresión del clúster correspondiente. Los genes de biosíntesis de antibióticos pueden sufrir represión transcripcional por dos vías. La primera de ellas se debe a la unión de un represor transcripcional a su promotor, lo cual no permite el acceso por la ARN polimerasa y, por tanto, inhibe el comienzo de la transcripción. La segunda vía sería la que conlleva que el represor compite con un activador por su posición de unión afín dentro de la región promotora o cuando el represor se une en algún lugar aguas abajo del promotor, con lo que se impide la elongación del transcripto (Wohlleben *et al*., 2017). Se han identificado numerosos tipos de genes reguladores transcripcionales pertenecientes a las familias TetR, LysR, DeoR, GntR, o MarR (Martín y Liras, 2010; Álvarez-Álvarez *et al*., 2014; Lu *et al*., 2017; Botas *et al*., 2018), los cuales poseen en la mayoría de los casos encontrados a día de hoy una actividad represora sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios en estreptomicetos. La familia de los genes reguladores TetR es la más amplia de entre ellos (Romero-Rodríguez *et al.,* 2015). En las agrupaciones génicas estudiadas durante esta Tesis Doctoral predominan los genes reguladores transcripcionales del tipo TetR, LysR y GntR que, según la bibliografía, en la gran mayoría de los casos actúan como represores, aunque en casos menos habituales pueden ser activadores (Uguru *et al*., 2005) e incluso pueden tener una doble función represora/activadora dependiendo del tipo de ruta metabólica sobre las que actúe (Pompeani *et al*., 2008; Jiang *et al*., 2017).

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos descubiertos por medio de la minería genómica en diferentes estreptomicetos (tabla adaptada de Poorinmohammad y Hamedi, 2017)

Especie actinobacteria	Gen objetivo minería genómica	Metabolito/s	Bioactividad de metabolito/s	Referencia
Streptomyces coelicolor	Terpeno sintasa	(+)-*epi*-isozizaena	Antibiótico	Lin *et al*. (2006)
Streptomyces marokkonensis M10	PKS-1	Metabolitos poliénicos: PF1 y PF2	Antibiótico	Chen *et al*. (2016)
Salinispora pacifica CNT-133	*Cluster Sp_sal*	Salinosporamida K	Antineoplásico (inhibidor del proteasoma)	Eustáquio *et al*. (2011)
Streptosporangium sp. CGMCC 4.7309	*Cluster hex*	Hexaricinas A–C	-	Tian *et al*. (2016)
Streptomyces coelicolor	PKS-III	Germicidinas y isogermicidinas	Antibiótico (quelante de hierro)	Song *et al*. (2006)
Streptomyces coelicolor M145	NRPS CchH	Coelichelina	Antibiótico (quelante de hierro)	Lautru *et al*. (2016)
Streptomyces avermitilis	Terpeno sintasa (*sav*76)	Avermitilol	-	Chou *et al*. 2010
Salinispora arenicola CNP193	Esterasa	Esterasa SAestA	Enzima con gran estabilidad en presencia de solventes orgánicos	Fang *et al*. (2015)
Streptomyces albus J1074	Minería genómica general para metabolitos secundarios	Antimicinas, 6-*epi*-alteramidas, candicidinas, indigoidina y paulomycinas	Antifúngico - Antifúngico - Antibiótico	Olano *et al*. (2014)

En cuanto a la activación transcripcional de genes biosintéticos ésta puede producirse ya sea al unirse una señal apropiada a su regulador afín o debido a una activación directa por medio de una proteína activadora transcripcional. Por tanto, los activadores transcripcionales por lo general cumplen su función de dos formas posibles, o bien estabilizando el complejo ARN polimerasa-promotor o bien acelerando la transición del complejo abierto durante el comienzo de la transcripción (Romero-Rodríguez *et al.* 2015).

2.3.1. Secuencia genómica de *Streptomyces albus* J1074

Existen dos secuencias depositadas con el genoma completo de *S. albus* J1074, una de ellas más completa y mejorada con respecto a la anterior. La primera secuencia se encuentra accesible desde 2008 y fue depositada en el Broad Institute (Cambridge, MA, E.E.U.U.). Su número de acceso es **NZ_DS999645.1**, engloba un total de 6.813.830 pares de bases (contenido en guanina y citosina G-C del 73,2%), englobadas principalmente en el *supercontig* 3.1. Está conformada por 6067 genes que codifican para 5983 proteínas. Esta secuencia no está completa al cien por cien debido a que en ciertas regiones del genoma existen nucleótidos sin identificar. Años más tarde, en 2013, se publicó una nueva secuencia de esta especie en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, MD, E.E.U.U.), esta vez completa, depositada con el número de acceso **CP004370.1** (Zaburannyi *et al.*, 2014). El genoma completo de *S. albus* J1074 lo conforman 6,841,649 pb, con un contenido en G-C del 73,3%. Esta nueva secuencia es la que se ha utilizado durante esta tesis doctoral para los estudios bioinformáticos y de diseño para ensayos de ingeniería genética llevados a cabo, que complementan a los realizados anteriormente en el grupo (Olano *et al*., 2014; González *et al*., 2016), aunque para la nomenclatura de los genes estudiados se ha mantenido la empleada en la secuencia depositada en 2008 (*SSHG_*) que fue la utilizada en los trabajos previos sobre esta cepa.

S. albus J1074 presenta en su genoma al menos 27 agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Olano *et al*., 2014). En un primer análisis de la secuencia con el programa bioinformático AntiSmash 4.0 (Blin *et al.*, 2017) se localizaban 26 agrupaciones génicas biosintéticas. Sin embargo, al realizar un análisis más exhaustivo sobre cada una de las agrupaciones de manera individual se comprobó que existía un agrupamiento adicional que la aplicación bioinformática no era capaz de localizar e identificar como tal (Tabla 2), al cual se le denominó clúster 23.

Pudieron localizarse seis clústeres conteniendo genes que codifican sintetasas de péptidos no ribosomales, NRPS (clústeres *9,* 12, 13, 14, 21 y 27). En primer lugar, se observó la presencia del clúster 9, el cual presenta una alta homología con una agrupación génica presente en varias especies de estreptomicetos encargada de sintetizar el pigmento azul indigoidina. Acerca de esta agrupación génica se habla en profundidad en el apartado 3.1.1. de esta introducción. Por otro lado, las otras cinco agrupaciones génicas localizadas (clústeres 12, 13, 14, 21 y 27) únicamente la 13 y la 21 sí presentan un alto grado de homología con agrupaciones encargadas de sintetizar lipopéptidos, pese a que aún no se ha encontrado el producto final generado.

Tabla 2. Agrupaciones génicas del genoma de *S. albus* J1074 identificadas (tabla adaptada de Olano *et al.*, 2014).

Clúster	Gen inicio[a]	Gen final[a]	Tipo	Predicción producto final[a]
1	SSHG_0001	SSHG_00036	PKS I - NRPS	Desconocido
2	SSHG_00040	SSHG_00050	Lantipéptido	Lantibiótico clase II
3	SSHG_00051	SSHG_00053	PKS I - NRPS	Desconocido
4	SSHG_00054	SSHG_00069	PKS I - NRPS	Antimicinas
5	SSHG_00076	SSHG_00101	PKS I	Candicinas
6	SSHG_00144	SSHG_00155	PKS III	THN, flaviolina
7	SSHG_00244	SSHG_00268	Terpeno	Isorenierateno
8	SSHG_00271	SSHG_00271	Bacteriocina	Familia linocina M18
9	SSHG_00311	SSHG_00315	NRPS	Indigoidina
10	SSHG_00980	SSHG_00990	Ectoína sintasa	5-hidroxiectoina
11	SSHG_01746	SSHG_01756	Sideróforo	Desferrioxamina B
12	SSHG_01964	SSHG_02004	NRPS	Desconocido
13	SSHG_02468	SSHG_02510	NRPS	Surugamidas
14	SSHG_02783	SSHG_02815	NRPS	Desconocido
15	SSHG_03580	SSHG_03598	Lantipéptido	SAL-2242
16	SSHG_03731	SSHG_03731	Bacteriocina	Familia Lactococina 972
17	SSHG_03888	SSHG_03912	Lantipéptido	Lantibiótico clase I
18	SSHG_04343	SSHG_04344	Terpeno	Albaflavenona
19	SSHG_04630	SSHG_04630	Terpeno	Geosmina
20	SSHG_04857	SSHG_04868	Sideróforo	Desconocido
21	SSHG_04926	SSHG_04963	NRPS	Lipopéptido
22	SSHG_05166	SSHG_05175	Bacteriocina	Desconocido
23[b]	SSHG_05313	SSHG_05354	Desoxiazúcares	Paulomicinas
24	SSHG_05575	SSHG_05575	Bacteriocina	Desconocido
25	SSHG_05647	SSHG_05659	Terpeno	Hopeno
26	SSHG_05699	SSHG_05729	PKS I - NRPS	Macrolactamo tetramato policíclico
27	SSHG_05882	SSHG_05890	NRPS	Desconocido

a. Localización y productos hipotéticos basados en el análisis de la secuencia del genoma de *S.albus* J1074 mediante antiSMASH y análisis individuail mediante BLAST de genes seleccionados.

b. *Cluster* 23 no identificado mediante análisis antiSMASH si no mediante el análisis individual de sus genes con la herramienta BLAST.

Por otra parte, se encontraron dos agrupaciones (clústeres 5 y 6) de tipo policétido sintasa (PKS). El clúster 5 contiene genes de PKS tipo I (Olano *et al*., 2014) y tiene un alto grado de homología con agrupaciones presentes en otras especies de *Streptomyces* dedicadas a sintetizar FR-008-candicidinas como *S. griseus* IMRU 3570, *Streptomyces sp*. FR-008 y *Streptomyces sp.* S4 (Campelo y Gil, 2002; Chen *et al*., 2003; Seipke *et al*., 2011), un compuesto poliénico. Por su parte el clúster 6, de tipo PKS-III, también presenta una alta homología con otras especies de *Streptomyces* como *S. coelicolor* A3(2) (Nett *et al*., 2009), su producto final de biosíntesis es tetrahidroxinaftaleno y su producto de oxidación flavolina (Izumikawa *et al*., 2003).

También se localizaron cuatro clústeres identificados como híbridos PKSI-NRPS (clústeres 1, 3, 4 y 26). En principio, de acuerdo con los genes que conforman los clústeres 4 y 26 estos se tratarían de agrupaciones encargadas de la biosíntesis de compuestos antifúngicos. Al analizar los resultados dados por Antismash el clúster 4 no se localiza de forma individual, ya que la aplicación bioinformática lo engloba junto con su clúster contiguo, el clúster 5, como si ambos fueran una única agrupación. Sin embargo, mediante un minucioso análisis de su secuencia se observó que eran dos agrupaciones independientes (Olano et al., 2014). Este clúster presenta un alto grado de homología con agrupaciones localizadas en otras especies de *Streptomyces* como *Streptomyces* S4*, Streptomyces ambofaciens* y otros estreptomicetos (Seipke *et al*., 2011; Yan *et al*., 2012; Aigle *et al*., 2013) y su producto final es una familia de compuestos antifúngicos llamados antimicinas. El clúster 26 guarda gran homología con otro presente en *Lysobacter enzymogenes*, que sintetiza un antifúngico termoestable (Yu *et al*., 2007). Para las dos agrupaciones génicas de este tipo restantes no se ha encontrado homología en otras especies ni tampoco predicciones bioinformáticas en cuanto al producto final que pudieran producir.

Como ya se ha indicado anteriormente, el clúster 23 no se localiza realizando un análisis general de la secuencia de *S. albus* J1074 con AntiSmash. Sin embargo, realizando un estudio pormenorizado e individual dentro de las secuencias de cada uno de los clústeres obtenidos en busca de algún indicio de localizar genes capaces de producir metabolitos secundarios glicosilados logró identificarse esta agrupación génica (Olano *et al*., 2014) *a priori* con capacidad de biosintetizar 6-deoxihexosas y transferirlas a un aglicón mediante glicosiltransferasas (presentes en el agrupamiento). Como posteriormente se demostró esta agrupación determina la producción de antibióticos glicosilados denominados paulomicinas (Olano *et al*., 2014; González *et al*., 2016).

En cuanto a los clústeres restantes localizados en el genoma de *S. albus* J1074 existe una diversidad funcional en cuanto a su producción de metabolitos. Los clústeres 2, 15 y 17 son del tipo lantipéptido; los clústeres 7, 18, 19 y 25 del tipo terpeno (también localizados en *S. coelicolor* A3(2) y *S. avermitilis* MA-4680 (Craney *et al*., 2013; Ikeda *et al*., 2003); los agrupamientos 8, 16, 22 y 24 del tipo bacteriocina; el clúster 10 determinaría la producción de ectoínas; por último, hay dos clústeres de sideróforos, el 11 que se encuentra bastante conservado en varias especies de *Streptomyces* y biosintetiza desferrioxamina B y en el caso del 20 su producto final aún es desconocido aunque también está conservado en varios estreptomicetos.

2.3.2. Identificación de los compuestos codificados por clústeres de biosíntesis crípticos

De todos los agrupamientos génicos de *S. albus* J1074 se han identificado a día de hoy los metabolitos determinados por 5 de ellos que corresponden a un pigmento (indigoidina), dos familias de compuestos antifúngicos (candicidinas y antimicinas), una familia de compuestos con actividad antibiótica (paulomicinas) y un compuesto citotóxico y antifúngico (6-*epi*-alteramida A). Los productos determinados por los 22 agrupamientos génicos restantes son por el momento desconocidos.

Como ocurre en todos los estreptomicetos en estudio, gran parte de los agrupamientos génicos presentes en *S. albus* J1074 permanecen silenciosos en condiciones habituales de crecimiento en el laboratorio o bien se expresan pobremente dificultando la identificación del producto críptico que determinan. Para hallar los compuestos correspondientes a estos agrupamientos génicos silenciosos se requiere la manipulación genética del microorganismo para activar específicamente su expresión, bien de forma directa o bien a través de la sobreexpresión de activadores de la transcripción específicos de cada ruta.

2.4. Activación o incremento de la producción de metabolitos secundarios crípticos

En nuestro grupo tradicionalmente se han venido realizando trabajos en los que se trata de activar genes o agrupamientos génicos que en condiciones de laboratorio se encuentran silenciados y/o de los cuales se desconoce su producto, denominados crípticos. Para ello se han empleado diversas técnicas como las descritas en apartados anteriores. En Olano *et al*., 2014 se detalla cómo se lograron activar en *S. albus* J1074 cinco clústeres silenciados o con bajo nivel de expresión: uno PKS-I (candicidina), dos péptidos híbridos PKS-NRPS (antimicinas y 6-*epi*-alteramidas), uno NRPS (indigoidina) y también compuestos glicosilados (paulomicinas). Esas activaciones se consiguieron siguiendo diferentes estrategias, como la inserción de un promotor fuerte y constitutivo frente a los genes seleccionados de dos grupos, con lo que se consiguió activar la producción del pigmento azul indigoidina y de dos nuevos miembros de la familia de las macrolactamas tetramato policíclicas (6-*epi*-alteramidas A y B). Mediante la estrategia de sobreexpresar genes reguladores positivos también se logró activar la biosíntesis de 6-*epi*-alteramidas. La tercera estrategia empleada fue la expresión heteróloga del gen regulador *pimM* del clúster de pimaricina en *S. natalensis* (Olano *et al.,* 2014), lo que activó la producción simultánea de candicidinas y antimicinas sugiriendo una regulación cruzada entre ambos agrupamientos de biosíntesis como más tarde se demostró (McLean *et al*., 2016).

Otras aproximaciones de utilidad que han sido exploradas en este trabajo para la activación de clústeres silenciosos se detallan a continuación.

2.4.1. Método OSMAC (One Strain – Many Compounds)

Este método consiste en aplicar variaciones en las diferentes condiciones del cultivo como pueden ser medio de cultivo, temperatura de crecimiento, velocidad de agitación, etc. (English *et al.*, 2016) y comprobar para cada caso si alguno de esos cambios o la combinación de

alguno de ellos suponen un cambio en la pauta de producción normal de un microorganismo lo cual desemboque en la biosíntesis de algún nuevo compuesto por parte de la cepa en estudio (Bode *et al*., 2002).

En el caso de esta tesis doctoral los cambios en las condiciones de cultivo se basaron principalmente en utilizar diferentes medios de cultivos, de manera que si las diferentes composiciones de éstos producían una variación en la expresión génica esto podría suponer la activación de alguno de los cuatro clústeres de interés en la cepa, pudiendo derivar en una consecuente activación de su maquinaria biosintética y aparición de nuevos compuestos cuyo potencial bioactivo podría estudiarse**.**

2.4.2. Suplementación de medios de cultivo con elicitores químicos

Otra estrategia seguida para tratar de activar o mejorar la producción de determinados productos naturales en actinomicetos consiste en suplementar los medios de cultivo con moléculas químicas (naturales o sintéticas) que consigan activar la expresión de un gen o un agrupamiento génico. A estas moléculas químicas activadoras se les suele denominar por su término en inglés *elicitor*.

Los esfuerzos iniciales para intentar obtener nuevos metabolitos activando los genes que los sintetizan se centraban casi exclusivamente en alterar la expresión mediante la substitución de promotores nativos por promotores constitutivos en la cepa de estudio o bien en transferir mediante expresión heteróloga uno de estos grupos de genes biosintéticos en una cepa hospedadora. Sin embargo, en los últimos años se están buscando nuevas vías alternativas entre las que destaca la de estudiar las moléculas implicadas en la activación de los genes biosintéticos para emplearlas en su forma natural o buscando análogos sintéticos en la activación de agrupaciones que permanezcan silenciadas (Wohlleben *et al*., 2017).

Los antibióticos han destacado en estos estudios como las principales señales para la inducción de grupos de genes silenciados. En la mayoría de los casos si se emplean en altas concentraciones matan a las cepas bacterianas, pero empleando concentraciones más bajas, subinhibitorias, se produce una activación global del metabolismo secundario al inducir la expresión de grupos de genes biosintéticos (Seyedsayamdost, 2014). Existen numerosos ejemplos al respecto como la promomicina, un antibiótico poliéter estructuralmente similar a la lonomicina, que se identificó como activador de la producción de un nuevo antibiótico denominado SF2768 al realizar un ensayo en el que se hacía interaccionar la cepa *Streptomyces sp.* 153 (productora de promomicina) frente a la cepa *Streptomyces sp*. 574 (Amano *et al*. 2010). En este ensayo además se pusieron de manifiesto las propiedades horméticas de ciertos antibióticos (Figura 6), que consiste en que a bajas concentraciones desempeñan un papel activador para la producción de otros antibióticos, mientras que a altas concentraciones desarrollan propiedades antibacterianas (Davies *et al*., 2006).

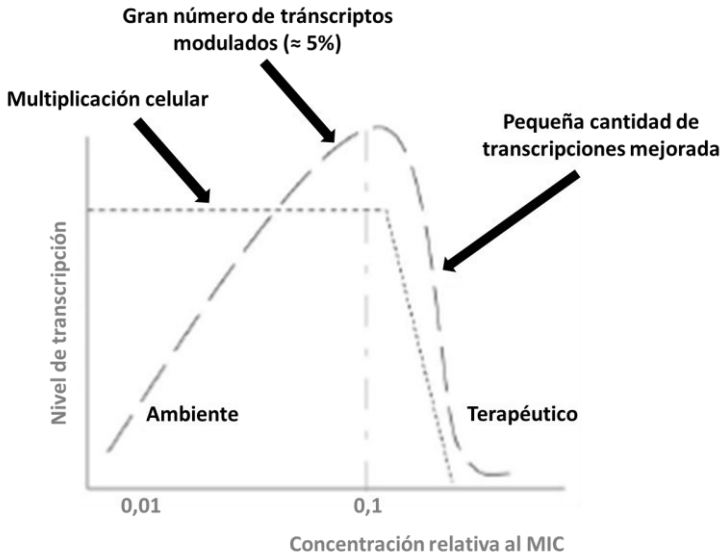


Figura 6. Efectos horméticos de los antibióticos. En la figura se muestran los cambios en la traducción global relacionada con la inhibición del crecimiento (multiplicación celular) así como que la concentración de antibióticos aumenta desde subinhibitoria a inhibitoria. De la gráfica puede entenderse que las concentraciones más bajas podrían representar a las condiciones ambientales y las concentraciones más altas a las terapéuticas (imagen modificada de Davies *et al*., 2006).

También se ha estudiado en profundidad el efecto de otros productos químicos en la activación de agrupaciones génicas biosintéticas y se ha comprobado que variando las concentraciones empleadas puede haber cambios muy significativos en este efecto activador (Pettit, 2010). Algunos de los elicitores químicos empleados que han demostrado su eficacia son, por ejemplo, el DMSO (Chen *et al*., 2010), N-acetil glucosamina (Rigali *et al*., 2008), tierras raras como lantano y escandio (Tanaka *et al*., 2010), moléculas pequeñas como etanol (Pettit, 2010) o aminoácidos como el triptófano (Palazzotto *et al*., 2015).

3. Cuantificación de la expresión génica

Como se ha explicado en otros apartados, un gran porcentaje de los agrupamientos génicos biosintéticos identificados a día de hoy se encuentran silenciados en condiciones de laboratorio. Por ello, comprender los mecanismos que controlan la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios puede abrir una vía para encontrar nuevos compuestos bioactivos de interés y ayudar a crear nuevas cepas superproductoras.

Es por esto que hay una necesidad de sistemas testigo que permitan el estudio y cifrado de la expresión de genes por sus promotores bajo diferentes condiciones y en presencia o ausencia de diversas proteínas reguladoras y otros elementos de control (Horbal y Luzhetskyy, 2017). Por ejemplo, la aplicación del LacZ de *E. coli* como sistema testigo, el cual permite una fácil observación y cuantificación, revolucionó el campo de la evaluación de la expresión génica en procariotas. Sin embargo, ensayos donde se pretendió usarlo como testigo en actinobacterias fallaron porque la mayoría presentan una actividad beta-galactosidasa endógena bastante alta, y los mutantes que se vieron privados de esta actividad presentaban defectos pleiotrópicos (Eckhardt *et al.,* 1987). Se encontraron otras alternativas que hicieran factible este tipo de

sistemas en actinobacterias, cada uno de ellos con sus pros y sus contras, como EGFP, RFP, GusA, MelC, XylE, BpsA, RppA, Amy, Neo y Cat (Tabla 3).

Tabla 3. Genes testigo probados en actinobacterias (tabla modificada de Horbal y Luzhetskyy, 2017).

Gen testigo	Descripción	Fuente
gusA	Codifica para la beta-glucuronidasa, realiza la conversión de beta-glucurónidos en productos cromogénicos, quimioluminiscentes o fluorescentes. Se puede aplicar para evaluación cuantitativa y visual de la expresión génica en medios sólidos y líquidos. Requiere sustrato.	*E. coli*
bpsA	Codifica para la péptido sintetasa no ribosomal responsable de la biosíntesis de un pigmento azul-indigoidina. Puede ser aplicado para la evaluación cuantitativa y visual de la expresión génica en medios sólidos y líquidos. No requiere la adición de ningún sustrato; sin embargo, depende de la presencia endógena de triptófano.	*S. aureofaciens*
egfp	Codifica la proteína de fluorescencia verde mejorada. Puede ser detectado *in vivo* e *in vitro*. El sistema se caracteriza por fotoblanqueo y alto fondo debido a un alto nivel de autofluorescencia en actinobacterias miceliales. *In vivo* la cuantificación no es posible.	*Jellyfish Aequorea victoria*
mRFP	Codifica para la proteína de fluorescencia roja monomérica. Puede ser detectado *in vivo* e *in vitro*. La cuantificación *in vivo* no es posible.	*Discosoma* sp.
luxAB	Codifica para las subunidades α y β de un enzima luciferasa heterodímero. Esta enzima cataliza la oxidación de aldehídos de cadena larga y de flavinas mononucleótidas reducidas. Un requerimiento para el sistema es la adición del sustrato-n-aldehído decanal. Puede ser detectado *in vivo* e *in vitro*. Medida cuantitativa *in vivo* posible.	*Vibrio harvei*
luxABCDE	Codifica para las subunidades α y β de un enzima luciferasa heterodímero y para las proteínas que producen un tetradecanal que es un sustrato para la enzima. El sistema es muy sensible; el enzima es rápidamente degradable lo que permite la investigación temporal de la expresión génica. Sin embargo, la reacción enzimática es dependiente de las reservas de ácidos grasos, que varían en diferentes condiciones de crecimiento.	*Photorhabdus luminescens*
rppA	Codifica para policétido sintasa tipo III que es responsable de la producción de 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno que se oxida espontáneamente a quinona flaviolina de color rojo oscuro. La evaluación visual de la expresión génica, así como la medición cuantitativa espectrofotométrica son posibles. El sistema tiene baja sensibilidad y depende del grupo de malonil-CoA en la célula.	*Sacch. erythraea*
amy	Codifica para la α-amilasa que está involucrada en la digestión del almidón. Evaluación visual de la expresión génica y medición cuantitativa espectrofotométrica posibles. Baja sensibilidad.	*Streptomyces griseus*
xylE	Codifica catecol 2,3-dioxigenasa. Requiere sustrato catecol. Puede ser detectado *in vivo* e *in vitro*. Baja sensibilidad.	*Pseudomonas putida*

melC	Codifica el operón de tirosinasa involucrado en la biosíntesis de melanina Puede ser detectado *in vivo* e *in vitro*. Baja sensibilidad.	*S. glaucescens*
neo	Codifica la aminoglucósido fosfotransferasa que confiere resistencia a neomicina/kanamicina. La actividad puede ser detectada *in vivo* e *in vitro*. Baja sensibilidad.	Tn5
cat	Codifica para cloranfenicol acetiltransferasa de Tn9. Resistencia a cloranfenicol. Baja sensibilidad.	Tn9

Un método recientemente desarrollado consiste en la utilización del pigmento azul indigoidina sintetizado por el producto de un gen que en el caso de *S. albus* J1074 es SSHG_00313 (*Blue-pigment synthetase*). Análogos de este gen se han empleado para insertarlo bajo el control de promotores que en caso de que se estén expresando provocan la expresión de éste con la consiguiente aparición de una coloración azul debida a la producción de indigoidina, lo cual representa una manera visual de comprobar si está habiendo expresión o no *in vivo*. Los primeros sistemas testigo de este tipo se llevaron a cabo en *E. coli* para detectar fosfopanteteina transferasas de librerías metagenómicas (Owen *et al*., 2012). También se ha empleado la indigoidina sintetasa como sistema testigo cuantificable tanto en *E. coli* como en células de mamífero (Müller *et al*., 2012). Sin embargo, pese a que se ha observado que varios estreptomicetos tienen la capacidad de generar indigoidina, no se había empleado la indigoidina sintetasa como sistema testigo para *Streptomyces*, hasta que recientemente se han publicado trabajos utilizando indigoidina sintetasas de diferentes orígenes para medir y cuantificar la expresión génica en *Streptomyces*, por ejemplo, el gen *bpsA* de *S. aureofaciens* CCM3239 (Novakova *et al*., 2010; Knirschova *et al*., 2015) o el gen *idgS* de *S. lavendulae* CGMCC 4.1386 (Li *et al*., 2015).

Además de un sistema visual en medio sólido este testigo se puede utilizar para realizar ensayos en medio líquido (Müller et al., 2012). En estos casos el objetivo es, tras retirar el micelio por centrifugación, cuantificar la cantidad de indigoidina generada presente en el medio líquido, teniendo así una forma de baremación del nivel de expresión. No obstante, este sistema de cuantificación presenta varios problemas asociados. En primer lugar, la indigoidina no es muy soluble en agua y por ello precipita fácilmente, complicando la cuantificación al tener que utilizar solventes en los que mejore su solubilidad, aunque los resultados obtenidos hasta ahora no han sido todo lo buenos que podría esperarse. Por otro lado, no toda la indigoidina se secreta al medio extracelular, así que se necesita aplicar un proceso de ruptura celular para tratar de extraerla.

En publicaciones previas de nuestro grupo se observó, estudiando el genoma de *S. albus* J1074, que éste posee una agrupación de genes de biosíntesis capaz de sintetizar indigoidina (Olano *et al*., 2014). Se demostró que, aunque en condiciones de laboratorio la cepa silvestre no produce indigoidina ya que el clúster encargado de su síntesis se encuentra silenciado, al insertar delante del gen SSHG_00313 un promotor constitutivo fuerte como *ermE*p* (promotor del gen de resistencia a eritromicina) se logra una activación del gen SSHG_00313 apareciendo el característico color azul de indigoidina.

3.1. Indigoidina

La primera referencia sobre la producción de un pigmento azul por parte de bacterias fue a finales del s. XIX (Claessen, 1890). Unos años más tarde el científico israelí Benjamin Elazari Volcani fue el primero en aislar este pigmento y le proporcionó el nombre de indigoidina (Elazari-Volcani, 1939) y aún tuvieron que pasar tres décadas más para que se conociera su naturaleza química (Kuhn *et al.*, 1965), donde se mostró que pertenece al grupo de pigmentos 3,3'-bipiridilo.

La indigoidina [5,5´-diamino-4,4´-dihidroxi-3,3´-diazadifenoguinona-(2,2´)] es un pigmento azul que posee propiedades antioxidativas y antimicrobianas producido por diversas bacterias. El gen implicado en la biosíntesis de indigoidina (indigoidina sintetasa) fue descrito por primera vez en la cepa bacteriana patógena *Erwinia chrysanthemi sp*. 3937 (Reverchon *et al*. 2002) y la ruta de biosíntesis propuesta se muestra en la figura 7.

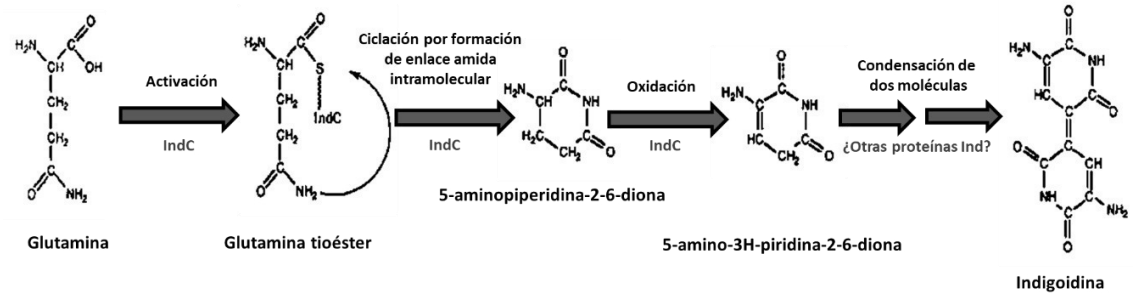


Figura 7. Modelo propuesto para la biosíntesis de la indigoidina. Debido la NRPS monomodular (IndC) se produce una activación de glutamina que da lugar a su tioéster. Entonces la glutamina se cicla debido a la formación de un enlace amida intramolecular. La molécula resultante, 5-aminopiperidina-2,6-diona, es deshidrogenada posiblemente por el dominio de oxidación de IndC para dar lugar a 5-amino-3H-piridina-2,6-diona. La condensación de dos de estas moléculas por otra proteína Ind terminaría generando indigoidina. Imagen modificada de Reverchon *et al.* (2002).

3.1.1. Estudio del clúster de indigoidina (9) de *S. albus* J1074

La agrupación génica 9 del genoma de *S. albus* J1074, denominada así por la posición en que aparece al hacer un análisis bioinformático en la aplicación AntiSmash, tiene un tamaño de aproximadamente 7,8 kb y está compuesto por 6 genes que, de acuerdo a la secuencia depositada por el Broad Institute, coinciden con los genes SSHG_00311 al SSHG_00316 (Figura 8). Las características generales de cada uno de ellos aparecen en la tabla 4.

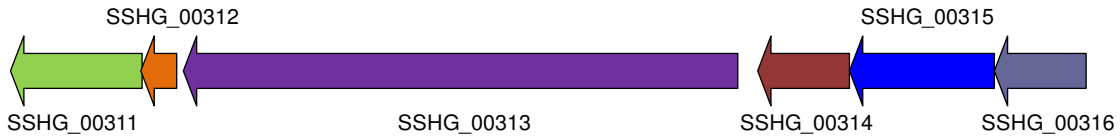


Figura 8. Organización de los genes en el agrupamiento génicos encargado de la síntesis de indigoidina.

Tabla 4. donde se muestran los genes que conforman el clúster biosintético de indigoidina y las características principales de cada uno de ellos.

Gen	Función	Posición	Tamaño	Hebra
SSHG_00311	Enzima posiblemente implicado en la biosíntesis de indigoidina	1 - 942	942	-
SSHG_00312	Proteína hipotética	939 - 1193	255	-
SSHG_00313	NRPS de biosíntesis de indigoidina	1247 - 5221	3975	-
SSHG_00314	Hidrolasa	5357 - 6020	663	-
SSHG_00315	Permeasa de transportador ABC	6017 - 7060	1044	-
SSHG_00316	Fosforibosil uracilo transferasa	7057 - 7719	645	-

El clúster implicado en la biosíntesis de indigoidina de *S. albus* J1074 presenta análogos en otros microorganismos incluidos estreptomicetos como, por ejemplo, *S. clavuligerus* o *S. lavandulae* que cuentan con los genes necesarios para producirla (Ceniceros, 2017). Sin embargo, existen diferencias en todas estas agrupaciones en cuanto a qué genes la conforman y también en cuanto a la posición que ocupan en el cromosoma (Figura 9). Esto último ocurre sobre todo si se toma como eje central del clúster al gen que codifica la NRPS responsable de biosintetizar indigoidina (SSHG_00313) y se observa qué genes se encuentran a su alrededor y cómo se distribuyen, ya que para cada especie se organizan de un modo particular.

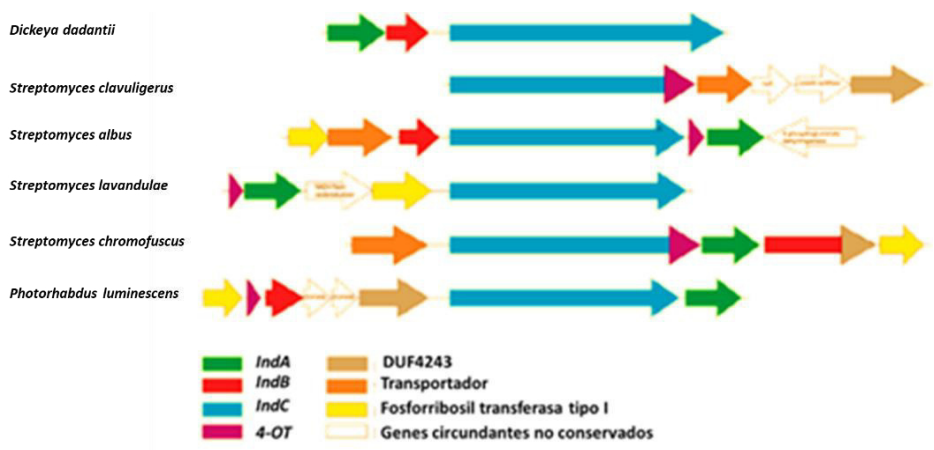


Figura 9. Comparativa de genes que componen agrupaciones génicas para la formación de indigoidina en diferentes especies bacterianas (imagen modificada de Ceniceros, 2017).

A lo largo de los últimos años se están encontrando genes con capacidad de sintetizar indigoidina en varias especies de estreptomicetos y, pese a no permanecer totalmente conservados, poseen un grado de homología considerable entre ellos (Li *et al*., 2015; Pait *et al*., 2017).

Objetivos

Objetivos

- ✓ Análisis bioinformático del genoma de *Streptomyces albus* J1074 y localización de agrupamientos génicos silenciosos.
- ✓ Activación de los agrupamientos génicos silenciosos mediante la manipulación genética de genes biosintéticos y reguladores.
- ✓ Caracterización estructural de los productos determinados por los agrupamientos génicos activados.
- ✓ Análisis de la actividad biológica de los productos identificados.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos

En la siguiente tabla, se muestran los microorganismos utilizados durante la realización del presente trabajo, así como su genotipo y procedencia:

Tabla 5. Microorganismos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral.

MICROORGANISMO	CEPA	GENOTIPO/CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Escherichia coli	**DH10B**	F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L *nup*G λ–	INVITROGEN
Escherichia coli	**DH5α**	F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-	INVITROGEN
Escherichi coli	**ET12567 (pUB307)**	F- *dam*-13::Tn9 *dcm*-6 *hsdM hsdR zjj*-202::Tn10 *recF*143 *galK2 galT22 ara*-14 *lacY*1 *xyl*-5 *leuB6 thi*-1 *tonA*31 *rpsL*136 *his*G4 *tsx*-78 *mtl*-1 *glnV*44	Kieser *et al.*, 2000
Streptomyces albus	**J1074**	ilv-1, sal-2, RM- productor de paulomicinas	Chater and Wilde, 1976
Streptomyces albus	**ΔB29**	Δ(plm17-18)::*aac(3)IV* Derivado de J1074, no productor de paulomicinas	Olano *et al.*, 2014
Streptomyces albus	**ΔAnt**	Δ(sshg_00055-00058)::*aac(3)IV* Derivado de J1074, no productor de antimicinas	Dra. Aranzazu González (Datos no publicados)
Streptomyces albus	**ΔCand**	Δ(sshg_00090-00100)::*aac(3)IV* Derivado de J1074, no productor de candicidinas	Dra. Aranzazu González (Datos no publicados)
Staphylococcus aureus		Utilizado en bioensayos	ATCC (BAA-1747)
Staphylococcus epidermidis		Utilizado en bioensayos	
Escherichia coli		Utilizado en bioensayos	
Klebsiella pneumoniae		Utilizado en bioensayos	
Candida albicans		Utilizado en bioensayos	ATCC (32077)

2. Plásmidos

Durante el desarrollo de este trabajo se han usado vectores con origen de replicación de *Streptomyces* y vectores con origen de replicación de *E. coli.*

Tabla 6. Plásmidos utilizados durante esta Tesis Doctoral.

Vector	Tamaño (kb)	Huésped	Antibiótico de selección	Referencia
pCR®-Blunt	3,5	*E. coli*	Kanamicina	Invitrogen
pEFBAoriT	5,4	*E.coli* *Streptomyces*	Apramicina	Horna *et al.*, 2011
pOJ260	3,5	*E. coli* *Streptomyces*	Apramicina	Bierman *et al.*, 1992
pOJ260p	3,7	*E. coli* *Streptomyces*	Apramicina	Olano *et al.*, (2004)
pSET152Ec	6	*E. coli* *Streptomyces*	Apramicina	Dra. Carolina Cano-Prieto (datos no publicados)
pEM4T	8,5	*E.coli* *Streptomyces*	Ampicilina Tioestreptona	Menéndez *et al.*, 2006
pUK21	3,1	*E. coli*	Kanamicina	Vieira y Messing, 1991
pUO9090	4,6	*E. coli*	Apramicina	Peláez *et al.*, 2001
pSETEcH	6,7	*E. coli* *Streptomyces*	Higromicina	Dr. Ignacio Montero (datos no publicados)
pSETeTc	6,7	*E. coli* *Streptomyces*	Ampicilina Tioestreptona	Cano-Prieto *et al.*, 2015 Fuente de *tsr* (PCR)
pLHyg	4.2	*E. coli* *Streptomyces*	Higromicina Ampicilina	Olano *et al.*, (2004) Fuente de Hyg (digestión)

3. Productos químicos

Los productos químicos empleados en la elaboración de medios de cultivos, tampones y reactivos en general fueron adquiridos en las siguientes firmas comerciales: VWR, Fermentas, Sigma Aldrich, Roche, Probus, Difco, Chemie y Oxoid.

4. Enzimas

Los enzimas de restricción, la lisozima, la proteinasa K, la fosfatasa alcalina, las ADN polimerasas DreamTaq, Herculase II y Terra, la ARNasa y la ADN ligasa del fago T4, así como sus respectivas disoluciones tampón y/o aditivos necesarios para su correcto funcionamiento

fueron suministrados por las casas comerciales Takara, New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific, Agilent Technologies, Clontech, Sigma-Aldrich e Invitrogen.

La ARNasa se preparó disolviendo una solución 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. Tras dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente, la solución se almacenó a -20°C.

5. Antibióticos

En la siguiente tabla se muestran los antibióticos empleados, tanto solos como combinados entre sí, en el transcurso de este trabajo:

Tabla 7. Antibióticos utilizados en la realización de este trabajo.

Antibiótico	Solvente	Concentración stock (mg/ml)	Concentración trabajo (mg/ml)	Referencia
Apramicina (Am)	Agua destilada	200	25	SIGMA
Ampicilina (Ap)	Agua destilada	100	100 (*E. coli*) 25 (*Streptomyces*)	ROCHE
Higromicina B (Hyg)	PBS	50	200	ROCHE
Kanamicina (Km)	Agua destilada	50	50 (*E. coli*) 10 (*Streptomyces*)	ROCHE
Ácido nalidíxico (Nal)	NaOH 0,5N	25	50	ROCHE
Cloranfenicol (Cm)	Etanol absoluto	50	25	SIGMA
Tetraciclina (Tet)	Etanol 70%	20	10	ROCHE
Tioestreptona	DMSO	25	25 (medio sólido) 5 (medio líquido)	SIGMA

6. Métodos microbiológicos

6.1. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se presentan en su composición para su forma líquida; para su forma sólida se añadió la cantidad de agar estipulada para cada caso.

6.1.1. Medios de cultivo empleados para *E. coli*

- **Medio LB** (Miller, 1972): medio líquido empleado para crecimiento de *E. coli* y poder extraer su ADN plasmídico.
  - **Composición:** 5 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 5 g/L NaCl; 1 g/L glucosa; pH 7,0. Añadiendo agar al 2% se obtiene la forma sólida del medio, denominado **medio LA**.

- **Medio 2xTY** (Sambrook *et al.*, 1989): medio líquido empleado para crecimiento de *E. coli* y llevar a cabo la conjugación con *Streptomyces*.
  - **Composición:** 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura) y 5 g/L NaCl. Añadiendo agar al 2% se obtiene la forma sólida del medio, denominado **2xTY sólido**.

6.1.2. Medios de cultivo empleados para *Streptomyces*

- **Medio A** (Fernández *et al.*, 1998): medio sólido empleado para crecimiento y esporulación de *Streptomyces* para conjugación y para obtención de esporas.
  - **Composición:** 21 g/L MOPS; 5 g/L glucosa; 0,5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L extracto de carne, 1 g/L casaaminoácidos, ajustar a pH 7,0 con KOH antes de autoclavar. Cuando se emplea para conjugar se recomienda añadir 10ml/L de $MgCl_2 \cdot 6H2O$ para optimizar el proceso (Kieser *et al.*, 2000).

- **Medio MS** (Hobbs *et al.,* 1989)**:** medio sólido empleado para crecimiento y esporulación de *Streptomyces* para conjugación**.**
  - **Composición:** 20 g/L manitol, 20 g/L harina de soja y 20 g/L agar. Cuando se emplea para conjugar se recomienda añadir 1,2 ml/100ml de CaCl2 (5M) (Wang y Jin, 2014) después de autoclavar el medio de cultivo.

- **Medio Bennet** (Locci *et al.*, 1969): medio sólido óptimo para la esporulación de *S. albus* J1074.
  - **Composición:** 2 g/L triptona, 10 g/L glucosa, 1 g/L peptona y 1 g/L extracto de levadura.

- **Medio R5A** (Fernández *et al.*, 1998): medio empleado para producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 103 g/L sacarosa, 21 g/L MOPS, 10 g/L glucosa, 0,1 g/L casaaminoácidos, 5 g/L extracto de levadura, 0,25 g/L K_2SO_4, 10,12 g/L $MgCl_2 \cdot 6H2O$ y 2 ml/L de solución de oligoelementos. Ajustar a pH 6,8 con KOH antes de autoclavar. Añadiendo 25 g/l de agar se obtiene la forma sólida del medio, denominado **R5A sólido**.

- **Medio TSB** (*Tryptone Soy Broth*, Merck): medio líquido comercial empleado para el crecimiento de *Streptomyces* en preinóculos de cultivos y para la obtención de ADN cromosómico.
  - **Composición:** 30 g/L caldo CASO®; ajustar a pH 7,0. Añadiendo agar al 2% se obtiene la forma sólida del medio, denominado **TSA**. En ensayos de actividad antibiótica se utiliza **TSA½**, que sólo contiene 1% de agar, para una mejor difusión de los compuestos de ensayo.

- **Medio MFE** (González *et al.*, 2016)**:** medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 21 g/L MOPS, 0,6 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 3,5 g/L K_2HPO_4, 10 g/L glucosa, 0,2 g/L extracto de levadura, 5 mg/L $CaCl_2$, 1 mg/L $MnCl_2$, 1 mg/L $ZnSO_4$, 5 mg/L $FeSO_4$ y 5 g/L harina de soja.

- **Medio Gauze** (ATTC, medium 531): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 1 g/L KNO_3, 0,5 g/L K_2HPO_4, 0,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 g/L NaCl, 0,01 g/L $FeSO_4$, 20 g/L almidón soluble. Añadiendo 30 g/l de agar se obtiene la forma sólida del medio, denominado **Gauze sólido**.

- **Medio SM** (Zhang *et al.,* 1992)**:** medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición** (para 800mL de cultivo): 8 g glucosa, 3,2 g extracto de levadura, 3,2 g peptona, 3,2 g K_2HPO_4, 1,6 g KH_2PO_4, 0,4 g $MgSO_4$ y 82,4 g sacarosa. Ajustar a pH 7 con KOH antes de autoclavar.

- **Medio GS** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 20 g/L glucosa, 2 g/L $CaCO_3$, 10 g/L peptona de soja. pH natural.

- **Medio SM1** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 10 g/L Arkasoy (harina de soja), 18 g/L glucosa, 1 g/L Na_2SO_4 (anhidro) y 0,2 g/L $CaCO_3$. pH natural

- **Medio SM4** (Becerril *et al.,* 2018): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 2,5 g/L glucosa, 25 g/L MD30E maltodextrinas, 12,5 g/L Arkasoy (harina de soja), 1,5 g/L melaza de remolacha, 0,125 g/L KH_2PO_4, 1,25 g/L $CaCO_3$ y 21 g/L MOPS. Ajustar pH a 6,5 con KOH.

- **Medio SM5** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 20 g/L peptona, 8 g/L extracto de carne, 15 g/L glucosa, 10 g/L glicerol y 0,4 g/L $CaCO_3$. Ajustar pH a 7,2 con KOH.

- **Medio SM6** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 40 g/L Corn Steep Liquor, 20 g/L MD30E maltodextrinas, 2,5 g/L NaCl, 0.5 g/L $MgSO_4$. Ajustar pH a 7,0 con KOH.

- **Medio SM10** (Ye *et al.,* 2017): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 20,9 g MOPS, 11,5 g L-Prolina, 23 g glicerol, 0,5 g NaCl, 2,1 g K_2HPO_4, 0,28 g Na_2SO_4, 10 mL $MgSO_4$ (0,02M), 10 mL $CaCl_2$ (0,02M) y 5 mL oligoelementos. Ajustar pH a 6,5 con KOH.

- **Medio SM12** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 10 g/L Arkasoy (harina de soja), 50 g/L glucosa, 4 g/L peptona, 4 g/L extracto de carne, 1 g/L extracto de levadura, 2,5 g NaCl y 5 g $CaCO_3$. Ajustar pH a 7,6 con KOH.

- **Medio SM17** (Ye *et al.,* 2017): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 2 g/L glusosa, 40 g/L glicerol, 2 g/L almidón soluble, 5 g/L harina de soja, 5 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 2 g/L $CaCO_3$.

- **Medio SM19** (Malmierca *et al.*, 2018): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 40 g/L pasta de tomate, 15 g/L avena y 2 g/L glucosa. pH natural.

- **Medio SM20** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 20 g/L maltosa, 5 g/L peptona, 5 g/L extracto de carne, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L NaCl y 1 g/L $MgSO_4.7H_2O$. Ajustar pH a 7,2 con KOH.

- **Medio SM24** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 9 g/L extracto de levadura, 1,8 g/L peptona, 20 g/L glucosa, 1 g/L KH_2PO_4 y 0,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$. pH natural.

- **Medio SM25** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 10 g/L peptona, 21 g/L extracto de malta y 40 g/L glicerol. pH natural.

- **Medio SM26** (Cortés J., comunicación personal): medio utilizado para la producción y aislamiento de metabolitos secundarios.
  - **Composición:** 2 g/L glusosa, 40 g/L glicerol, 2 g/L almidón soluble, 5 g/L harina de soja, 5 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 2 g/L $CaCO_3$. Ajustar pH a 4.5 con HCl.

6.1.3. Medios de cultivo empleados para levadura

- **Medio YPD** (Green y Sambrook, 2012): medio empleado para el crecimiento y desarrollo rutinario de levaduras.
  - **Composición:** 10 g/L extracto de levadura; 20 g/L peptona; 20 g/L glucosa; 100 mg/L adenina.

6.2. Condiciones de cultivo

6.2.1. Cultivos de *E. coli*

El crecimiento de las cepas de *E. coli* se llevó a cabo mediante incubación a 37°C durante un mínimo de 12 horas, con agitación orbital a 250 rpm en caso de cultivos líquidos.

A la hora de analizar las diferentes construcciones se selecciona una colonia aislada en placa inoculada en medio 2xTY o LB suplementado con el antibiótico de selección oportuno, manteniendo de esta forma la presión selectiva.

6.2.2. Cultivos de *Streptomyces*

Partiendo de un *stock* de esporas conservadas en glicerol 50% puede sembrarse en medio sólido (medio A o Bennet) a 37°C durante 4 días para obtener mayor cantidad de esporas (o colonias aisladas) o cultivarse en medio líquido TSB en matraces lisos durante 24 horas a 30°C y 250 rpm de agitación para obtener preinóculos en procesos de obtención de metabolitos secundarios o para obtener ADN cromosómico.

6.2.3. Conservación de las cepas

Para *E. coli* se realiza un cultivó en medio líquido durante unas 12 horas. A continuación, se recogen 1,5 ml del cultivo y por centrifugación se obtiene el sedimento que posteriormente se resuspende en glicerol 50 %, donde pueden conservarse a -20°C.

Para *Streptomyces* se recogen esporas de cultivos crecidos en placa en medio sólido a 30°C durante 4-5 días, conservándolas en glicerol 50% a -20°C.

6.2.4. Cultivos para cuantificar producción de metabolitos secundarios de interés

La cuantificación comienza inoculando esporas conservadas en glicerol 50% en medio líquido TSB y cultivándolas durante 24 horas a 30°C y 250 rpm. Una vez que este preinóculo alcanza una DO_{600} (densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm) de 0,2 se utiliza para inocular matraces lisos con el medio de cultivo de producción seleccionado, de manera de todos los matraces posean una misma concentración inicial de esporas para estandarizar el ensayo. Estos matraces son incubados a 30°C y 250 rpm durante una semana, tomándose muestras de ellos cada 24 ó 48 horas.

7. Aislamiento de ADN

Para aislar tanto ADN plasmídico de *E. coli* así como ADN genómico de *Streptomyces* se siguieron los protocolos establecidos por Sambrook *et al.* (1989) y Kieser *et al.* (2000).

7.1. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

Dependiendo de la cantidad de ADN plasmídico que se necesite obtener pueden seguirse dos protocolos diferentes. En caso de necesitar poca cantidad de ADN plasmídico se utilizó el método de minipreparaciones de ADN, mientras que si se necesita obtener una gran cantidad de ADN de plásmidos el protocolo seguido fue el de lisis alcalina.

7.2. Minipreparaciones de plásmido de *E. coli*

Este método permite obtener de manera rápida pequeñas cantidades de ADN plasmídico. Se utilizó para comprobar los plásmidos presentes en transformantes de *E. coli*, lo que requiere sólo unos pocos microgramos de ADN.

Protocolo (Holmes y Quigley, 1981)

1. Inocular colonias aisladas en 1,5 ml de medio 2xTY (o LB) suplementado con el antibiótico de selección. Incubar durante 16-24 horas a 37°C y 220 rpm.

2. Precipitar las células centrifugando durante 1 minuto a 13200 rpm. Retirar el sobrenadante por decantación sobre papel secante.
3. Añadir 350 µl de STET (EDTA 50 mM pH 8, TrisHCl 10 mM, Sacarosa 8 % y Tritón X–100 0,5 %) y 6 µl de lisozima (concentración 10 mg/ml en agua). Agitar durante 20 segundos en el mezclador vortex.
4. Hervir la solución con las células a 98°C durante 45 segundos. Sobrepasar ese tiempo podría suponer una fragmentación del ADN genómico.
5. Centrifugar inmediatamente durante 15 minutos a 13200 rpm. A continuación, se retira el precipitado viscoso (restos celulares, proteínas y ADN genómico) con un palillo estéril.
6. Añadir 45 µl de acetato sódico 3 M y 450 µl de isopropanol. Mezclar de forma suave por inversión y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
7. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm y descartar el sobrenadante. Dejar secar durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.
8. Resuspender en 15-20 µl de agua MilliQ o de tampón TE (Tris·HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8).

7.3. Lisis alcalina

Para obtener grandes cantidades de ADN plasmídico se siguió el protocolo de lisis alcalina descrito por Maniatis *et al.*, 1982 aplicando ciertas modificaciones.

Protocolo modificado de Maniatis *et al.*, 1982

1. Inocular en un tubo Falcon estéril de 50 ml una colonia aislada en 20 ml de medio TSB suplementado más el antibiótico de selección correspondiente. Cultivar durante 12-24 horas a 37°C y 250 rpm.
2. Centrifugar las células durante 5 minutos a 4400 rpm y eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el precipitado en 800 ml de STET (EDTA 50 mM pH 8, TrisHCl 10 mM, Sacarosa 8 % y Tritón X–100 0,5 %) con lisozima a una concentración final de 10 mg/ml. Mezclar por inversión suavemente. Dejar reposar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 1,6 ml de solución alcalina/SDS (NaOH 1,2N y SDS 1%) recién preparada. Mezclar suavemente por inversión y dejar en hielo durante 10 minutos.
5. Añadir 1,2 ml de solución de acetato potásico 3M pH 4,8 (60 ml acetato potásico 5M, 11,5 ml ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada) anteriormente enfriada a 4 °C. Agitar rápida y enérgicamente hasta que la solución adquiera un color blanco. Mantener en hielo 10 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 4400 rpm y 4°C. Filtrar el sobrenadante a través de un algodón hidrófilo y recuperarlo en un tubo Corning® de 15 ml. Añadir 0,7 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión y dejarlo precipitando durante 15 minutos a 37°C.
7. Centrifugar 10 minutos a 4500 rpm y temperatura ambiente.
8. Lavar el precipitado con etanol al 70 % y resuspender en 400 µl de tampón TE (Tris·HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8).

9. Pasar a un *eppendorf* y añadir 16 µl de RNasa a una concentración final de 40 µg/ml, mezclar suavemente con la pipeta y dejarlo a 37°C durante 30 minutos.
10. Pasar a mezcla a un tubo de 2 ml y añadir 1 volumen de cloroformo isoamílico (CIA) (24:1) para extraer el ADN y limpiar posibles restos de ARN. Dar un golpe de vortex y centrifugar 5 minutos a 13250 rpm.
11. Recoger la fase acuosa en un nuevo tubo *eppendorf* de 1,5 ml.
12. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5,2. Mezclar muy suavemente por inversión y dejar durante al menos 30 minutos a -80°C (o durante toda la noche a -20°C) para favorecer la precipitación.
13. Centrifugar 10 minutos a 13250 rpm y lavar el precipitado con etanol al 70 % y resuspender en 300-400 µl de tampón TE (o H_2O milliQ).

7.4. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación

Para secuenciar se utilizó ADN de plásmidos recombinantes obtenidos a partir de cultivos de *E. coli* DH10B (o DH5α) inoculando las cepas en medio 2xTY e incubándolas a 37°C y 250 rpm en agitación durante 12-16 horas. A continuación, se empleó el *kit* comercial "StrataPrep Plasmid Miniprep *Kit*" (Agilent Technologies) para la obtención y purificación del ADN plasmídico.

7.5. Obtención de ADN cromosómico de *Streptomyces*

Siguiendo el protocolo por Kieser *et al.* (2000) se obtiene un ADN cromosómico de *Streptomyces* poco fragmentado y limpio.

Protocolo (Kieser *et al.* 2000)

1. En erlenmeyer de 25ml autoclavado:
   1.1. Inocular aprox. 10-20 µl esporas en glicerol 50% en 5 ml de medio TSB.
   1.2. Dejar overnight a 30 °C y 250 rpm en armario de agitación.
2. Pasar a tubos verdes de 10 ml los inóculos y centrifugar 10' a 4400rpm.
3. Desechar sobrenadante y dejar el pellet.
4. Añadir 2 ml de tampón TE en cada tubo y resuspender bien el pellet. Recoger aproximadamente 1'2ml y pasarlo a tubos con rosca adecuados *FastPrep®* (MPBio).
5. Centrifugar 10' a 13000 rpm.
6. Repetir lavado con TE.
7. Resuspender en 200µL de SDS 2% en TE.

<u>*Campana de extracción*</u>

8. Añadir 200 µl de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (FCIA) (25:24:1). Añadir aproximadamente mismo volumen de microbolas de vidrio.
9. *FastPrep®* (MPBio) 2 pulsos 20'' V6.

10. Añadir 400 µl TE/Fenol/Cloroformo/Isoamílico (50:25:24:1): 200 µl Te+ 200 µl FCIA.
11. Centrifugar 5' a 13000rpm.
12. Recoger fase acuosa (≈400 µl) y añadir 400 µl de Cloroformo/Isoamílico (24:1).
13. Vortex y centrifugar 2' a 13000 rpm.
14. Recoger fase acuosa (≈300 µl).

Fin campana de extracción

15. Añadir 2'5 volúmenes de EtOH absoluto y 0'1 volúmenes de AcNa 3M. Si hay suficiente ADN aparece un ovillo que se puede recuperar con una punta amarilla. Si no centrifugar 10' a 13000rpm (eliminar sobrenadante y quedarnos con pellet).
16. Lavar con 1ml de EtOH 70% y centrifugar 1'.
17. Secar y resuspender en agua milliQ o tampón TE entre 100µl y 1 ml en función del pellet.

8. Manipulación *in vitro* de ADN

8.1. Digestión enzimática

Las digestiones enzimáticas de ADN se realizaron con endonucleasas de restricción siguiendo los métodos descritos por Sambrook *et al.* (1989). Para el empleo de los diferentes tampones utilizados y las condiciones en que se llevaron a cabo las reacciones se siguieron las recomendaciones indicadas por la casa comercial correspondiente.

8.2. Desfosforilación de extremos 5' de ADN

Para evitar la religación de los vectores carentes de inserto, en algunos casos se eliminó el grupo fosfato del extremo 5' del ADN. Este proceso se realizó añadiendo una unidad de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (New England Biolabs) a una solución de ADN en su correspondiente tampón (Tris-HCl 50 mM pH 8; Na2-EDTA 0,1 mM) e incubando la reacción a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se purificó el ADN utilizando el *Kit* comercial "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification *Kit*" de Amersham-Biosciences.

8.3. Generación de extremos romos

En ciertos casos, la incompatibilidad de los extremos de vector e inserto generados por las digestiones enzimáticas requeridas supone tener que rellenar los extremos de ambos.

La obtención de extremos romos a partir de extremos cohesivos procedentes de la digestión con diversos enzimas de restricción, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) con el tratamiento de ADN con el fragmento Klenow (Roche) de la ADN polimerasa I de *E. coli*.

8.4. Ligación de ADN

La ligación de los vectores y sus correspondientes insertos en cada caso se realizó siguiendo el método descrito por Green y Sambrook (2012), teniendo la precaución de utilizar los vectores siempre desfosforilados.

La ADN ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, para lo que necesita como cofactores iones Mg2+ y ATP. Las proporciones molares entre inserto y vector utilizadas fueron de 3 a 1 para ligaciones con extremos cohesivos y de 10 a 1 para extremos romos. Esto se debe a que, generalmente, las ligaciones basadas en moléculas de ADN con los extremos romos son más complicadas e improbables, por lo que se procura que exista un mayor número de moléculas de inserto en relación al vector que en los casos de extremos cohesivos, con el fin de facilitar su incorporación. En todos los casos se empleó la ligasa del fago T4 (Invitrogen) en las condiciones indicadas por su casa comercial, dejando las ligaciones durante la noche a 14°C.

8.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa sumergidos se emplea para separar fragmentos de ADN según su tamaño, ya sea para su análisis o como sistema de aislamiento de un fragmento concreto. Las electroforesis se realizaron según las indicaciones de Sambrook y Russell (2001).

Para la elaboración de los geles se utilizó agarosa *Electran*® (VWR) disuelta por calentamiento en tampón TAE 0.5x (20 mM Tris-HCl, 10 mM ácido acético glacial, 1,1 mM EDTA) con concentraciones de entre el 0,7-2 %, según el rango de tamaños de los fragmentos que se deseasen separar (utilizando los geles con mayor concentración de agarosa para visualizar los fragmentos de menor tamaño). El gel, una vez polimerizado, fue sumergido en tampón TAE 0.5X en la cubeta de electroforesis. Antes de su aplicación en el gel, las muestras de ácido nucleico se mezclaron con 1/10 de volumen de tampón de carga 10x (100 mM EDTA, 43% glicerol y 0,5% azul de bromofenol) que actúa como indicador del frente de migración del gel, además de proporcionar densidad a la muestra de ácidos nucleicos. Como indicador de tamaño molecular se empleó ADN del fago digerido con las enzimas HindIII o PstI, dependiendo de los tamaños de banda esperados. Generalmente se utilizaron unos 5µl de marcador por carril.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas de metacrilato y a un voltaje de entre 70 y 100 V. La duración de la electroforesis depende tanto de la longitud del gel empleado como del tamaño de los fragmentos de ADN a estudiar. Para facilitar la visualización de los fragmentos de ADN tras la electroforesis, se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml (Sambrook *et al*., 1989) y las bandas fueron visualizadas mediante iluminación con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc® (BioRad).

8.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Los *kits* comerciales que hay en el mercado para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se basan en el empleo de matrices de sílice. Se emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la columna. Una vez el ADN se encuentra retenido, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado con una solución de EtOH y H_2O MilliQ. El ADN es posteriormente eluído en un tampón de baja fuerza iónica o en H_2O MilliQ.

Las bandas de interés en productos obtenidos de digestiones enzimáticas, y que requieren ser separados por electroforesis, pueden recuperarse recortándolas sirviéndonos de un bisturí y tratándolas con el *kit* comercial *StrataPrep Gel Purification Kit* (Agilent Technologies).

Los productos de PCR pueden ser purificados directamente con el *kit* comercial *StrataPrep PCR Purification Kit* (Agilent Technologies).

Protocolo

1. Pesar el *eppendorf* vacío y a continuación con el fragmento de agarosa recortado del gel.
2. Añadir 10 µl de tampón de captura por cada 10 mg de agarosa.
3. Incubar a 60°C hasta disolver la agarosa (unos 10 minutos). Durante ese tiempo invertir alguna vez para facilitar el proceso. Dar un pulso en la centrífuga.
4. Pasar un máximo de 600 µl del volumen total a la columna colocada sobre un *eppendorf*.
5. Mantener 30 segundos a temperatura ambiente y centrifugar 30 segundos a velocidad máxima. Descartar el eluído (repetir los pasos 4 y 5 si aún queda volumen de muestra).
6. Añadir 500 µl de tampón de lavado y centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
7. Descartar el tubo y su contenido y colocar la columna en otro *eppendorf*.
8. Añadir 30 µl de tampón de elución o agua MilliQ al centro de la columna, incubar 1 o 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar un minuto a velocidad máxima. Para aumentar el porcentaje de recuperación, volver a pasar el eluído por la columna.
9. Guardar el eluído a -20°C.

8.7. Cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos

Desde las fotografías con muestras de ADN se cuantificaron fragmentos concretos por comparación de intensidad de su señal con un patrón de ADN de concentración conocida. El patrón empleado fue el proporcionado por la digestión con HindIII o PstI de ADN del fago.

Adicionalmente, la cuantificación y determinación de pureza de ADN se llevó a cabo espectrofotométricamente en un equipo SimpliNano (GE Healthcare Life Sciences). El aparato estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260), teniendo en cuenta que la absortividad específica (concentración de una sustancia que determina una unidad de absorbancia a una longitud de onda establecida) para el ADN de doble cadena es de 50 µg/ml, mientras que en el caso del ADN de cadena sencilla tiene

un valor de 33 µg/ml. Además, el cociente A260/A280 indica la pureza de la muestra, con valores de 1,8 de muestras puras de ADN. La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente, ya que algunos de los residuos de aminoácidos presentan picos de absorción a 280 nm (Sambrook y Russell, 2001).

El cociente A260/A230 para ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos en las muestras.

9. Transformación con ADN plasmídico

Para lograr introducir las diferentes construcciones plasmídicas en *E. coli* se siguió en método de transformación mediante choque térmico. Para ello, el primer paso fue el de obtener células competentes de la cepa que se usaría como receptora del plásmido.

9.1. Obtención de células competentes

Para introducir ADN exógeno en *E. coli* lo primero que debe hacerse en inducir el estado de competencia en estas células, gracias al cual éstas permiten atravesar sus barreras externas a dicho ADN exógeno. Para la inducción de la competencia, se tomaron *E. coli* en su fase exponencial de crecimiento y se sometieron al método descrito para la inducción por cloruro de calcio (Green y Sambrook, 2012).

En los casos en los que el plásmido lleva el gen *lacZ,* que codifica para una β-galactosidasa, se añadió a las placas X-gal (40 µg/ml) e IPTG (12,5 µg/ml) que facilita la posterior selección e identificación de las colonias transformantes conteniendo el plásmido recombinante.

9.2. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico

En este método la entrada de ADN plasmídico se favorece por la modificación de la pared celular mediante un choque térmico a 42°C.

Protocolo

1. Mezclar 200 µl de de *E. coli* DH5α (o DH10B) con 10 µl del ADN que se desea transformar en un tubo *eppendorf*.
2. Dejar reposar en hielo durante 30 minutos.
3. Aplicar un choque térmico a la muestra introduciéndola a 42°C en un baño de agua durante 1 minuto y 30 segundos.
4. Volver a colocar en hielo durante unos 5 minutos.
5. Añadir 700 µl de medio 2xTY y mezclarlo bien con la pipeta.
6. Incubar a 37 °C y 350 rpm durante una hora.

7. Sembrar distintas cantidades en placas con medio 2xTY sólido suplementado con el antibiótico de selección a la concentración adecuada e incubar a 37 °C durante un mínimo de 12 horas.
   7.1. En los casos en los que el plásmido lleva el gen *lacZ,* que codifica para una β-galactosidasa, se añadió a las placas X-gal (40 µg/ml) e IPTG (12,5 µg/ml) que facilita la posterior selección e identificación de las colonias transformantes conteniendo el plásmido recombinante.

9.3. Obtención de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *E. coli* se obtuvieron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento, induciendo la competencia con glicerol al 10% a 4 °C de temperatura (MacNeil *et al.*, 1992).

9.4. Electroporación de células electrocompetentes de *E. coli*

La transformación de estas células se produjo empleando un electroporador *MicroPulser®* (BioRad) y usando una cubeta con 2 mm de separación entre electrodos.

Protocolo

1. Mezclar en una cubeta de electroporación 50 µL de células electrocompetentes (previamente descongeladas en hielo) con 1 µL de construcción plasmídica.
2. Aplicar un pulso de 2,5 kV durante 5 ms para lograr la inserción del plásmido.
3. Diluir lo más rápidamente posible las células en 1 ml de 2xTY e incubar a 37°C y 250rpm durante 1 hora para permitir el desarrollo de las resistencias.
4. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sembraron en placas de 2xTY sólido con los antibióticos necesarios para la selección del plásmido, así como los intrínsecos de la cepa *E. coli* ET12567/pUB307 (cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina).

10. Conjugación intergenérica de *Streptomyces*

La introducción de material genético en *Streptomyces* se llevó a cabo mediante conjugación intergenérica siguiendo el protocolo propuesto por Mazodier *et al.* (1989), el cual requiere de vectores bifuncionales que sean transferido desde *E. coli* a *Streptomyces*. Este proceso tiene una mayor eficiencia que la transformación.

Se utilizó como cepa donadora de ADN a *E. coli ET 12567/pUB307* (Flett *et al.*, 1997). Las construcciones utilizadas derivan de los plásmidos bifuncionales pEFBAoriT (Horna *et al.*, 2011), pOJ260, pEM4T y pSET152Ec.

Protocolo

1. Poner a crecer células *E. coli ET12567 dam⁻*, una vez transformadas con la construcción de interés, durante una noche en medio de cultivo LB (ó 2xTY) suplementado con el antibiótico (o antibióticos) de selección del plásmido conjugativo, cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina a 37°C y 250rpm.
2. Al día siguiente, pasar las células a un *eppendorf* (aproximadamente 1-1'5 ml por conjugación).
3. Centrifugar 6-7 minutos a 11000 rpm y eliminar el sobrenadante.
4. Añadir 1 ml de medio LB fresco, resuspenderlo y volver a centrifugarlo. De esta manera se lavan las células de restos de los antibióticos empleados.
5. Resuspender finalmente en 100 µl de LB.
6. Mientras se centrifugan las células preparar un *eppendorf* con 100 µl de esporas de *Streptomyces* conservadas en glicerol 50%. Estas esporas se activan incubándolas 10 minutos a 50°C, ya que de esta forma se induce su germinación (centrifugar a 13000rpm durante 1 minuto para eliminar el glicerol una vez han sido activadas).
7. Finalmente mezclar los 200 µl de células resuspendidas en LB con el pellet de esporas y se siembra la mezcla por extensión en placas con medio MS suplementado con $CaCl_2$ (Xian-Kun *et al.*, 2014) que optimiza la conjugación, y se incuban durante la noche a 30°C.
8. Al día siguiente se cubren las placas con 1'5ml de agua estéril (o con 3ml de SNA) con el antibiótico adecuado para seleccionar la construcción y ácido nalidíxico (25 µg/ml concentración final) para eliminar los restos de *E. coli* que puedan quedar.
9. Al cabo de unos días aparecerán colonias que habrán sobrepasado la capa de agua estéril con antibióticos. Éstas se transfieren a placas de medio MA (o Bennet) con ácido nalidíxico y el antibiótico de selección para corroborar que se trata de transconjugantes positivos.
   9.1. Si las construcciones que pretendemos realizar son para llevar a cabo un reemplazamiento génico cada una de las colonias transconjugantes picadas debe ser transferida a dos placas en paralelo. Una con MA, ácido nalidíxico y el antibiótico de selección, al ser su gen de resistencia el que reemplaza al gen (o genes) original y otra con MA, ácido nalidíxico y el antibiótico cuyo gen de resistencia corrobora que el doble sobrecruzamiento se ha producido satisfactoriamente.

11. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

11.1. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

La amplificación de fragmentos específicos de ADN se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por su acrónimo en inglés (*Polymerase Chain Reaction*, Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986).

Dicha técnica tiene como fin la obtención de un gran número de copias de un determinado fragmento de ADN por la repetición cíclica de tres pasos fundamentales, desnaturalización del ADN molde, hibridación de los oligonucleótidos cebadores y extensión, logrando de esta forma obtener nuevas moléculas.

1. **Desnaturalización**. separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (95-99,9 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura disminuya bastante como para permitir la unión de los oligonucleótidos cebadores.

2. **Hibridación** de los oligonucleótidos con la secuencia. Se basa en un enfriamiento rápido, por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores (temperatura de *melting*, Tm), para que puedan hibridar con sus secuencias complementarias en las cadenas del ADN molde. La temperatura de esta etapa es un factor crítico, ya que si es demasiado alta el rendimiento de la reacción es bajo porque la tasa de hibridación es baja, y si es demasiado baja puede afectar a la especificidad de la reacción, amplificando productos no deseados. Por esta razón la temperatura de hibridación se determina empíricamente, partiendo normalmente de una temperatura 5 °C inferior a la menor de las temperaturas de desnaturalización de los cebadores.

3. **Elongación**. La polimerasa sintetiza ADN complementario al ADN molde de cadena sencilla a partir del extremo 3´ de los cebadores. La temperatura generalmente es de 72°C (dependiendo de la enzima empleada puede variar) y el tiempo de elongación varía en función del tamaño del fragmento que se desea amplificar.

Esta técnica requiere conocer la secuencia que se desea amplificar, de manera que se pueda diseñar dos oligonucleótidos complementarios a cada uno de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Dichos oligonucleótidos cebadores aportan los extremos 3'OH libres para iniciar la síntesis de ADN de doble cadena a partir de un molde de ADN de cadena sencilla.

Una vez terminada la reacción de PCR, el resultado final se comprueba en un gel de agarosa, pudiendo ver de esta manera el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la posible aparición de fragmentos de amplificación inespecíficos.

11.2. Oligonucleótidos

A la hora de diseñar oligonucleótidos se emplearon como base las secuencias de ADN obtenidas tras la secuenciación de los genomas completos tanto de *S. albus* J1074 como de *Streptomyces sp. CS227*, teniendo en cuenta factores determinantes como el alto contenido en G+C característico del género *Streptomyces*, la temperatura de anillamiento, la posible formación de horquillas o el apareamiento de bases del oligonucleótido tanto consigo mismo como con su pareja complementaria, así como los efectos de la introducción de dianas de restricción al inicio de las secuencias para así favorecer la posterior clonación de los productos de PCR obtenidos. Toda esta variedad de parámetros se evaluó utilizando programas bioinformáticos *online* como *NetPrimer* (PREMIER Biosoft), *Snapgene* (GSL Biotech LLC) y *Primer3Plus* (Rozen y Skaletsky, 1998).

A continuación, se muestran diferentes tablas con los distintos oligos diseñados para poder llevar a cabo cada una de las construcciones propuestas en esta Tesis Doctoral y están agrupados conforme han sido empleados en construcciones con un mismo objetivo.

Tabla 8. Cebadores diseñados para experimentos de reemplazamiento génico de operones de genes biosintéticos. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (ACTAGT: SpeI; ATGCAT: NsiI; GGATCC: BamHI; GATATC: EcoRV).

Construcción final	Oligo	Secuencia 5'-3'	Aplicación
pEFBAoriT C1AD	**1A1**	AA**ACTAGT**GGTGACAACGGCATCCAG	Mutantes *S. albus* Δ1, Δ1ΔB29, Δ1ΔAnt y Δ1ΔCand
	1B1	AAA**ATGCAT**AAGTCGAAGCAGGGCTCG	
	1C1	TT**GGATCC**CACCACCAGCACATCCGAC	
	1D1	TTT**GATATC**TCGTTCCGGCGTCAGTTC	
pEFBAoriT C13AD	**6A1**	TT**ACTAGT**GTGTACCCCTTCCTGCCGA	Mutante *S. albus* Δ13
	6B1	AAA**ATGCAT**GAACCCCTCCACGACCGT	
	6C1	TT**GGATCC**GCTTGCCTGGAGAAGTGA	
	6D1	TTT**GATATC**GAGTTCGAGCCGCTGATC	
pEFBAoriT C14AD	**7A1**	AA**ACTAGT**GATCAGCAGGTACGCCGC	Mutantes *S. albus* Δ14, Δ14ΔB29, Δ14ΔAnt y Δ14ΔCand
	7B1	AAA**ATGCAT**GTCGGACGGGACAGAGGG	
	7C1	AA**GGATCC**GTCCTCGCCGAGGCACTG	
	7D1	AAA**GATATC**GTTGGCGAAGAGGGTGCG	
pEFBAoriT C21AD	**8A1**	TT**ACTAGT**GGAGTTCAGCCGCCCATTC	Mutantes *S. albus* Δ21, Δ21ΔB29, Δ21ΔAnt y Δ21ΔCand
	8B1	TTT**ATGCAT**GACACCGTCCAGCCTCGC	
	8C1	AA**GGATCC**GCAGCGGCCGGAAACTGA	
	8D1	AAA**GATATC**CGGGGTGAGCGCCAACTG	
pEFBAoriT C16ADCS227	**6A1**	TT**ACTAGT**GTGTACCCCTTCCTGCCGA	Mutante *Streptomyces sp*. CS227 Δ16
	6B1	AAA**ATGCAT**GAACCCCTCCACGACCGT	
	6C1	TT**GGATCC**GCTTGCCTGGAGAAGTGA	
	6D1C16 CS227	TTT**GATATC**CTGGTTCTCCGGGTACGTC	
pEFBAoriT C20ADCS227	**1A1CS227**	AA**ACTAGT**CGTCGTCTTCATCGCCTTCT	Mutante *Streptomyces sp*. CS227 Δ20
	1B1CS227	AAA**ATGCAT**CCATGACCTGGGTGAACGAG	
	1C1CS227	TT**GGATCC**CACCTATCCGTTCCACCGAC	
	1D1CS227	TTT**GATATC**GACTTCAGGGTGATGCGGTC	

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para ensayos de reemplazamiento génico de genes reguladores en diferentes agrupaciones génicas biosintéticas de las cepas *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (ACTAGT: SpeI; ATGCAT: NsiI; GGATCC: BamHI; GATATC: EcoRV).

Construcción	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
pEFBAoriT regADHyg alb	**Mutreg C1albA**	AA**ACTAGT**TTGCCGAGGTACAGGTTGTC	Mutante *S. albus* Δreg
	MutregC1albB	AAA**ATGCAT**GCTGCACTCCGAGTACTACC	
	Mutreg C1albC	TT**GGATCC**ATCATGCTCATCGACGGTCC	
	Mutreg C1albD	TTT**GATATC**CATCGTCCTGGAGTCGGAAG	
pEFBAoriT reg1ADHyg alb	**Mutreg1 C1albA**	AA**ACTAGT**GCTCTTCCAGATCCGTACCG	Mutante *S. albus* Δreg1
	Mutreg1 C1albB	AAA**ATGCAT**GGGCAAGACCGTAGAAGCAT	
	Mutreg1 C1albC	TT**GGATCC**CACGATCCTGGCTCCGTAG	
	Mutreg1 C1albD	TTT**GATATC**GGAGGTGGAGGAGGCTATGA	
pEFBAoriT reg2ADHyg alb	**Mutreg2 C1albA**	AA**ACTAGT**GTGATGTGGGTGGTCAGTGT	Mutante *S. albus* Δreg2
	Mutreg2 C1albB	AAA**ATGCAT**GAAGGTACGCCAACACGGTA	
	Mutreg2 C1albC	TT**GGATCC**CTGATCGAGGAAGGCACGAT	
	Mutreg2 C1albD	TTT**GATATC**CCTGTTCGGCTTCAAGGTCA	
pEFBAoriT reg3ADHyg alb	**Mutreg3 C1albA**	AA**ACTAGT**GAATGTCCGCCTAGTCTCG	Mutante *S. albus* Δreg3
	Mutreg3 C1albB	AAA**ATGCAT**GTCGAGCTTGTTCAGGTCCA	
	Mutreg3 C1albC	TT**GGATCC**CCACCTTCCTCACCCATGTC	
	Mutreg3 C1albD	TTT**GATATC**AGCCCGCTGTAGTACGAGTA	
pEFBAoriT reg1C14ADHyg alb	**Mutreg1 C7albA**	AA**ACTAGT**GCTGTTCGCCTTCTACTTCG	Mutante *S. albus* Δreg1C14
	Mutreg1 C7albB	AAA**ATGCAT**GTACCGCATCATGCCTCATA	
	Mutreg1 C7albC	TT**GGATCC**GACGTGAACCCGGACATAG	
	Mutreg1 C7albD	TTT**GATATC**AACGAGGTGAACACGTACCC	
pEFBAoriT reg1C21ADHyg alb	**Mutreg1 C8albA**	AA**ACTAGT**CTACTTCCAGGGGCTGCTGT	Mutante *S. albus* Δreg1C21
	Mutreg1 C8albB	AAA**ATGCAT**CGGTGTGGAGAATCCCTCT	
	Mutreg1 C8albC	TT**GGATCC**CTGCACACCAAGTTCGGC	
	Mutreg1 C8albD	TTT**GATATC**CATCGACGACATCCAGTCC	
pEFBAoriT reg2C21ADHyg alb	**Mutreg2 C8albA**	AA**ACTAGT**GTTCTCGTACACGGTCAGCA	Mutante *S. albus* Δreg2C21
	Mutreg2 C8albB	AAA**ATGCAT**GAGAGCAGTTCGACCAGTCC	
	Mutreg2 C8albC	AAA**GGATCC**TTCATGAAGCTGGAACTGGA	
	Mutreg2 C8albD	AAA**GATATC**GTACGGGCTCTACACCTGGA	
pEFBAoriT reg3C21ADHyg alb	**Mutreg3 C8albA**	AA**ACTAGT**GTGACGGTCTTCGTCATCG	Mutante *S. albus* Δreg3C21
	Mutreg3 C8albB	AAA**ATGCAT**CCCGCTAGTTAGGACTGTGC	
	Mutreg3 C8albC	AAA**GGATCC**GGAATCGAAAGACTCCACGA	
	Mutreg3 C8albD	AAA**GATATC**TGTAACGGGCCAGAGAAGTC	
pEFBAoriT reg4C21ADHyg alb	**Mutreg4 C8albA**	AA**ACTAGT**GGTCTACGTGGTGCTGTGG	Mutante *S. albus* Δreg4C21
	Mutreg4 C8albB	AAA**ATGCAT**GGTACCCAGAGTTCCGATGA	
	Mutreg4 C8albC	AAA**GGATCC**CAGCAAACACCTCACGATCC	
	Mutreg4 C8albD	AAA**GATATC**GTAGGCGAGATGGCTGTTGT	
pEFBAoriT reg5C21ADHyg alb	**Mutreg5 C8albA**	AA**ACTAGT**CTTCTGGAGGTACTCGTCGG	Mutante *S. albus* Δreg5C21
	Mutreg5 C8albB	AAA**ATGCAT**GGAGTCGACCTCGTACTGGC	
	Mutreg5 C8albC	AAA**GGATCC**CCAACTACCTGCGGGTCTAC	
	Mutreg5 C8albD	AAA**GATATC**AAGGTCAACCTGGTGGTGTC	

pEFBAoriT reg6C21ADHyg alb	**Mutreg6 C8albA**	AA**ACTAGT**CGCACTACGAGCACTGTTTC	Mutante *S. albus* Δreg6C21
	Mutreg6 C8albB	AAA**ATGCAT**GAGGATGAGATCGAGGGC	
	Mutreg6 C8albC	AAA**GGATCC**ACCGTGAACAGAAGGACAGC	
	Mutreg6 C8albD	AAA**GATATC**ACGTCCATCTCGGGTGTCT	
pEFBAoriT regADC20Hyg CS227	**Mutreg C1CS227A**	AA**ACTAGT**TTGCCGAGGTACAGGTTGTC	Mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg
	Mutreg C1CS227B	AAA**ATGCAT**AGGCTGCACTCCGAGTACTA	
	Mutreg C1CS227C	TT**GGATCC**ATCATGCTCATCGACGGTC	
	Mutreg C1CS227D	TTT**GATATC**TTACGAGACACCGTGGTTCG	
pEFBAoriT Reg1ADC20Hyg CS227	**Mutreg1 C1CS227A**	AA**ACTAGT**ACCGACCCTCAACAACATCC	Mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg1
	Mutreg1 C1CS227B	AAA**ATGCAT**ACAGGCAAGACCGTAGAAGC	
	Mutreg1 C1CS227C	TT**GGATCC**AGGCTGCACTCCGAGTACTA	
	Mutreg1 C1CS227D	TTT**GATATC**TTGCCGAGGTACAGGTTGTC	
pEFBAoriT Reg2C20ADHyg CS227	**Mutreg2 C1CS227A**	AA**ACTAGT**TAGTACTCGGAGTGCAGCCT	Mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg2
	Mutreg2 C1CS227B	AAA**ATGCAT**GTACCCCAGAGTCGAGAACA	
	Mutreg2 C1CS227C	TT**GGATCC**GGATGTTGTTGAGGGTCGGT	
	Mutreg2 C1CS227D	TTT**GATATC**GGATAGAAGCTGGTCAGGGC	

Tabla 10. Cebadores diseñados para comprobación de construcciones de reemplazamiento génico de operones de genes biosintéticos y de genes reguladores en las cepas *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227.

Oligo	Secuencia 5' a 3'	Función
Comprobacion1B	GCCGACCTCGTCCTCAGC	Comprobación de los mutantes *S. albus* Δ1 y *Streptomyces sp.* CS227 Δ20
Comprob1C	TCGCCGTTGAAGTGTCGC	
Comprob6B	GTTCCAGGATGAGCGGTCG	Comprobación del mutante *S. albus* Δ13
Comprob6C	CACACCGAACACCCTGCTC	
Comprobacion7B	CGTTCCGAAGGTGAGCCA	Comprobación del mutante *S. albus* Δ14
Comprobacion7C	GTGAGGTCGGTCCAGTGCT	
Comprob8B	AGAAGTCGGTCTGAGCGGG	Comprobación del mutante *S. albus* Δ21
Comprobacion8C	GTAGCGAGCCACAACAGCAG	
Compr mut16 A	GGCTGGTACGAGGAGCTG	Comprobación del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δ16
Compr mut16 B	CTGACGGTACTGCTCGACAA	
Compr doblemutC1tiorv	AGCTCATCAGTGAACAGGCC	Comprobación de los mutantes *S. albus* Δ1ΔB29, Δ1ΔAnt y Δ1ΔCand
Comprob Tio rv	GCTGGTGATGTCACTGTCGA	
Compr doblemutC1tiofw	GTCATGAAGGGGTCGGGTG	
Comprob Tio fw	AGCGGATCATCGATGTCACC	
Comprobacion7B	CGTTCCGAAGGTGAGCCA	Comprobación de los mutantes *S. albus* Δ14ΔB29, Δ14ΔAnt y Δ14ΔCand
Comprob Tio rv	GCTGGTGATGTCACTGTCGA	
Comprobacion7C	GTGAGGTCGGTCCAGTGCT	
Comprob Tio fw	AGCGGATCATCGATGTCACC	
Compr doblemutC8tiorv	ATGGTGCGTTCCATCCTGAG	Comprobación de los mutantes *S. albus* Δ21ΔB29, Δ21ΔAnt y Δ21ΔCand
Comprob Tio rv	GCTGGTGATGTCACTGTCGA	
Compr doblemutC8tiofw	TTCCGTTTCCGTCCCCAAAT	
Comprob Tio fw	AGCGGATCATCGATGTCACC	
Comp mutreg2C1alb rv	AGGCTCACGTACCACTCGTT	Comprobación del mutante *S. albus* Δreg
ApraCfw	AAGTGCTTGACATTGGGG	
Comp mutreg1C1alb rv	TCATCGTGATGACGGACTTG	
ApraCrv	TCATTCTGTGGGCCGTAC	
Comp mutreg1C1alb fw	CAAGAATCGATCCCGACAC	Comprobación del mutante *S. albus* Δreg1
Comp mutreg1C1alb rv	TCATCGTGATGACGGACTTG	
Comp mutreg2C1alb fw	GATGATGACGTTCTCGGTCA	Comprobación del mutante *S. albus* Δreg2
Comp mutreg2C1alb rv	AGGCTCACGTACCACTCGTT	
Comp mutreg3C1alb fw	ACCCGGAACTTCTGTTACCC	Comprobación del mutante *S. albus* Δreg3
Comp mutreg3C1alb rv	CATGGGTTTGAAGTCCTCCT	
Comp mutreg2C1alb rv	AGGCTCACGTACCACTCGTT	Comprobación del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg
ApraCfw	AAGTGCTTGACATTGGGG	
Comp mutreg1C1CS227rv	CGGGTTACTTGCGCTTCTT	
ApraCrv	TCATTCTGTGGGCCGTAC	
Comp mutreg1C1alb fw	CAAGAATCGATCCCGACAC	Comprobación del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg1
Comp mutreg1C1CS227rv	CGGGTTACTTGCGCTTCTT	
Comp mutreg2C1CS227 fw	TGACCGAGAACGTCATCATC	Comprobación del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δreg2
Comp mutreg2C1alb rv	AGGCTCACGTACCACTCGTT	

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para ensayos de sobreexpresión de agrupaciones de genes biosintéticos en *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227 utilizando el plásmido monocopia pOJ260e. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (CTGCAG: PstI; TCTAGA: XbaI).

Construcción final	Oligo	Función	Aplicación
pOJ260eC1	**SU27AC1 albus**	TTTT**CTGCAG**ATGCCTACCACCTGCTTCCT	Sobreexpresión del clúster 1 *S. albus* J1074, ΔB29, ΔAnt y ΔCand
	SU27BC1 albus	TTTT**TCTAGA**GACACCCTGGTCGTGGAG	
pOJ260eC13	**SU2487A**	TTTT**CTGCAG**GTTCACGATGTTCCAGGATGAG	Sobreexpresión del clúster 13 *S. albus* J1074, ΔB29, ΔAnt y ΔCand
	SU2487B	TTTT**TCTAGA**AGGCCGGTGTTGTACTCGA	
pOJ260eC14	**SU2796A**	AA**CTGCAG**TTCCGAAGGTGAGCCAGC	Sobreexpresión del clúster 14 *S. albus* J1074, ΔB29, ΔAnt y ΔCand
	SU2796B	AA**TCTAGA**GTCGGCCGAACGCTCAAG	
pOJ260eC21	**SU4945A**	TT**CTGCAG**TTCCCTGGAGGTACACACGTG	Sobreexpresión del clúster 21 *S. albus* J1074, ΔB29, ΔAnt y ΔCand
	SU4945B	TT**TCTAGA**GGTGTAGATGGCGTACGC	
pOJ260eC16 CS227	**SU2487A**	TTTT**CTGCAG**GTTCACGATGTTCCAGGATGAG	Sobreexpresión del clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227
	SU2487B	TTTT**TCTAGA**AGGCCGGTGTTGTACTCGA	
pOJ260eC20 CS227	**SU27AC1CS227**	TTTT**CTGCAG**ATGCCGACCACCTGCTAC	Sobreexpresión del clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227
	SU27BC1CS227	TTTT**TCTAGA**GTCTCCGTGTGCTCTTCACC	

Tabla 12. Oligonucleótidos diseñados para ensayos de sobreexpresión de genes reguladores de los clústeres de estudio en *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227 utilizando los plásmidos pEM4T (multicopia) y pSET152Ec. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (GGATCC: BamHI; GAATTC: EcoRI; CAATTG: MfeI).

Construcción final	Oligo	Secuencia 5' a 6'	Aplicación
pEM4T1R1 y pSET152Ec1R1	**1R1A1**	AA**GGATCC**GTGGAAACCGACGAAGGC	Sobreexpresión del gen SSHG_00010
	1R1B1	A**GAATTC**CTACGGAGCCAGGATCGTG	
pEM4T1R2 y pSET152Ec1R2	**1R2A1**	TT**GGATCC**TGTCGCGGGGGTACCGTGT	Sobreexpresión del gen SSHG_00011
	1R2B1	A**GAATTC**ACGGCACGCGCAGGGC	
pEM4T13R1 y pSET152EC13R1	**6R1A1**	AA**GGATCC**ATGGCGATACGCATCCTG	Sobreexpresión del gen SSHG_02473
	6R1B1	AA**CAATTG**TCACAGCAGCCAGTCGGA	
pEM4T13R2 y pSET152EC13R2	**6R2A1**	AA**GGATCC**TGCCGCGGGTGCACCAC	Sobreexpresión del gen SSHG_02477
	6R2B1	A**GAATTC**AGGCCGCCGGGCTCGG	
pEM4T13R3 y pSET152EC13R3	**6R3A1**	TT**GGATCC**GTGCAGCTCCTACTCGATCTC	Sobreexpresión del gen SSHG_02484
	6R3B1	T**GAATTC**TAGTCACCTCCGTCCTTCTC	
pEM4T14R y pSET152EC14R	**7RA1**	AA**GGATCC**ATGAGGCATGATGCGGTACGGG	Sobreexpresión del gen SSHG_02804
	7RB1	T**GAATTC**ACGTCGCCGCCCCGGT	
pEM4T21R1 y pSET152EC21R1	**8R1A1**	AA**GGATCC**ATGAAGGCGACGGAGACTTCGG	Sobreexpresión del gen SSHG_04927
	8R1B1	T**GAATTC**ACGGTGCGTGGGGGGC	
pEM4T21R2 y pSET152EC21R1	**8R2A1**	TT**GGATCC**ATGACCCGGGTCCTCGTGGTCG	Sobreexpresión del gen SSHG_04931
	8R2B1	T**GAATTC**ACCCCTGCGGGCGGCG	
pEM4T21R3 y pSET152EC21R1	**8R3A1**	TT**GGATCC**ATGCGCGTCGCGATCGCT	Sobreexpresión del gen SSHG_04948
	8R3B1	T**GAATTC**ATTCGGATCTGTCGTGGAGTCTTTC	

Tabla 13. Oligonucleótidos diseñados diferentes construcciones relacionadas con la cuantificación de la indigoidina. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (GCGGCCCG: NotI; GGATCC: BamHI; CTGCAG: PstI; GAATTC: EcoRI; TCTAGA: XbaI; CATATG: NdeI; GATATC: EcoRV; AGATCT: BglII; GCTAGC: NheI).

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Aplicación
C9A1	TT**GCGGCCGC**ATCAGCACGGCCATGTTG	Reemplazamiento SSHG_00313
C9A2	TT**GGATCC**CCTTGGACCTCTTCGCCTAG	
C9B1	TAT**CTGCAG**GGGAGTGCGAGACGGCAT	
C9B2	TT**GAATTC**AGCCTCATCGGTGCCCTC	
C9C1	**GAATTC**CTAGGCGAAGAGGTCCAAGG	Inserción gen SSHG_00313 en plásmidos pOJ260 y pSET152Ec
C9C2	**GATATC**ATGCCGTCTCGCACTCCC	
transp ind fw	**TCTAGACATATG**GACTTCGGGGACAGGTTCTT	Inserción gen SSHG_00315 en plásmidos pOJ260 y pSET152Ec
transp ind rv	**GATATC**TCATGACTGCTCCTTTTCCGT	
IndC Promoter check Rv [a]	TGCTGGTGCTCATCGTTGAC	Comprobación inserción de promotores
Comprob 1 SSHG_00313	CTCGCTGGTCAACCTCTACG	Comprobación por secuenciación del gen SSHG_00313
Comprob 2 SSHG_00313	TGACCGACTGCTGCCGAA	
Comprob 3 SSHG_00313	ACGTCATCGCGATCAACCA	
Comprob 4 SSHG_00313	GCATCAACACCGGCGAGA	
Comprob C9A	TCAGCCGTACGTTCTCCG	Comprobación de mutantes por reemplazamiento SSHG_00313
Comprob C9B	CGTCCGGTAACCCTGCTC	
Comprob Tsr fw	TAGCTCACTCATTAGGCACCC	
Comprob Tsr rv	ACAACGTCGTGACTGGGAAA	
Comprob TsrE fw	GTGAAGGAACTCGGGGACAA	
Comprob TsrE rv	ACCCAACTTAATCGCCTTGC	
emE*A	TTT**AGATCT**TTGCGAGTGTCCGTTCGA	Amplificación del promotor *ermE*p*
ermE*B	TT**GGATCCGCTAGC**TACCAACCGGCACGATTG	

[a] Cebador diseñado por la Dra. Ana Ceniceros

Tabla 14. Oligonucleótidos diseñados para ensayos de cuantificación del nivel de expresión de promotores de agrupaciones de genes biosintéticos y de genes reguladores en diferentes clústeres de las cepas *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227. Las dianas de restricción utilizadas se señalan en negrita y subrayado (GGATCC: BamHI; GCGGCCCG: NotI; TCTAGA: XbaI).

Construcción	Oligo	Secuencia (5'-3')	Aplicación
C1albind	**1A1ind**	AA**GGATCC**AATTCGAGGCGTGAAATGAG	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 1 *S. albus* J1074
	1B1ind	AA**GCGGCCGC**GGTGAGGTGCGTGAAGGC	
1R1ind	**1R1A1**	AA**GGATCC**GTGGAAACCGACGAAGGC	Cuantificar expresión gen SSHG_00010 clúster 1 *S. albus* J1074
	1R1B1ind	A**GCGGCCGC**CTACGGAGCCAGGATCGTG	
1R2ind	**1R2A1**	TT**GGATCC**TGTCGCGGGGGTACCGTGT	Cuantificar expresión gen SSHG_00011 clúster 1 *S. albus* J1074
	1R2B1ind	A**GCGGCCGC**ACGGCACGCGCAGGGC	
1R3ind	**1R3A1**	AA**GGATCC**ATGCGCCTGGACCTGAAC	Cuantificar expresión gen SSHG_00030 clúster 1 *S. albus* J1074
	1R3B1ind	AA**GCGGCCGC**CACAGCCTGACATGGGTG	
C13albind	**6A1ind**	AA**GGATCC**GGTCAACTCCCTTCTGACCA	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 13 *S. albus* J1074
	6B1ind	AA**GCGGCCGC**ACCGCTCATCCTGGAACA	
13R1ind	**6R1A1**	AA**GGATCC**ATGGCGATACGCATCCTG	Cuantificar expresión gen SSHG_02473 clúster 13 *S. albus* J1074
	6R1B1ind	AA**GCGGCCGC**TCACAGCAGCCAGTCGGA	
13R2ind	**6R2A1**	AA**GGATCC**TGCCGCGGGTGCACCAC	Cuantificar expresión gen SSHG_02477 clúster 13 *S. albus* J1074
	6R2B1ind	A**GCGGCCGC**AGGCCGCCGGGCTCGG	
13R3ind	**6R3A1**	TT**GGATCC**GTGCAGCTCCTACTCGATCTC	Cuantificar expresión gen SSHG_02484 clúster 13 *S. albus* J1074
	6R3B1ind	T**GCGGCCGC**TAGTCACCTCCGTCCTTCTC	
C14albind	**7A1ind**	AA**GGATCC**CGGACAGCCAGATCTTCAAT	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 14 *S. albus* J1074
	7B1ind	AA**GCGGCCGC**GCTCACCTTCGGAACGAG	
14Rind	**7RA1**	AA**GGATCC**ATGAGGCATGATGCGGTACG GG	Cuantificar expresión gen SSHG_02804 clúster 14 *S. albus* J1074
	7RB1ind	T**GCGGCCGC**ACGTCGCCGCCCCGGT	
C21albind	**8A1ind**	AA**GGATCC**AACGCACACGGAAATAGGAA	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 21 *S. albus* J1074
	8B1ind	AA**GCGGCCGC**GTGTGTACCTCCAGGGAA G	
21R1ind	**8R1A1**	AA**GGATCC**ATGAAGGCGACGGAGACTTC GG	Cuantificar expresión gen SSHG_04927 clúster 21 *S. albus* J1074
	8R1B1ind	T**GCGGCCGC**ACGGTGCGTGGGGGGC	
21R2ind	**8R2A1**	TT**GGATCC**ATGACCCGGGTCCTCGTGGTC G	Cuantificar expresión gen SSHG_04931 clúster 21 *S. albus* J1074
	8R2B1ind	T**GCGGCCGC**ACCCCTGCGGGCGGCG	
21R3ind	**8R3A1**	TT**GGATCC**ATGCGCGTCGCGATCGCT	Cuantificar expresión gen SSHG_04948 clúster 21 *S. albus* J1074
	8R3B1ind	T**GCGGCCGC**ATTCGGATCTGTCGTGGAGT CTTTC	

C16CS227ind	**6A1CS227ind**	AA**GGATCC**GGTCAACTCCCTTCTGACCA	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 16 *S. sp.* CS227
	6B1CS227ind	AA**GCGGCCGC**CGTGAACTCTCCGGATATCTC	
C20CS227ind	**1A1ind**	AA**GGATCC**AATTCGAGGCGTGAAATGAG	Cuantificar expresión operón de genes biosintéticos clúster 20 *S. sp.* CS227
	1B1ind	AA**GCGGCCGC**GGTGAGGTGCGTGAAGGC	
Pauloind	**Pauloind fw**	AA**TCTAGA**GCAGCATCTACGAGCCCTAC	Cuantificar expresión clúster paulomicinas *S. albus* J1074
	Pauloind rv	AA**GCGGCCGC**TCAGAGCACCCGGTCGAG	

11.3. Condiciones de reacción de PCR

A lo largo de la tesis doctoral se han realizado numerosas reacciones de PCR, cada una de ellas bajo unas condiciones determinadas que optimicen el proceso. Para ello se han utilizado diferentes condiciones y diferentes tipos de polimerasa. En todos los casos el termociclador utilizado fue un SureCycler 8800 (Stratagene).

En cuanto a las condiciones de reacción las variaciones vienen dadas por la temperatura de hibridación óptima dependiente de la pareja de cebadores utilizada en cada caso, el tamaño de fragmento a amplificar y la posible formación de estructuras secundarias. Para estos casos se aplican cambios puntuales en el tiempo y temperatura de elongación, el número de ciclos o la temperatura de hibridación.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl. Las cantidades de ADN usados para amplificar usando como molde ADN genómico fueron de 1-5 ng/l y con ADN plasmídico de 0,00002-0,2 ng/l. Se empleó dimetil sulfóxido (DMSO) ya que dificulta la formación de estructuras secundarias y aumenta la eficiencia y especificidad de la reacción, disminuyendo la aparición de productos inespecíficos. Si se encuentra a altas concentraciones en la mezcla final puede inhibir la reacción, por lo que se añadió por defecto a una concentración final del 4% y en casos excepcionales a una concentración final nunca superior del 8%.

Las polimerasas empleadas han sido tres, la “Herculase II Fusion DNA Polymerase”, la “DreamTaq DNA Polymerase” y la “Terra Polymerase” (ClonTech), y su utilización en cada caso dependía de las características finales del producto de PCR que se desee obtener.

11.3.1. PCR para la obtención de fragmentos de ADN

“Herculase II Fusion DNA Polymerase” es una polimerasa de alta fidelidad con la que se pueden amplificar fragmentos con tamaños superiores a 10 kb, generando extremos romos. La gran mayoría de los fragmentos amplificados durante este trabajo presentan tamaños de entre 1 y 6 kb, por lo que las reacciones fueron preparadas como se recoge en la Tabla 15. Esta polimerasa fue utilizada para amplificar fragmentos de ADN tanto para los ensayos de obtención de mutantes, como de sobreexpresión.

11.3.2. PCR para la comprobación de cepas recombinantes

"DreamTaq DNA Polymerase" es una polimerasa de baja fidelidad con una capacidad de amplificación menor que la anterior, ya que sólo amplifica fragmentos de hasta 6 kb, dejando una adenina terminal no apareada en el extremo 3' terminal del fragmento. Su uso se restringió a reacciones de comprobación de cepas recombinantes por PCR, preparando las reacciones de amplificación según se detalla en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones empleadas para las reacciones de amplificación con las distintas polimerasas.

Componente de reacción	Herculase II	DreamTaq	Terra
ADN molde	100-400 ng ADN Cromosómico / 1-30 ng ADN plasmídico	0,1-1 µg ADN Cromosómico / 0,01-1 ng ADN plasmídico	5 µl
Oligonucleótido A	0,25 µM	0,2 µM	0,75 µl
Oligonucleótido B	0,25 µM	0,2 µM	0,75 µl
Buffer	5x	10x	12,5 µl
dNTPs	250 µM de cada dNTP	200 µM de cada dNTP	
DMSO	0-8%	3-8%	
H_2O MilliQ	Hasta 50 µl	Hasta 50 µl	5,7 µl
Polimerasa	1 µl	5 U	0,3 µl

"Terra Polymerase" es una polimerasa que permite ejecutar comprobaciones de PCR de construcciones genómicas realizadas en *Streptomyces* de forma rápida sin necesidad de extraer previamente ADN cromosómico a partir de micelio, cuyo proceso es lento y tedioso. El ADN molde se obtiene a partir de un choque térmico a 95°C durante 10 minutos de esporas suspendidas en 180 µL NaOH 20 mM (la reacción se detiene con 20 µL EDTA 50 mM). En la tabla 15 se muestran las condiciones de preparación de las reacciones de amplificación.

11.3.3. Programa de amplificación

El programa de amplificación estándar utilizado fue diferente en función de la polimerasa utilizada. Cada una de las etapas se encuentra detallada la Tabla 16:

Tabla 16. Programas de amplificación utilizados con cada polimerasa.

	ETAPA	Herculase II	DreamTaq
	Desnaturalización inicial	99.9°C / 2 min	95°C / 5 min
30 ciclos	**Desnaturalización**	99.9°C / 10 s	95°C / 30 s
	Anillamiento	55-62°C* / 20 s	55-62°C* / 30 s
	Elongación	72°C / 30 s por kb	72°C / 1 min por kb
	Elongación Final	72°C / 5 min	72°C / 10 min
	Fin de la reacción	4°C / ∞	4°C / ∞

*La temperatura de anillamiento varió de los 55 a los 62ºC según el fragmento a amplificar

	ETAPA	Terra
	Desnaturalización inicial	98°C / 2 min
40 ciclos	**Desnaturalización**	98°C / 10s
	Anillamiento y elongación	68°C / 1 min por kb

12. Secuenciación

12.1. Secuenciación de fragmentos de PCR y construcciones plasmídicas

Tanto los fragmentos de ADN clonados en plásmidos como los amplificados por PCR se purificaron de acuerdo a los procesos descritos y se enviaron a secuenciar junto con sus correspondientes parejas de oligonucleótidos de secuenciación al servicio de secuenciación de Macrogen Europe.

12.2. Análisis de las secuencias de ADN

Para el análisis de los resultados obtenidos de secuenciación se utilizaron diferentes programas bioinformáticos como “Sequence Scanner V1.0” (Applied Biosystems), “Vector NTI Advance™ Software” (Invitrogen) y “BLAST SEARCH” del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

13.Generación de mutantes

Todos los fragmentos de PCR obtenidos a lo largo de este trabajo para generar la totalidad de los mutantes se clonaron en primer lugar en el vector pCR-Blunt (Invitrogen) para poder secuenciarlos utilizando los oligonucleótidos universales M13 *forward* y M13 *reverse* y comprobar que las secuencias obtenidas no presentaban errores o ausencia de nucleótidos. Una vez corroborada la idoneidad de cada secuencia tras cada nueva clonación en un plásmido diferente se realizó una nueva comprobación mediante una digestión con enzimas de restricción.

13.1. Generación de mutantes por reemplazamiento génico

La técnica del reemplazamiento génico permite la inactivación específica de uno o varios genes en el genoma de la cepa silvestre. Se basa en la sustitución de una región de ADN del cromosoma silvestre por otro fragmento de ADN que confiera a la cepa recombinante un fenotipo diferente como por ejemplo resistencia a un antibiótico determinado. El esquema general del proceso se muestra en la siguiente figura (Figura 10).

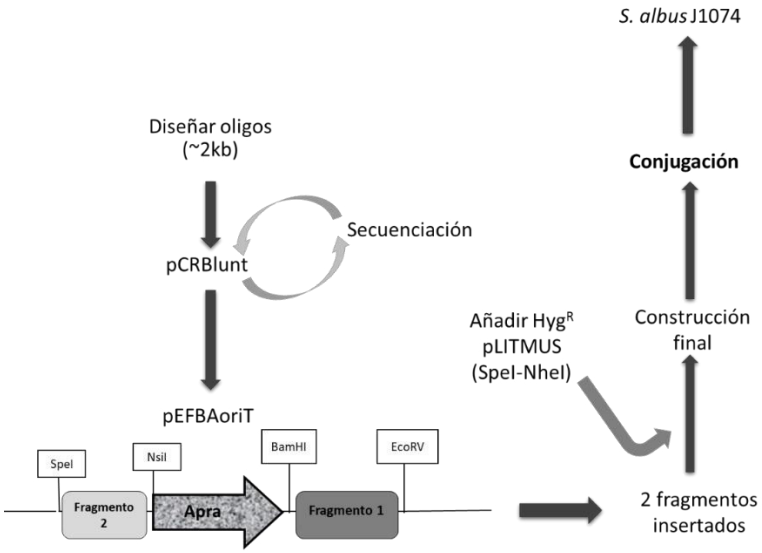


Figura 10. Esquema de los diferentes pasos a seguir para lograr generar un mutante por reemplazamiento génico.

El primer paso del proceso consiste en amplificar por PCR dos fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 - 2 kb adyacentes al fragmento a reemplazar (flanqueadas por sitios de restricción adecuados, en general oligo A/SpeI, oligo B/NsiI, oligo C/BamHI y oligo D/EcoRV) y clonarlos en el plásmido pBLUNT para después secuenciarlos y así corroborar que se trata de la región esperada. Cuanto mayor tamaño posea el fragmento de ADN amplificado que queda a ambos lados del gen (o genes) a mutar, mayor será la probabilidad de éxito del reemplazamiento ya que este hecho mejora la probabilidad de que tengan lugar las dos recombinaciones génicas requeridas.

Posteriormente se digiere cada fragmento con su respectiva pareja de enzimas de digestión SpeI-NsiI o XbaI-SpeI y se clonan secuencialmente en el plásmido conjugativo pEFBAoriT (Horna *et al.*, 2011) (Figura 11), un vector suicida (no replicativo en *Streptomyces* spp.), a los lados del gen de resistencia a apramicina (*acc(3)IV*) (Am^R), comprobando la introducción de cada fragmento mediante las digestiones de comprobación adecuadas en cada caso (utilizando también sitios de restricción internos). El vector pEFBAoriT además del gen de resistencia a apramicina también posee el gen de resistencia a ampicilina, el cual sólo selecciona para *E. coli*, por lo que previamente a realizar la conjugación con *Streptomyces* debe clonarse un gen de resistencia adicional, el gen de resistencia a higromicina, para corroborar junto con el gen de resistencia a apramicina que el proceso conjugativo ha sido satisfactorio y el doble sobrecruzamiento ha ocurrido.

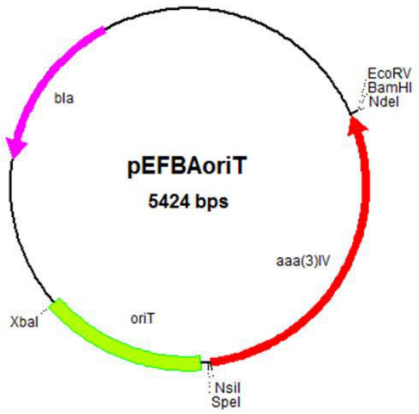


Figura 11. Mapa del plásmido pEFBAoriT con sus sitios de unión únicos.

Finalmente se abre la construcción final, una vez introducidos los dos fragmentos en su lugar, digiriendo con XbaI y se clona el gen de resistencia a higromicina obtenido del plásmido pLHyg como un fragmento de digestión SpeI-NheI, que son enzimas compatibles con XbaI (Figura 12). Una vez terminado este paso, la nueva construcción ya está lista para introducirla en *E. coli* ET12567 (pUB307) y, mediante conjugación, transferirla a *S. albus* J1074.

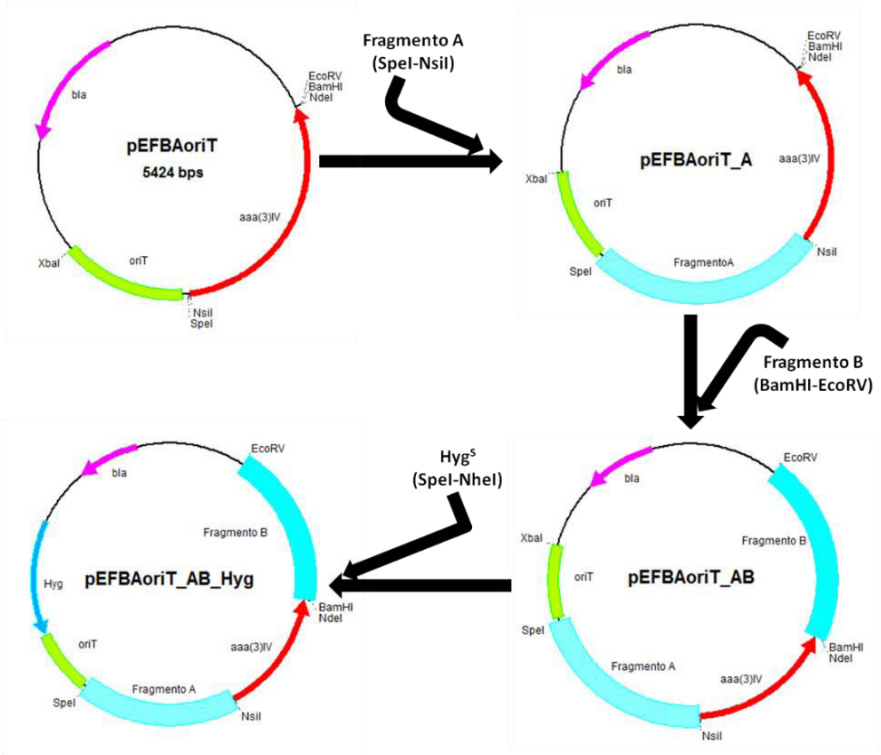


Figura 12. Diferentes construcciones plasmídicas para lograr la construcción final que permite el reemplazamiento génico de una región determinada.

La selección de los transconjugantes positivos se basó en su resistencia a apramicina (*acc(3)IV*) (Am^R) y su sensibilidad a higromicina (Am^R/Hyg^S) (Figura 13), lo que corrobora que se ha producido un doble sobrecruzamiento (Figura 14) a ambos lados de la región mutada y, por tanto, con la sustitución del gen de interés por el gen de resistencia a apramicina. En caso de presentar resistencia a ambos antibióticos solamente se habría producido un único sobrecruzamiento, lo que implicaría que todo el plásmido se habría incorporado al genoma.

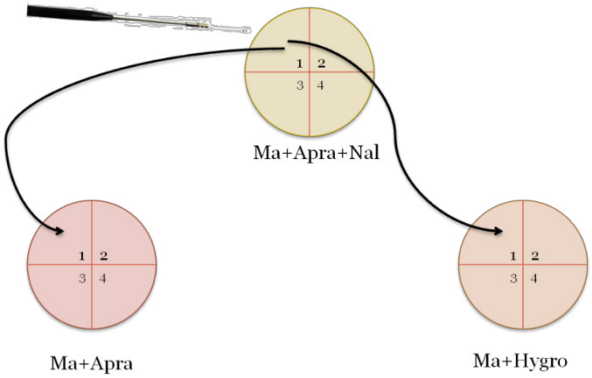


Figura 13. Pases en diferentes antibióticos que deben darse a cada colonia seleccionada para corroborar que se ha producido el doble sobrecruzamiento.

El mutante obtenido finalmente en *S. albus* J1074 posee el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) (Am^R) siempre que resulte posible en el mismo sentido de transcripción que el gen o genes reemplazados. Dicho gen tiene una característica muy útil, y es que al no poseer terminador de la transcripción generalmente no se producen mutaciones polares que afecten a la expresión de otros genes situados a continuación del que se desea mutar.

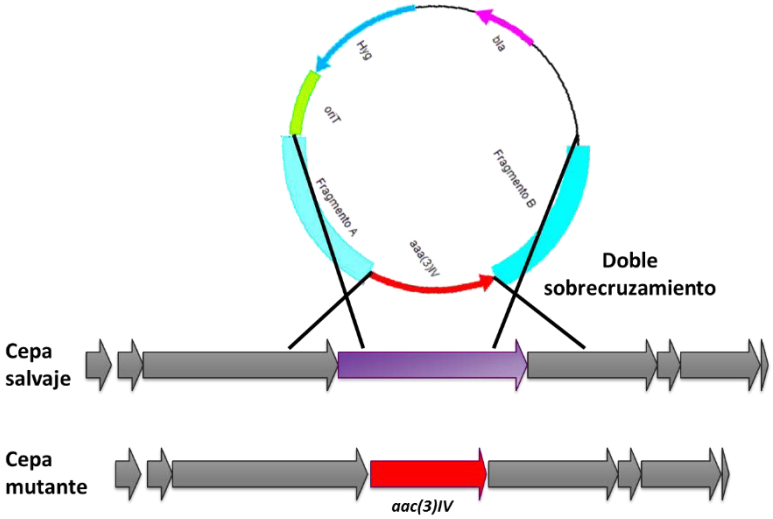


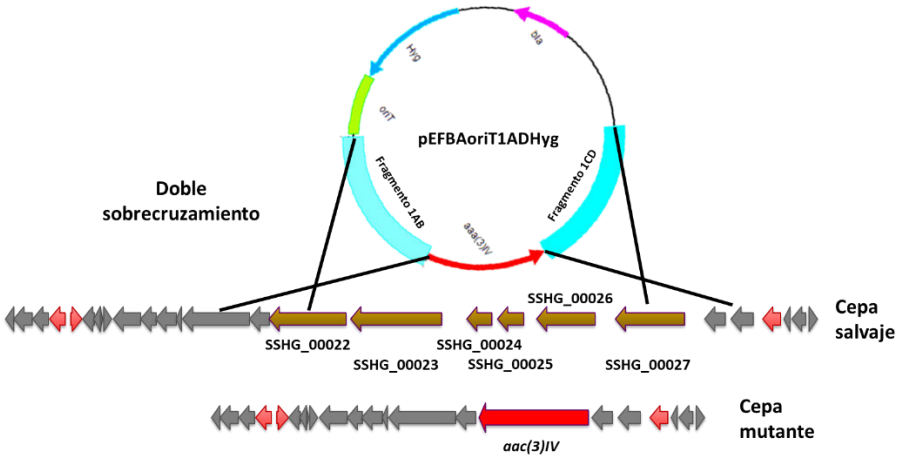
Figura 14. Proceso de doble sobrecruzamiento ocurrido durante la conjugación intergenérica.

Este método presenta la ventaja de que los mutantes obtenidos de esta forma son estables sin necesidad de mantener la presión de selección del antibiótico.

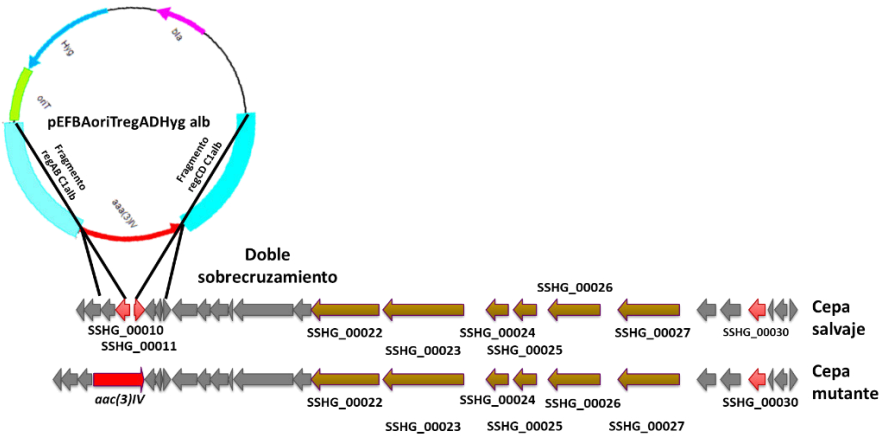
13.1.1. Mutantes en el clúster 1 de *S. albus* J1074

A lo largo de esta Tesis Doctoral en el agrupamiento génico 1 de *S. albus* J1074 se han efectuado diversos reemplazamientos génicos tanto de agrupaciones génicas como de genes de manera individual. Seguidamente se detalla cada una de las construcciones realizadas.

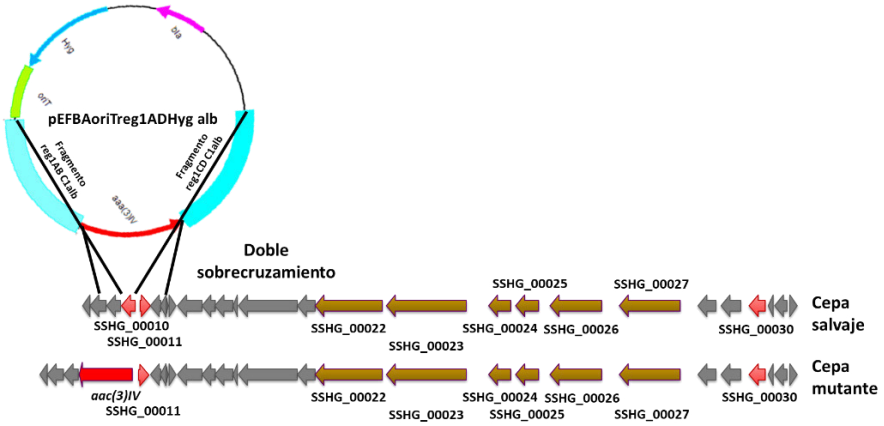
Mutante ΔC1: el objetivo de esta nueva construcción es reemplazar los genes biosintéticos desde SSHG_00022 hasta SSHG_00027 por el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV*.



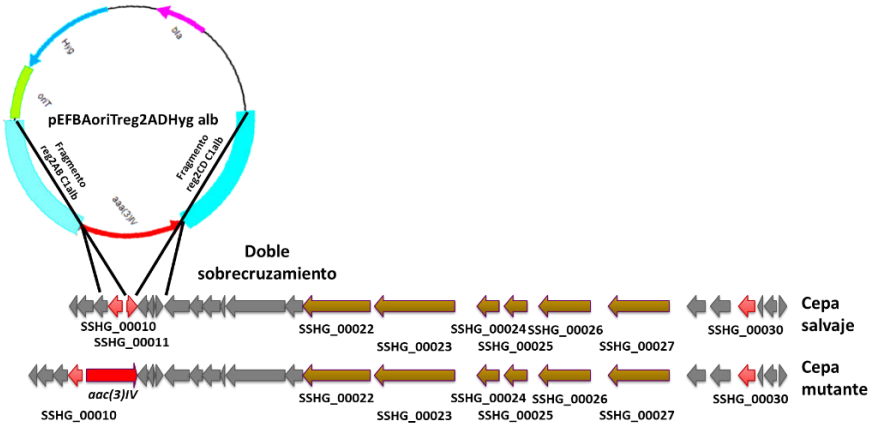
ΔregC1alb: gracias a esta construcción se obtuvo un mutante en el que los dos genes reguladores SSHG_00010 y SSHG_00011 que ocupan posiciones contiguas en el genoma sean reemplazados por el gen de resistencia a apramicina.



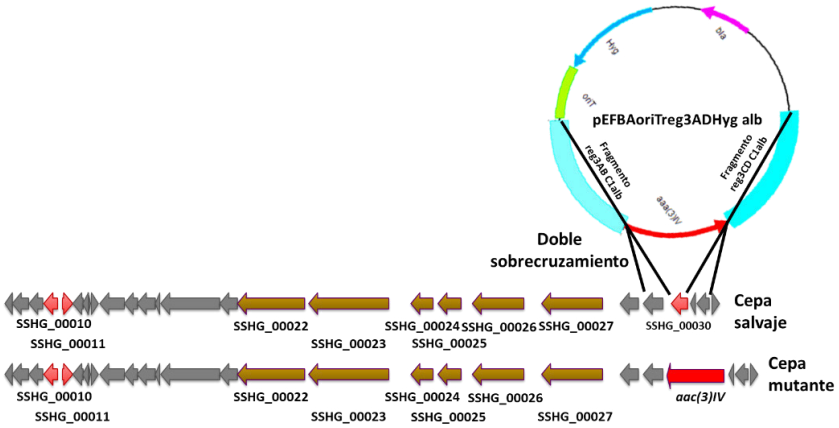
Δreg1C1alb: con esta construcción se consigue reemplazar el gen SSHG_00010 (regulador transcripcional TetR) por el gen *aac(3)IV*.



Δreg2C1alb: el nuevo mutante obtenido tiene insertado en su genoma el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV)* en el lugar que ocupaba en la cepa salvaje el gen regulador TetR (SSHG_00011).

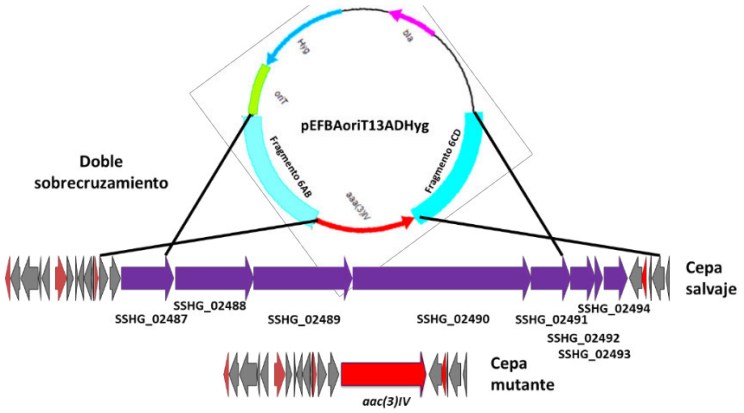


Δreg3C1alb: el gen reemplazado en este caso por el gen de resistencia a apramicina es el gen regulador SSHG_00030, del tipo LysR/GntR según las predicciones bioinformáticas obtenidas.



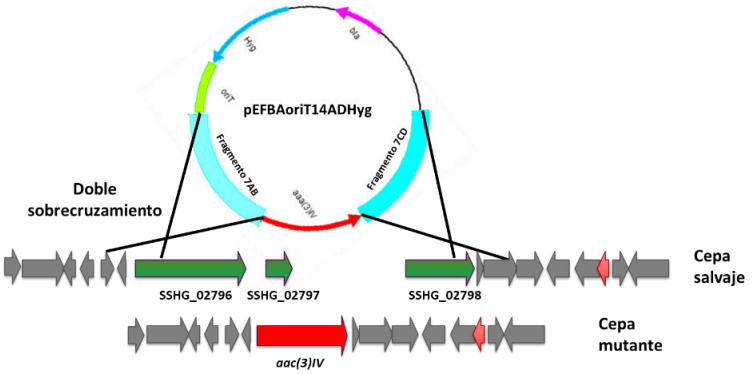
13.1.2. Mutantes en el clúster 13 de *S. albus* J1074

En este agrupamiento génico se diseñó el reemplazamiento génico con el fin de obtener el **Mutante ΔC13**, el cual tiene reemplazado el operón de genes biosintéticos que van desde el gen SSHG_02487 hasta el gen SSHG_02494 por el gen *aac(3)IV*.



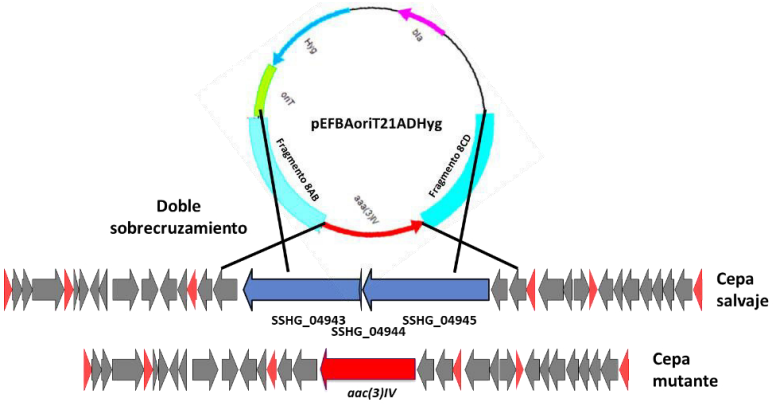
13.1.3. Mutantes en el clúster 14 de *S. albus* J1074

En este clúster se obtuvo el **mutante ΔC14** mediante una nueva construcción en la que se clonó el gen *aac(3)IV* substituyendo a los genes SSHG_02796, SSHG_02797 y SSHG_02798.



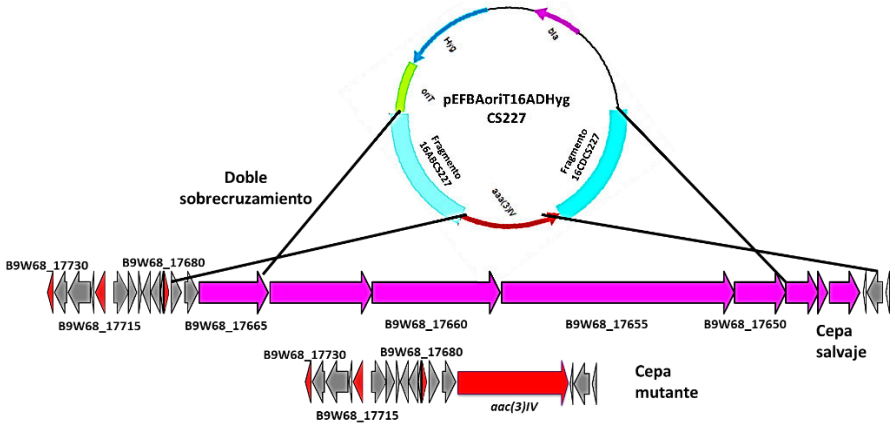
13.1.4. Mutantes en el clúster 21 de *S. albus* J1074

Para el clúster 21 se obtuvo el **mutante ΔC21** y en él los genes SSHG_04943, SSHG_04944 y SSHG_04945 fueron reemplazados por el gen de resistencia a apramicina.



13.1.5. Mutantes realizados en el clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227

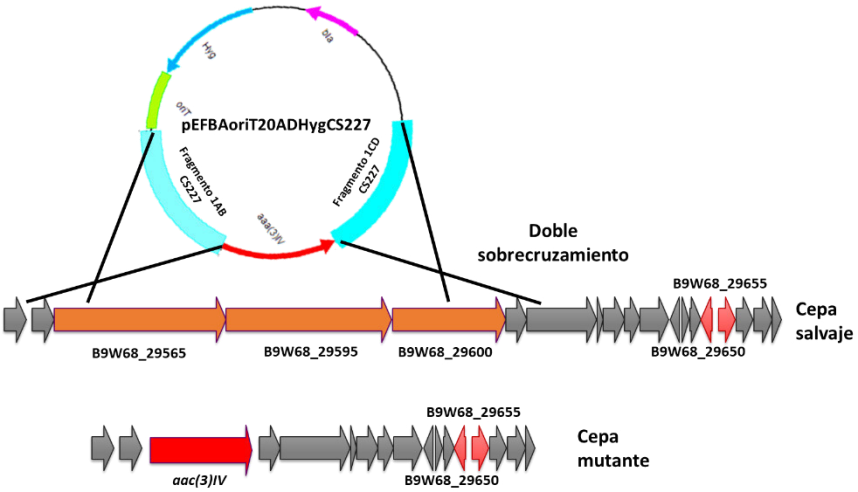
El objetivo para este clúster fue la obtención del **mutante ΔC16 CS227**, en el que se reemplazaron los genes NRPS B9W68_17650, B9W68_ 17655, B9W68_ 17660 y B9W68_17665 que forman un agrupamiento génico biosintético por el gen *aac(3)IV*.



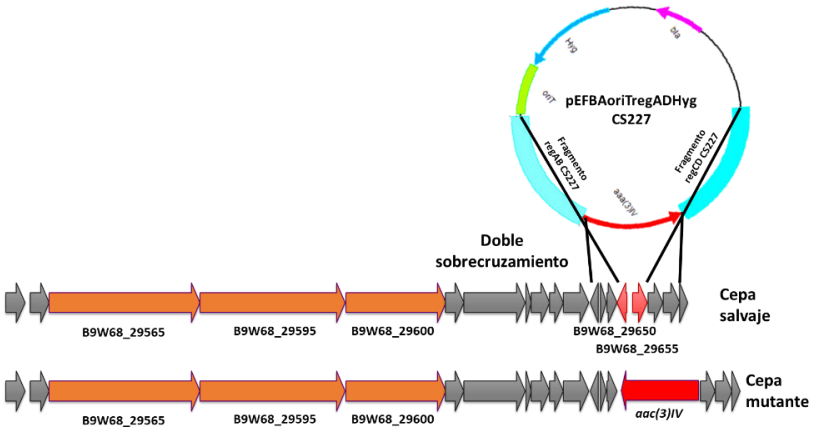
13.1.6. Mutantes realizados en el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227

En esta agrupación génica se llevaron a cabo varios reemplazamientos génicos tanto de genes de manera individual así como del operón de genes biosintéticos que contiene. Todos ellos se detallan a continuación.

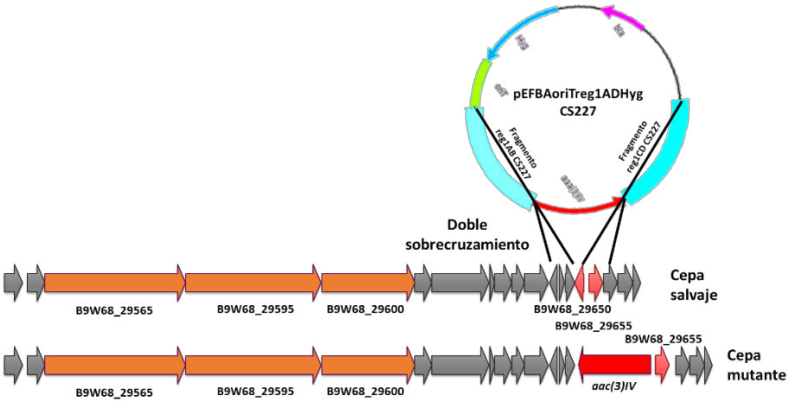
Mutante ΔC20 CS227: se reemplazó el agrupamiento de genes biosintéticos B9W68_29565, B9W68_ 29595 y B9W68_29600 por el gen *aac(3)IV*.



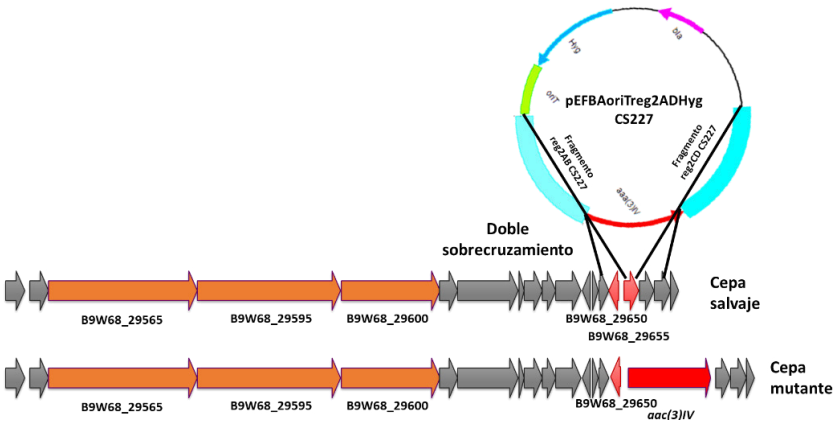
ΔregC20CS227: en esta construcción se reemplazan simultáneamente dos genes reguladores contiguos (B9W68_29650 y B9W68_29655) y en su lugar se inserta el gen de resistencia a apramicina.



Δreg1C20CS227: el gen B9W68_29650 (gen regulador de la familia TetR) se sustituye por el gen *aac(3)IV*.



Δreg2C20CS227: en esta construcción el gen de resistencia a apramicina se introduce en el lugar del gen B9W68_29655.



13.2. Generación de dobles mutantes por reemplazamiento génico

En algunos casos ha sido necesario realizar un reemplazamiento génico sobre una cepa que ya posee otro reemplazamiento génico diferente en alguna región de su cromosoma. Para estos casos hay que realizar pequeñas variaciones en el proceso establecido del nuevo reemplazamiento ya que si el gen de resistencia que se emplea para la sustitución coincide en ambos casos no sería válida la comprobación de la nueva construcción. Por tanto, se diseñó una nueva estrategia en la cual se pudieran aprovechar las construcciones ya realizadas en pEFBAoriT con ambos fragmentos clonados a cada lado del gen de resistencia a apramicina y el gen de resistencia a higromicina también clonado (Figura 15).

Con tal finalidad se extrajo, por digestión del plásmido, el gen de resistencia a apramicina (enzimas NsiI-NdeI) y fue reemplazado por el gen de resistencia a tioestreptona. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de resistencia a tioestreptona, obtenido por PCR a partir del plásmido pSETeTc (Cano-Prieto *et al.*, 2015), flanqueados por los mismos sitios de restricción con los que se extrae el gen de resistencia a apramicina. De esta manera una vez extraído el gen *aac(3)IV* y dejando abierta la construcción con los dos enzimas de restricción correspondientes en los extremos, mediante una ligación y posterior transformación podría introducirse fácilmente el gen de resistencia a tioestreptona.

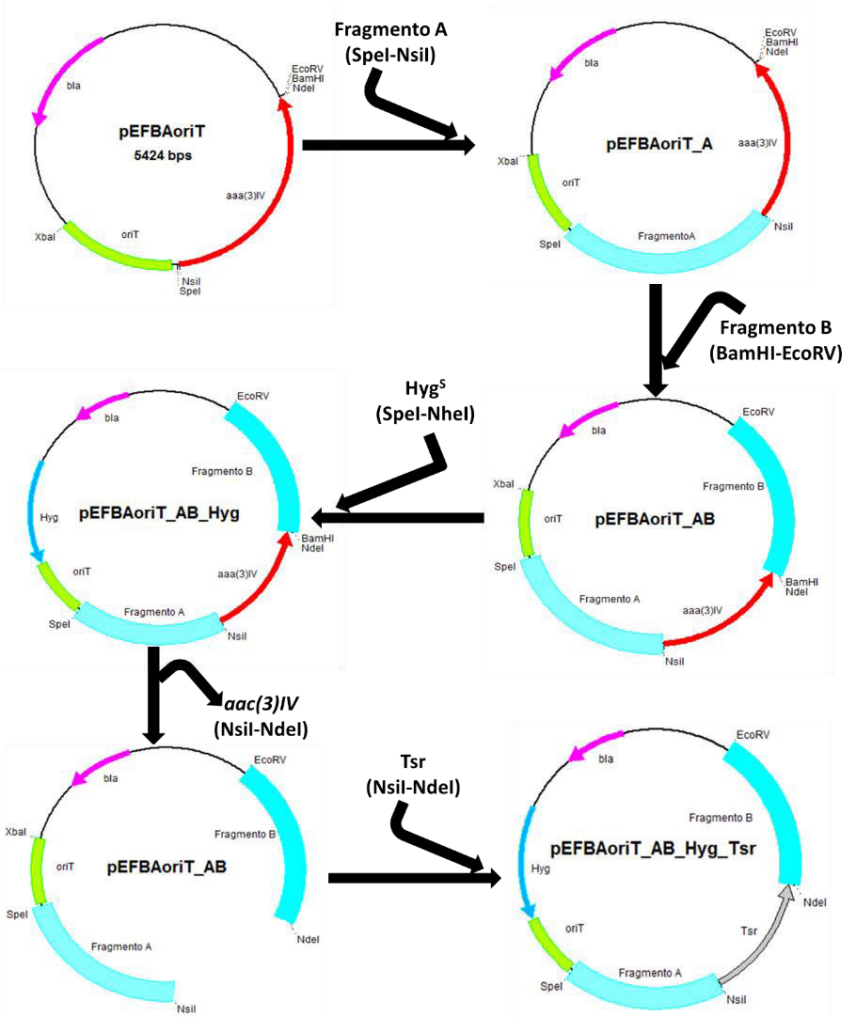


Figura 15. Esquema de los diferentes pasos a seguir para obtener dobles mutantes.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo dobles mutantes empleando las construcciones plasmídicas para realizar mutantes de los agrupamientos génicos 1, 14 y 21 de *S. albus* J1074 mostrados en el apartado anterior, reemplazando el gen de resistencia de apramicina por el gen de resistencia a tioestreptona, para finalmente conjugarlos con cepas mutantes de *S. albus* J1074 previamente realizadas en el grupo como son ΔB29 (mutante en el clúster de biosíntesis de paulomicinas), ΔAnt (mutante en el clúster de biosíntesis de antimicinas) y ΔCand (mutante en el clúster de biosíntesis de candicidinas) todas ellas detallas en el apartado 1 del capítulo de materiales y métodos. A continuación, se muestran los mutantes obtenidos en la siguiente tabla (Tabla 17).

Tabla 17. Cepas dobles mutantes realizadas durante la Tesis Doctoral.

Cepa mutante	Características de la nueva cepa
ΔC1ΔB29	Mutante por reemplazamiento en el clúster 1 y en el de paulomicinas
ΔC1ΔAnt	Mutante por reemplazamiento en el clúster 1 y en el de antimicinas
ΔC1ΔCand	Mutante por reemplazamiento en el clúster 1 y en el de candicidinas
ΔC14ΔB29	Mutante por reemplazamiento en el clúster 14 y en el de paulomicinas
ΔC14ΔAnt	Mutante por reemplazamiento en el clúster 14 y en el de antimicinas
ΔC14ΔCand	Mutante por reemplazamiento en el clúster 14 y en el de candicidinas
ΔC21ΔB29	Mutante por reemplazamiento en el clúster 21 y en el de paulomicinas
ΔC21ΔAnt	Mutante por reemplazamiento en el clúster 21 y en el de antimicinas
ΔC21ΔCand	Mutante por reemplazamiento en el clúster 21 y en el de candicidinas

14. Generación de construcciones plasmídicas

Todos los fragmentos de PCR obtenidos para generar las diferentes construcciones plasmídicas en este trabajo se clonaron en primer lugar en el vector pCR-Blunt (Invitrogen) para poder secuenciarlos y comprobar que las secuencias obtenidas no presentaban errores o ausencia de nucleótidos. A partir de este punto cada nueva clonación en un nuevo plásmido se comprobó mediante una digestión con enzimas de restricción.

Para lograr expresar de forma constitutiva un gen o un agrupamiento génico se han empleado varias estrategias basadas en variar el tipo de vector con el cual realizar la sobreexpresión.

14.1. Sobreexpresión génica con plásmido pOJ260p

Como primera estrategia de sobreexpresión génica se utilizó el plásmido pOJ260p (Figura 16), un plásmido integrativo (por recombinación homóloga) que supedita al gen o genes que se quieran sobreexpesar bajo el dominio del promotor del gen de resistencia a eritromicina

*ermE*p*, un promotor constitutivo y fuerte (Bibb *et al*., 1985). Esta estrategia fue empleada para intentar sobreexpresar tanto agrupaciones génicas biosintéticas, los cuatro agrupamientos génicos de estudio de *S. albus* J1074 y el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227, así como los genes reguladores de los cinco clústeres mencionados.

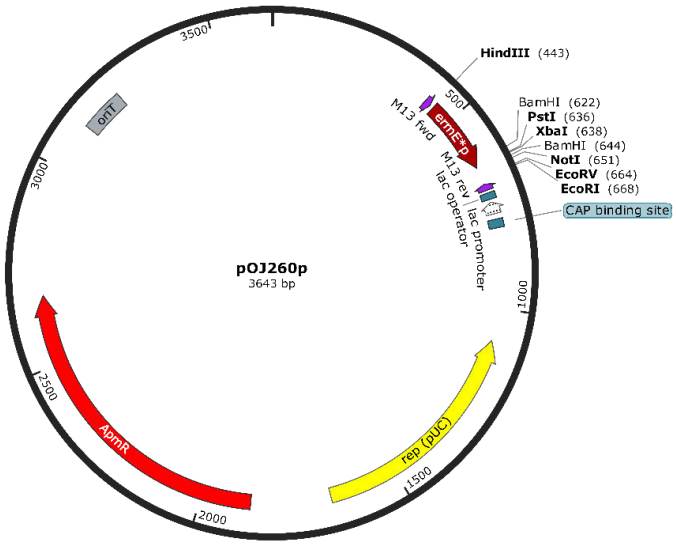


Figura 16. Mapa del vector pOJ260p.

Como algunas de las cepas en la que se planeó la sobreexpresión de ciertos genes eran cepas mutantes que ya disponían en su genoma del gen de resistencia a apramicina al haberles realizado previamente reemplazamiento génico de ciertos clústeres biosintéticos (ΔB29, ΔAnt y ΔCand), se diseñó un nuevo plásmido a partir del pOJ260p al cual se le clonó el gen de resistencia de higromicina, obtenido a por PCR a partir del vector pSETEcH, para que éste fuera su marcador de resistencia tanto en *E. coli* como en *Streptomyces* a la hora de confirmar que la construcción era válida. El nuevo plásmido **pOJ260pHyg**, y su mapa se muestra a continuación (Figura 17).

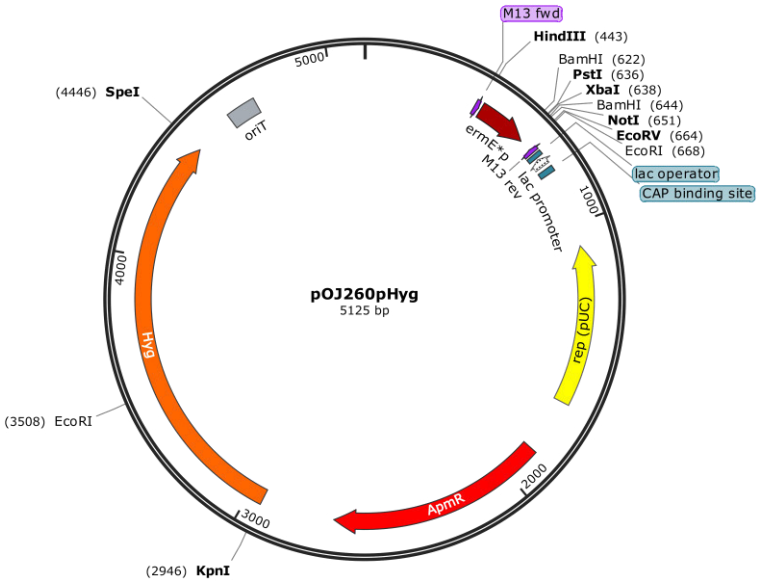


Figura 17. Mapa del vector pOJ260pHyg

Como primer paso se diseñan parejas de oligonucleótidos que flanqueen la región de interés al comienzo y al final, y en los extremos de los cebadores se añaden dianas de restricción PstI y XbaI respectivamente, sitios de corte que son únicos en el plásmido y que se encuentran situados en el *polylinker* anexo al promotor, de tal manera que se produzca la inserción de manera dirigida quedando el gen de interés en la dirección deseada con respecto a *ermE*p*. El fragmento de PCR obtenido se transforma en el vector comercial pCRBlunt para poder secuenciarlo de manera sencilla empleando los cebadores universales *M13fw* y *M13rv*.

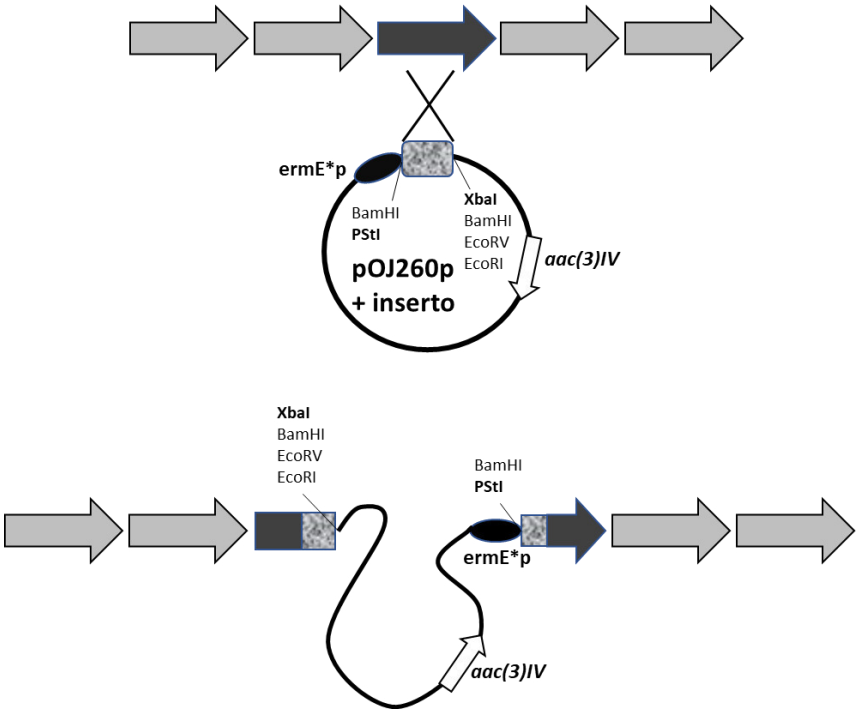


Figura 18. Sobreexpresión de genes mediante el vector pOJ260p.

Una vez comprobado por secuenciación que la secuencia amplificada se conserva sin variaciones se digiere la construcción con los enzimas PstI y XbaI, se purifica la banda de un gel de agarosa y seguidamente se somete a los procesos de ligación y posterior transformación con el plásmido pOJ260p previamente linealizado al digerirlo con los mismos enzimas de restricción (Figura 18). La construcción final se comprueba mediante digestión empleando enzimas que aseguren la correcta ubicación del fragmento dentro del vector.

Como último paso se procedió a la electroporación de la construcción plasmídica con células electrocompetentes pUB-s para así poder transferirla por conjugación a *S. albus* J1074.

Los agrupamientos génicos y los genes reguladores que han sido sobreexpresados siguiendo este método de trabajo se muestran a continuación (Tabla 18).

Tabla 18. Sobreexpresiones realizadas.

Construcción final	Gen / agrupamiento génico sobreexpresado	Función	Tamaño fragmento
pOJ260eC1	Clúster 1	PKSI-NRPS	1617
pOJ260eHygC1ΔB29	Clúster 1	PKSI-NRPS	1617
pOJ260eHygC1ΔAnt	Clúster 1	PKSI-NRPS	1617
pOJ260e1R1	SSHG_00010	Regulador transcripcional TetR	858
pOJ260e1R2	SSHG_00011	Regulador transcripcional TetR	651
pOJ260e1R3	SSHG_00030	Proteína hipotética LysR/GntR	1014
pOJ260eC13	Clúster 13	NRPS	1893
pOJ260e13R1	SSHG_02473	Regulador transcripcional de dos componentes LuxR	612
pOJ260e13R2	SSHG_02477	Proteína reguladora	984
pOJ260e13R3	SSHG_02484	Regulador transcripcional GntR	417
pOJ260eC14	Clúster 14	NRPS	1595
pOJ260eHygC14ΔB29	Clúster 14	NRPS	1595
pOJ260eHygC14ΔAnt	Clúster 14	NRPS	1595
pOJ260eHygC14ΔCand	Clúster 14	NRPS	1595
pOJ260e14R	SSHG_02804	Regulador transcripcional ARSR	354
pOJ260eC21	Clúster 21	NRPS	1229
pOJ260eHygC21ΔB29	Clúster 21	NRPS	1229
pOJ260eHygC21ΔAnt	Clúster 21	NRPS	1229
pOJ260e21R1	SSHG_04927	Regulador transcripcional TetR	645
pOJ260e21R2	SSHG_04931	Regulador transcripcional	696
pOJ260e21R3	SSHG_04948	Regulador transcripcional de dos componentes	672
pOJ260eC20CS227	Clúster 20 CS227	PKSI-NRPS	1583

14.2. Sobreexpresión de genes reguladores con plásmido multicopia pEM4T

Otra forma para sobreexpresar genes reguladores seleccionados en cada uno de los cuatro agrupamientos génicos en estudio en esta Tesis Doctoral se basó en emplear un vector multicopia como es el vector pEM4T (Menéndez *et al*. 2006), en el que el gen de interés se sitúa bajo el control de *ermE*p*.

El vector pEM4T (Figura 19) es conjugativo (origen de transferencia *oriTRP4*) y confiere resistencia a ampicilina (tanto para *E. coli* como para *Streptomyces*) y a tioestreptona (para *Streptomyces*).

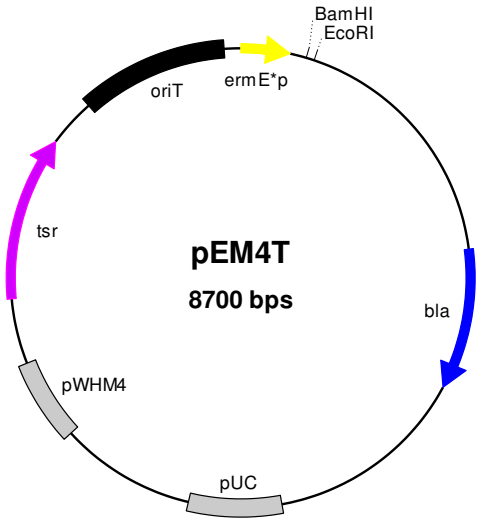


Figura 19. Mapa del vector pEM4T

Los cebadores para llevar a cabo las PCR se diseñaron flanqueando los genes que se pretendieron sobreexpresar añadiendo en sus extremos las dianas BamHI (en el oligonucleótido del comienzo del gen) y EcoRI (en el oligonucleótido del final del gen) para que así la posterior introducción delante del promotor sea dirigida. Una vez realizada la amplificación la banda obtenida se purificó y se clonó en el plásmido pCRBlunt para su secuenciación. Una vez comprobado por secuenciación que el fragmento no posee fallos en su secuencia se extrajo del vector por medio de una digestión BamHI-EcoRI y se clonó en el vector pEM4T previamente linealizado mediante la misma digestión. La construcción final se comprueba mediante digestión empleando enzimas que aseguren ubicación del fragmento dentro del vector sea la correcta. Finalmente se efectuó una electroporación de la construcción plasmídica con células electrocompetentes pUB-s para seguidamente conjugar con *S. albus* J1074. A continuación, se muestran todas las construcciones obtenidas por este método, indicando los genes sobreexpresados y su función.

Tabla 19. Sobreexpresiones llevadas a cabo con el vector pEM4T.

Construcción final	Gen	Función	Tamaño fragmento
pEM4T1R1	SSHG_00010	Regulador transcripcional TetR	858
pEM4T1R2	SSHG_00011	Regulador transcripcional TetR	651
pEM4T13R1	SSHG_02473	Regulador transcripcional de dos componentes LuxR	612
pEM4T13R2	SSHG_02477	Proteína reguladora	984
pEM4T13R3	SSHG_02484	Regulador transcripcional GntR	417
pEM4T14R	SSHG_02804	Regulador transcripcional ARSR	354
pEM4T21R1	SSHG_04927	Regulador transcripcional TetR	645
pEM4T21R2	SSHG_04931	Regulador transcripcional	696
pEM4T21R3	SSHG_04948	Regulador transcripcional de dos componentes	672

14.3. Sobreexpresión de genes reguladores con plásmido integrativo pSET152Ec

Por último, también se trató de sobreexpresar los genes reguladores citados en el apartado anterior empleando el vector pSET152Ec (Figura 20), que porta el promotor *ermE*P* y presenta como características principales el ser un plásmido integrativo en una región concreta del cromosoma de *Streptomyces* (región *attB*) gracias al gen de la integrasa y también poseer resistencia a apramicina tanto para *E. coli* como para *Streptomyces*.

Para llevar a cabo las construcciones plasmídicas se aprovecharon los mismos fragmentos de PCR empleados para la sobreexpresión con el plásmido PEM4T los cuales se clonaron en el vector pSET152Ec de la misma manera que en el caso anterior utilizando las dianas de restricción BamHI y EcoRI, para lograr que cada fragmento se insertara en el plásmido de manera dirigida delante de *ermE*p*.

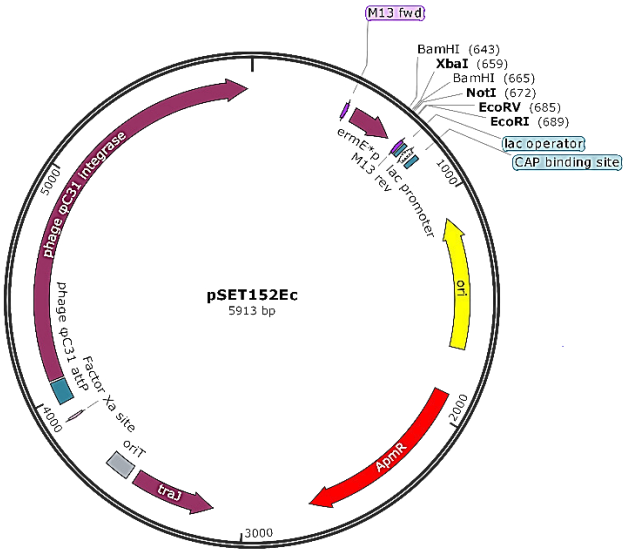


Figura 20. Mapa del plásmido pSET152Ec

Seguidamente se detallan las construcciones plasmídicas obtenidas y los genes reguladores sobre los que se ha trabajado así como sus características funcionales (Tabla 20).

Tabla 20. Sobreexpresiones llevadas a cabo con el plásmido pSET152Ec.

Construcción final	Gen	Función	Tamaño fragmento
pSET152Ec1R1	SSHG_00010	Regulador transcripcional TetR	858
pSET152Ec1R2	SSHG_00011	Regulador transcripcional TetR	651
pSET152Ec13R1	SSHG_02473	Regulador transcripcional de dos componentes LuxR	612
pSET152Ec13R2	SSHG_02477	Proteína reguladora	984
pSET152Ec13R3	SSHG_02484	Regulador transcripcional GntR	417
pSET152Ec14R	SSHG_02804	Regulador transcripcional ARSR	354
pSET152Ec21R1	SSHG_04927	Regulador transcripcional TetR	645
pSET152Ec21R2	SSHG_04931	Regulador transcripcional	696
pSET152Ec21R3	SSHG_04948	Regulador transcripcional de dos componentes	672

14.4. Cuantificación de la expresión de uno o varios genes

Como punto de partida en el estudio del clúster 9 de *S. albus* J1074 se quiso definir si el gen SSHG_00313 es el único de los genes pertenecientes en esa agrupación génica involucrado en la síntesis del pigmento indigoidina. Para ello se diseñó un experimento en el que por un lado se reemplaza el gen SSHG_00313 por un gen de resistencia a tioestreptona (Tsr) y por otro lado por el gen de resistencia a tioestreptona (Tsr) más el promotor del gen de resistencia a eritromicina *ermE*p* (Figura 21), siguiendo la misma estrategia que la empleada para la generación de mutantes por reemplazamiento explicada en el apartado 13.1. utilizando el plásmido pEFBAoriT pero aplicando algunas modificaciones.

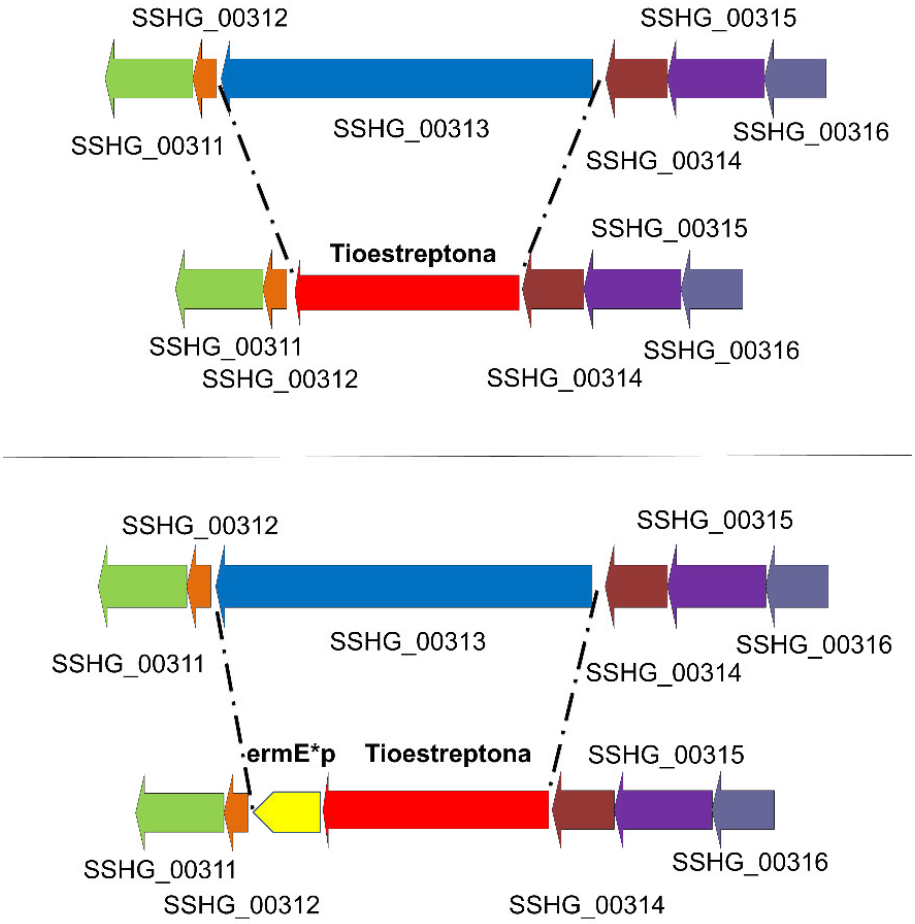


Figura 21. Reemplazamientos diseñados del gen SSHG_00313

En primer lugar, se crearon dos plásmidos nuevos partiendo de uno ya existente como es el vector pUK21 (Vieira J. *et al.,* 1991). Estos nuevos plásmidos se denominaron **pUK21Tsr** y **pUK21TsrE** (Figura 22), teniendo insertado el gen Tsr o el gen Tsr más *ermE*p* aguas abajo respectivamente, y añadiendo a los lados de los nuevos insertos sitios de restricción de manera que actúen como *polylinker* donde poder insertar posteriormente fragmentos adyacentes al fragmento que se desea reemplazar.

Una vez se consiguieron crear los dos nuevos plásmidos el primer paso en cada uno de ellos fue introducir secuencialmente a los lados del gen de resistencia a tioestreptona los dos fragmentos de PCR flanqueantes del gen que se pretendía reemplazar gracias a las enzimas de restricción añadidas en los extremos de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 13).

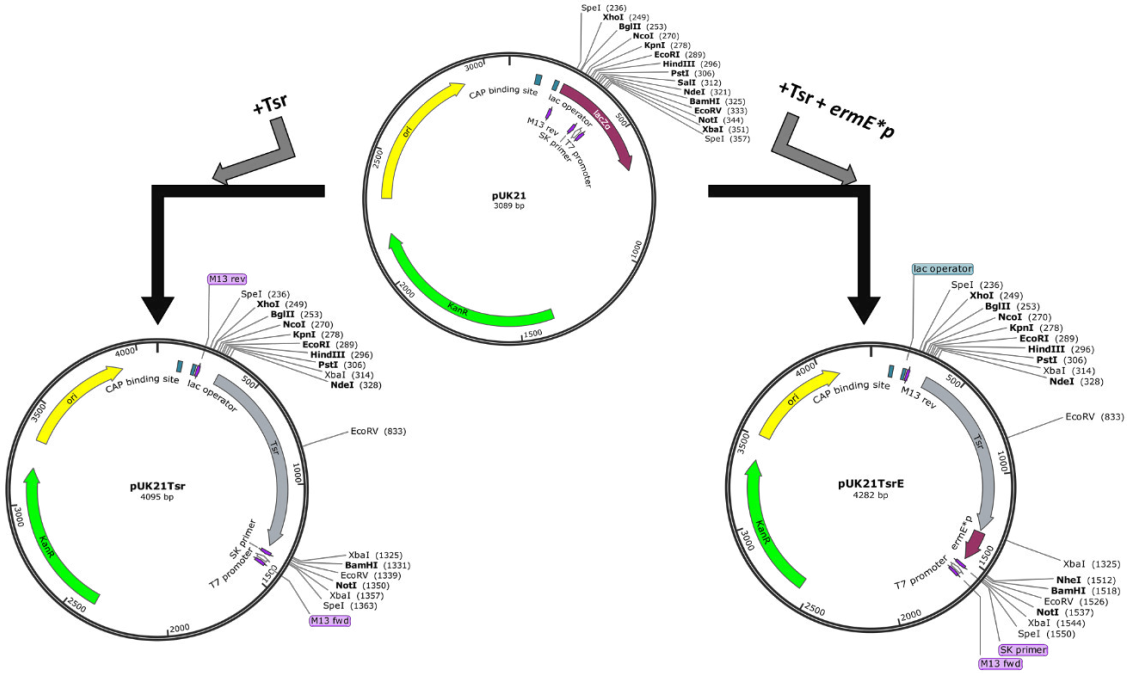


Figura 22. Mapas de los vectores pUK21Tsr y pUK21TsrE

Tras clonar ambos fragmentos en la posición deseada en cada uno de los dos plásmidos se extrajo por digestión con el enzima de digestión SpeI el *cassette* de interés, formado por el gen Tsr y los dos fragmentos de PCR flanqueándolo, y se introduce en el vector pEFBAoriT (Figura 23) previamente digerido con el mismo enzima de restricción SpeI. Una vez introducido el inserto en pEFBAoriT ya tendríamos finalizado el plásmido para conjugarlo con *S. albus* J1074 y generar los mutantes por reemplazamiento del gen SSHG_00313 por el gen de resistencia a tioestreptona en el mismo sentido de transcripción que el gen reemplazado. Para comprobar si en los transconjugantes se había producido doble sobrecruzamiento a ambos lados de la región mutada se confirmó resistencia a tioestreptona (Tsr) y sensibilidad a apramicina (*acc(3)IV*) (Am^R).

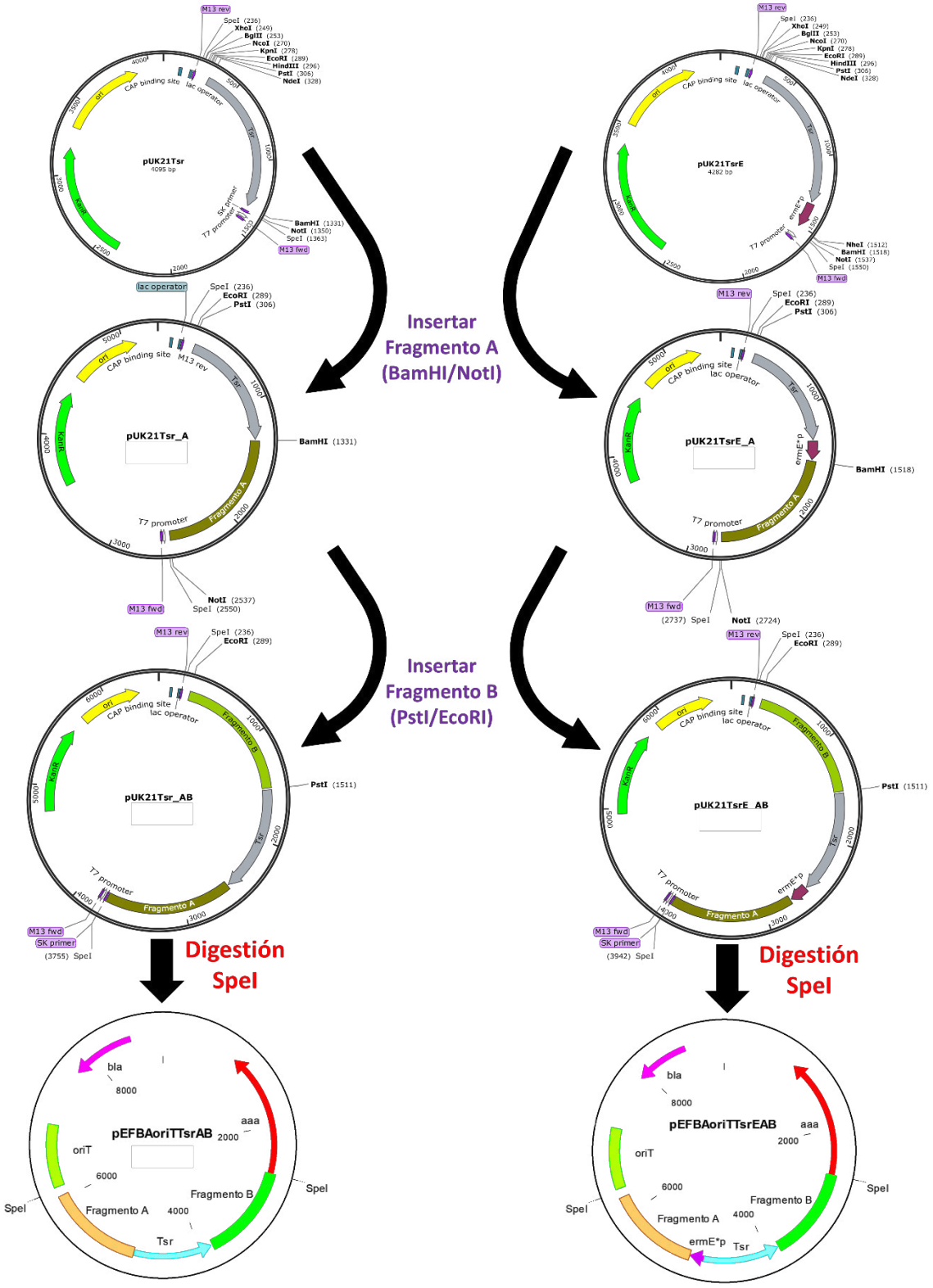


Figura 23. Sucesivas clonaciones para lograr las construcciones pEFBAoriTTsrAB y pEFBAoriTTsrEAB.

Una vez confirmado que los transconjugantes son positivos se cultivaron tanto en medio sólido (MA y R5A) como en medio líquido (R5A) para comprobar si se produce indigoidina y determinar si el gen SSHG_00313 es el único involucrado en su síntesis.

La confirmación de la premisa inicial se realizó generando un nuevo plásmido partiendo del pSET152Ec insertando el gen SSHG_00313 delante del promotor *ermE*p,* al cual se le denominó **pSET152Ec_ind** (Figura 24). El siguiente paso fue conjugarlo con ambos mutantes ΔSSHG_00313 y ΔSSHG_00313+*ermE*p* para regenerar el sistema inicial de la cepa salvaje con todos los genes que componen el clúster presentes pero con el gen SSHG_00313 bajo el control del *ermE*p* insertado en otro lugar del cromosoma. En caso de ambos mutantes complementados sintetizaran indigoidina se corroboraría de manera definitiva que el único gen encargado de la síntesis del pigmento es el SSHG_00313.

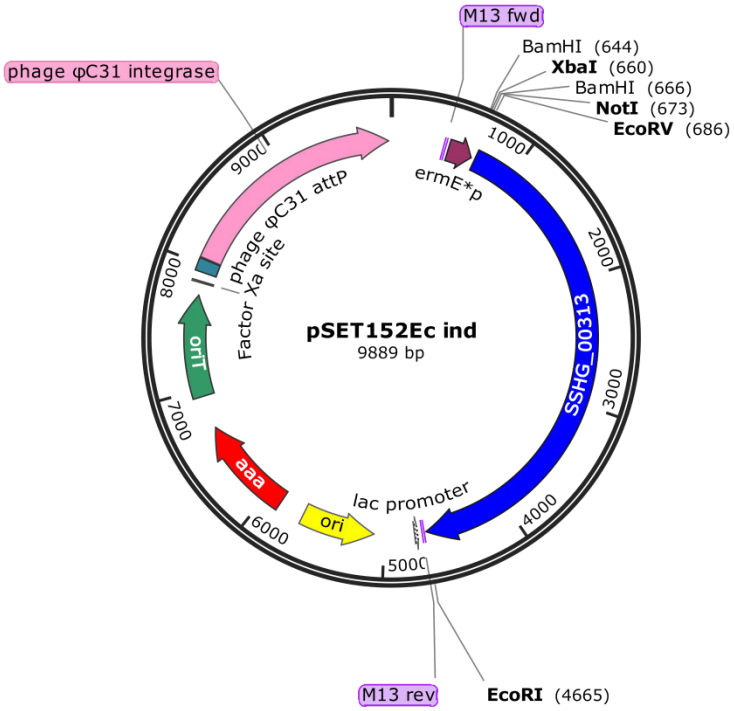


Figura 24. Mapa del vector pSET152Ecind

14.4.1. Generación de un plásmido testigo

Una vez corroborado que el gen SSHG_00313 es el único estrictamente necesario para la síntesis de indigoidina se pasó a diseñar la construcción de un plásmido conteniendo este gen como sistema testigo del nivel de expresión de diferentes promotores.

El plásmido ideado posee el gen SSHG_00313 insertado en el plásmido pOJ260 (Bierman *et al.*, 1992). Para facilitar la posibilidad de insertar una amplia variedad de promotores los oligonucleótidos diseñados para amplificar a partir de *S. albus* J1074 fueron diseñados teniendo en sus extremos los enzimas de restricción EcoRV en el oligonucleótido que amplifica desde el comienzo del gen) y EcoRI (para el oligonucleótido que amplifica desde el final del gen en sentido reverso) para así poder mantener un *polylinker* con varios sitios de unión posibles. Amplificado por PCR y comprobado por secuenciación se digirió el fragmento de PCR con los dos

enzimas mencionados y se transformó con el plásmido pOJ260, también previamente linealizado digiriéndolo con EcoRV y EcoRI (Figura 25).

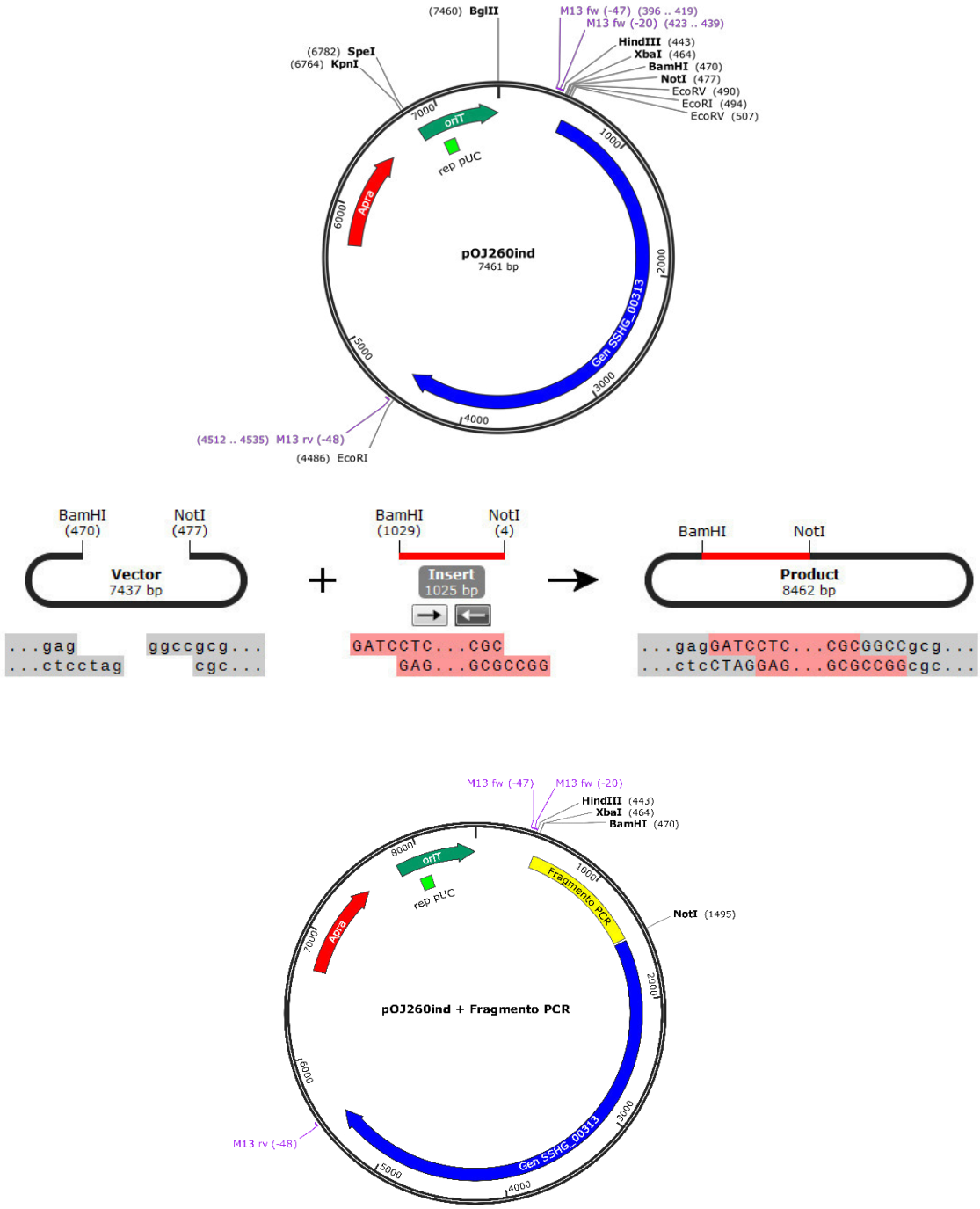


Figura 25. Mapa del vector pOJ26oind y posterior forma de clonación del fragmento de interés.

14.4.2. Cuantificación de la expresión de genes y agrupaciones génicas biosintéticas

Para la cuantificación del nivel de expresión de los promotores de genes reguladores se diseñó una pareja de oligonucleótidos que amplificara la totalidad de cada uno de ellos,

añadiendo enzimas de restricción en las colas. De esta manera a la hora de clonar el fragmento éste puede insertarse de una manera dirigida dentro del plásmido y así encontrarse tanto en la posición como en la dirección que más interesa para el ensayo. Por tanto, al oligonucleótido del comienzo del gen se le añadió el enzima BamHI y al del final del gen el enzima NotI. Con esto se logra que el final del promotor en estudio sea seguido por el comienzo del gen SSHG_00313 para que así éste pueda actuar como testigo de su nivel de expresión.

A continuación, se clonó el fragmento obtenido por PCR con el vector comercial pCRBlunt y una vez insertado se secuenció con los oligonucleótidos universales *M13fw* y *M13rv*. Tras comprobar que la polimerasa no ha insertado errores en la secuencia amplificada, éste se extrae del plásmido por digestión con las enzimas de restricción que añadidos en las colas de los oligonucleótidos (BamHI y NotI). El plásmido pOJ260ind también se digiere con esos mismos enzimas para linealizarlo y clonar el fragmento de PCR, de manera dirigida con lo que se consigue que el inserto se sitúe en la posición y dirección deseadas dentro del plásmido.

En la tabla 21 se muestran los diferentes promotores de genes reguladores pertenecientes a los cuatro agrupamientos génicos biosintéticos estudiados en esta Tesis Doctoral cuyos niveles de expresión se pretenden medir por cuantificación en este ensayo así como sus características principales.

Tabla 21. Genes pertenecientes a *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* CS227 a los que se ha situado delante de su promotor el gen SSHG_00313 para poder cuantificar su expresión.

Construcción final	Gen / agrupamiento génico	Función	Tamaño fragmento
C1ind	Clúster 1	PKSI-NRPS	1617
1R1ind	SSHG_00010	Regulador transcripcional TetR	858
1R2ind	SSHG_00011	Regulador transcripcional TetR	651
1R3ind	SSHG_00030	Proteína hipotética LysR/GntR	1014
C13ind	Clúster 13	NRPS	1893
13R1ind	SSHG_02473	Regulador LuxR	612
13R2ind	SSHG_02477	Proteína reguladora	984
13R3ind	SSHG_02484	Regulador transcripcional GntR	417
C14ind	Clúster 14	NRPS	1595
14Rind	SSHG_02804	Regulador transcripcional ARSR	354
C21ind	Clúster 21	NRPS	1229
21R1ind	SSHG_04927	Regulador transcripcional TetR	645
21R2ind	SSHG_04931	Regulador transcripcional	696
21R3ind	SSHG_04948	Regulador transcripcional de dos componentes	672
C16CS227ind	Clúster 16 *CS227*	NRPS	2273
C20CS227ind	Clúster 20 *CS227*	PKSI-NRPS	1583
Pauloind	Clúster paulomicinas	Desoxiazúcares	1162

Protocolo de la cuantificación del nivel de expresión de promotores

1. Preparar preinóculos en medio TSB (con antibiótico de selección) durante 24 horas a 30°C y 250 rpm.
2. Pasadas 24 horas medir la densidad óptica (DO) a 600nm y ajustar cantidad de preinóculo en función de su DO para pasar a matraces de 250ml con 50ml de medio de cultivo R5A (o el medio de cultivo seleccionado en cada caso) cada uno.
3. Tomar muestras de 4ml cada 24 horas, centrifugarlas durante 5 minutos a 4400rpm y recoger 1ml del sobrenadante en cubeta de espectrofotometría.
4. Medir a DO_{590} (longitud de onda para medir el espectro del azul de la indigoidina expulsada fuera de las células) ya que tras centrifugar se ha comprobado que los pellets quedan totalmente blancos indicando que toda la indigoidina es secretada al medio de cultivo. En caso de que la DO supere el valor de 1 hacer diluciones ya que suele indicar saturación de la muestra y genera errores en la medición y seguidamente multiplicar el valor en función de la dilución hecha.
5. Hacer una gráfica en la que el eje Y represente el valor de DO_{590} obtenido y el eje X el día en que se ha tomado la muestra. De esta manera puede seguirse la evolución del nivel de expresión de un promotor a lo largo del tiempo.

14.4.3. Plásmido pOJ260ind_H

Para los casos en que en las cepas en que se quiera medir el nivel de expresión de alguno de sus genes se haya insertado previamente el gen de resistencia a apramicina (como en el caso de mutantes y dobles mutantes por reemplazamiento génico realizados en esta Tesis Doctoral) se usó una construcción alternativa. Ésta se generó utilizando los oligonucleótidos HygKpnI fw y HygSpeI rv que se habían diseñado para amplificar el gen de resistencia a higromicina añadiendo en sus extremos los enzimas de restricción KpnI y SpeI respectivamente. De este modo, linealizando el vector pOJ260ind tras digestión con los mencionados enzimas se pudo insertar el gen Hyg y el plásmido resultante denominado pOJ260ind_H (Figura 26) ya fue válido para cepas que posean el gen *aac(3)IV* (Am^R) insertado en su cromosoma.

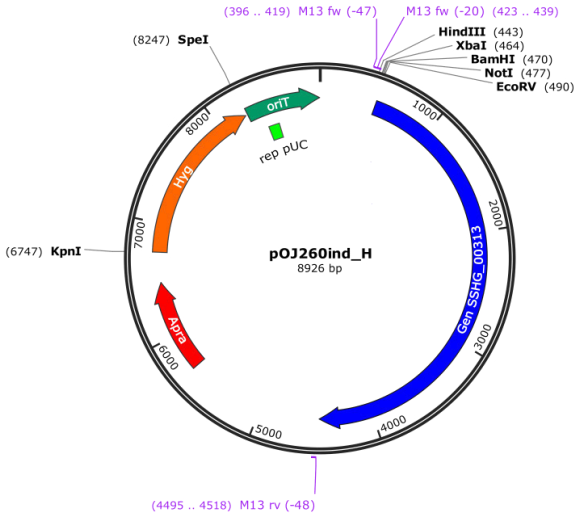


Figura 26. Mapa del vector pOJ260ind_H

14.4.4. Plásmido pOJ260ind_t

Este plásmido fue diseñado para poder comprobar si el gen SSHG_00315 (codifica un transportador de tipo ABC) afecta a la secreción de indigoidina al medio de cultivo. Este gen no se encuentra presente en algunos de los agrupamientos génicos encargados de la síntesis del pigmento en diferentes especies en los que se ha identificado (Figura 9). El diseño consistió en clonar el gen transportador aguas arriba del gen SSHG_00313 de manera dirigida gracias a los enzimas XbaI y EcoRV añadidos en los extremos de cada uno de los cebadores utilizados para amplificar el gen. Además, al lado de XbaI también se añadió el enzima NdeI para así disponer de sitios de restricción adicionales en el *polylinker* donde poder insertar fragmentos adicionales.

Tras amplificar el fragmento y clonarlo en el vector pCRBlunt se secuenció para comprobar que no se habían insertado errores en su secuencia durante la amplificación. Luego se linealizó el plásmido y se extrajo el fragmento de PCR digiriendo con los enzimas XbaI y EcoRV. Posteriormente este fragmento se clonó en el plásmido pOJ260ind digerido con los mismos enzimas para obtener el plásmido final pOJ260ind_t (Figura 27).

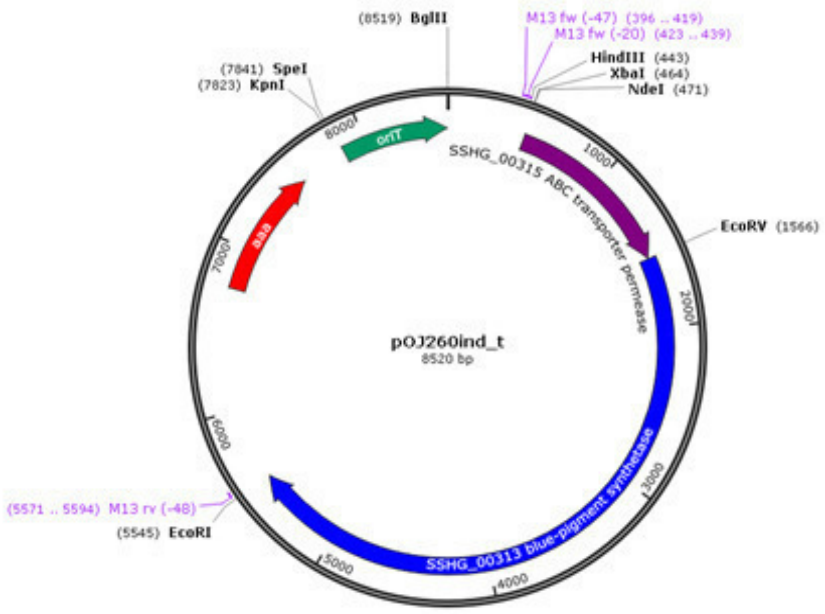


Figura 27. Mapa del vector pOJ260ind_t

14.4.5. Plásmido pOJ260ind_t_H

Al igual que se procedió para el plásmido pOJ260ind se diseñó un nuevo plásmido que fuera útil para cepas que ya tuvieran resistencia a apramicina siguiendo el mismo proceso. Se linealizó el vector pOJ260ind_t digiriendo con los enzimas de restricción KpnI y SpeI y se insertó el gen de resistencia a higromicina amplificado previamente por PCR y conteniendo los mismos sitios de restricción. El resultado fue el plásmido pOJ260ind_t_H (Figura 28).

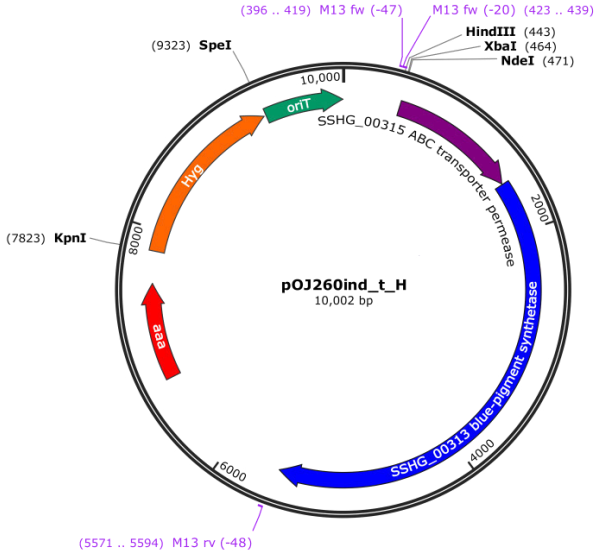


Figura 28. Mapa del vector pOJ260ind_t_H

14.4.6. Plásmido pSET152Ec_ind_t

Se diseñó un nuevo vector (Figura 29) a partir del pSET152Ec_ind de tal manera que se le clonó el gen SSHG_00315 del mismo modo que el usado para la construcción de pOJ260ind_t. Sin embargo, en este caso la clonación con los enzimas XbaI y EcoRV dio numerosos problemas y no fue posible realizarla, aunque finalmente se consiguió clonando el fragmento de PCR con sus extremos romos tal cual los genera la polimerasa Herculase y linealizando el plásmido pSET152Ec_ind únicamente con el enzima EcoRV que tiene también sus extremos romos. Para evitar religados del plásmido al haberlo digerido sólo con un enzima se desfosforilaron sus extremos con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (New England Biolabs).

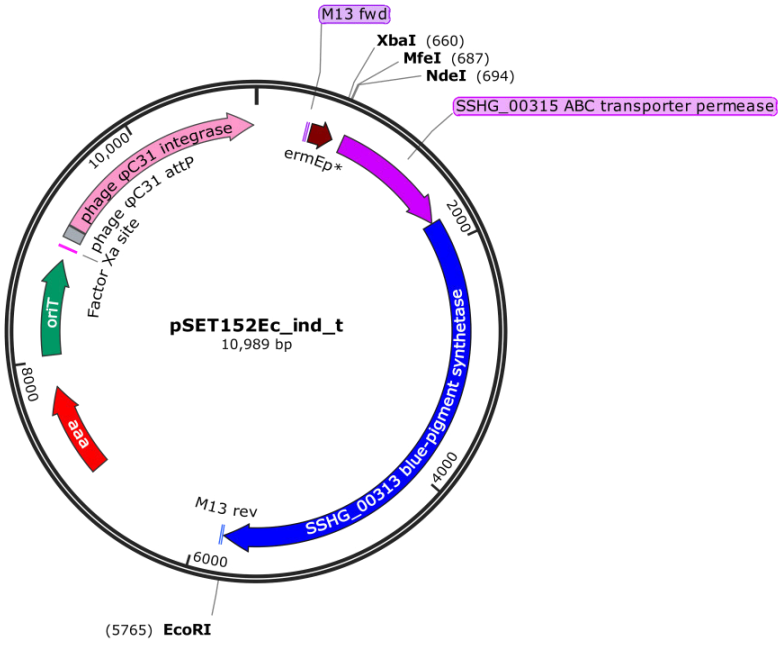


Figura 29. Mapa del vector pSET152Ec_ind_t

15. Extracción y análisis cromatográfico de compuestos bioactivos

15.1. Extracción de compuestos

Para ejecutar los análisis de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos en las diferentes agrupaciones génicas estudiadas se siguieron las pautas propuestas por el método OSMAC (*One Strain – Many Compounds*) indicadas en el apartado 2.4.1. de la introducción.

Como ya se ha indicado anteriormente en su correspondiente apartado (apartado 6.2.4.) las diferentes cepas se cultivaron en una batería de distintos medios de cultivo (apartado 6.1.2.) en matraces de 250 ml a una temperatura de 30°C y una agitación de 250 rpm durante 7 días, tomándose muestras de 1 ml de cada uno de ellos cada 24 ó 48 horas.

Protocolo de extracción

1. Sobre las muestras de cultivo adquiridas se realiza un proceso de extracción utilizando diferentes solventes orgánicos, generalmente acetato de etilo, acetato de etilo + 1% ácido fórmico, butanol, cloroformo, etc. Se añade una cantidad igual de solvente y de muestra.
2. Dejar en agitación los tubos durante un periodo de no menos de una hora.
3. Centrifugar los tubos a 13250 rpm durante 5 - 6 minutos.
4. Recoger la fase orgánica en un tubo *eppendorf*.
5. Evaporar la fase orgánica recogida en un *speedVac* por centrifugación bajo condiciones de vacío.
6. Una vez la muestra alcanza total sequedad resuspender el depósito resultante en 50 µl de DMSO-Metanol (1:1).
7. Para favorecer que toda la muestra resuspenda correctamente se pasar los tubos por un baño de agua con sonicación y después centrifugar a 13250 rpm durante un minuto para retirar las partes que no solubles que podrían afectar a la columna de cromatografía.
8. Como último paso se recoge el líquido con cuidado de no arrastrar impurezas sólidas y se carga en un vial para analizar la muestra inyectando 10 µl de ésta en un aparato de UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*).

15.2. Análisis cromatográfico por UPLC

Los análisis de producción de los nuevos compuestos obtenidos se realizaron por cromatografía en fase reversa en un equipo Acquity UPLC (Waters) con detección visible-ultravioleta, utilizando una columna BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters) y como solventes acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1%.

Las muestras se analizan empleando un programa estándar optimizado para casos de búsqueda de nuevos metabolitos en el que las muestra se eluyen bajo un flujo isocrático de acetonitrilo al 10% durante 1 minuto, para seguidamente aplicar un gradiente lineal de

acetonitrilo desde el 10% al 100% durante 9 minutos, todo ello a un flujo constante de 0,5 ml / min y a una temperatura de columna de 35°C.

Los cromatogramas para localizar tanto los picos de interés así como sus respectivos espectros de absorción se analizaron con la ayuda de un sistema de fotodiodos en línea en un rango de 200 a 500 nm y el programa informático Empower (Waters). Los cromatogramas obtenidos aparecen en forma bidimensional pudiendo variarse su longitud de onda para tratar de localizar la correspondiente a cada metabolito en concreto.

15.3. Análisis cromatográfico por HPLC-MS

Una vez determinado qué picos analizados por UPLC son de interés el siguiente paso consiste en identificar su masa molecular para comprobar si éstas podrían encajar con las de los compuestos obtenidos en las predicciones bioinformáticas de cada una de las agrupaciones génicas estudiadas.

Para este tipo de análisis se utilizó un sistema cromatográfico Alliance HPLC (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas ZQ4000 y una columna SunFire C18 (3.5 µm, 2.1 x 150 mm, Waters). Los solventes utilizados también fueron acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% como en el análisis por UPLC. La muestra se eluye con un gradiente isocrático de acetonitrilo al 10% a lo largo de 4 minutos, seguido de un gradiente lineal de acetonitrilo desde el 10% hasta el 88% durante 26 minutos, con un flujo constante de 0,25 ml / min. Los cromatogramas se analizaron igual que en el UPLC descrito en el apartado anterior. El análisis de las masas de los diferentes picos se realizó por ESI (*ElectroSpray Ionization*) en modo positivo, con voltaje de capilar de 3 kV y voltaje de cono de 20 V.

Tanto los análisis de HPLC como de masas (MS) pudieron ser analizados, al igual que en UPLC, gracias al programa informático Empower (Waters).

15.4. Purificación de compuestos

La purificación de los cuatro compuestos derivados de paulomicinas (UO-087, UO-088, O-089 y UO-090) descritos en este trabajo se apoyó en protocolos descritos para paulomicinas (Braña *et al.*, 2014), aplicando algunas modificaciones.

Se cultivaron esporas de *S. albus* J1074 en medio de cultivo MFE durante 5 días a 30 °C a 250 rpm en 5 matraces erlenmeyer de 2 litros conteniendo cada uno 400 ml de cultivo; pasados los 5 días se centrifugan y filtran los cultivos, tras haber comprobado previamente en pruebas realizadas que los compuestos se encuentran en el caldo de cultivo, no quedando retenidos en el interior de las células. El filtrado se pasa por un cartucho de extracción de fase sólida Sep-Pac Vac C18 de 10 g (Waters) utilizando una bomba peristáltica para favorecer el proceso. La parte retenida en el cartucho se fracciona en el HPLC preparativo eluyéndola en TFA al 0,1% y metanol durante 60 minutos aplicando un gradiente del 0% al 100% de metanol con un flujo de 5 ml / min, recogiéndose fracciones cada 5 minutos y

analizando cada una de ellas por UPLC para localizar en cuál se encuentran los picos correspondientes a los compuestos de interés.

Una vez localizada la fracción (o fracciones) sobre la que seguir trabajando ésta se seca en rotavapor. A continuación, se resuspende la muestra en 1 - 2 ml de solución DMSO - Metanol (1:1). De nuevo en el HPLC preparativo, se utiliza una columna SunFire C18 (10 µm, 10 x 150 mm, Waters) aplicando un flujo isocrático de 5 ml / min de 57% de metanol con TFA acuoso al 0,1%. Tras este último paso de purificación de recogida específica de cada uno de los picos de interés, estos fueron parcialmente desecados en rotavapor para disminuir la cantidad de solvente orgánico para después ser concentrados en una columna de extracción de fase sólida (Sep-Pak C18, Waters) eluyéndolos con metanol. Tras comprobar por cromatografía HPLC-MS que cada metabolito purificado presenta un solo pico bien definido y una masa molecular definida, se diluye en 1 - 2 ml de una solución de *tert*-butanol y agua milliQ (1:1) y se procede a su liofilización en un liofilizador FreeZone (Labconco) siguiendo el protocolo del fabricante.

15.5. Caracterización estructural de compuestos

El proceso de caracterización estructural de los compuestos obtenidos fue llevado a cabo por la Fundación MEDINA (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada) tras enviarles los liófilos de cada uno de ellos una vez purificados.

Para la elucidación estructural de los metabolitos se utilizaron diferentes técnicas de cromatografía y espectrofotometría. Para ensayos de espectrometría de masas de alta resolución emplearon un sistema HPLC 1200 Rapid Resolution (Agilent) acoplado a un espectrómetro de masas maXis (Bruker). También se aplican diversas técnicas de resonancia magnética nuclear (1H, 13C, COSY, HSQC, HMBC), disolviendo cada muestra en DMSO-d_6 y transfiriéndola a un tubo de 1,7 mm para analizarla en un espectrómetro AVANCE III (Bruker) de 500 MHz de resolución equipado con una microcriosonda de 1,7 mm TCI (Bruker). Todos los espectros fueron registrados a una temperatura de 24°C.

16. Análisis de actividad biológica

16.1. Análisis de actividad citotóxica

La posible actividad citotóxica se analizó frente a diferentes líneas celulares tumorales humanas como HT29, A549, MDA-MB-231, AGS, HL-60, CAPAN y A2780 (Tabla 22). Paralelamente, se utilizó como control positivo un tipo de línea celular murina no maligna como es NIH/3T3 (Fibroblastos de embrión murino).

Las células se cultivaron previamente durante siete días en medio de cultivo DMEM-10% FBS, luego se alicuoteó en placas de 96 pocillos a 5000 células por pocillo, para lo que se empleó el kit *Cell counting kit-8-(96992)* (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) y se dejó crecer durante un día más. A continuación, los compuestos se disolvieron en DMSO, de modo que la concentración final de DMSO en los ensayos debe ser del 0.1%. Tras la incubación, se agregaron

10 µL de compuesto en diversas concentraciones en cada pocillo y se incubaron durante dos días. Finalmente, se añadieron 10 µL de reactivo CCK-8 (Sigma-Aldrich), se incubó durante 2 horas y se tomaron medidas a 450 nm con el lector de absorbancia de microplacas Elisa Bio-tek ELx 800 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.). Todos estos ensayos fueron realizados en la Unidad de análisis biológico de los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

Tabla 22. Líneas celulares tumorales humanas utilizadas en los ensayos de actividad citotóxica.

Línea celular	Neoplasia causada
HT29	Adenocarcinoma epitelial de colon
A549	Adenocarcinoma de células basales de epitelio alveolar
MDAMB231	Adenocarcinoma de mama hormono-independiente
AGS	Adenocarcinoma gástrico
HL60	Leucemia promielocítica aguda
CAPAN-1	Adenocarcinoma de páncreas
A2780	Carcinoma epitelial de ovario
NIH3T3	Fibroblastos de embrión murino

16.2. Análisis de actividad antibiótica

La actividad antibiótica se analizó utilizando una selección de cepas bacterianas (y un hongo) y determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto ensayado frente a cada uno de los organismos testigo. Dicha determinación se efectuó mediante la técnica de microdiluciones seriadas aplicando el protocolo publicado por el EUCAST (Cuenca-Estrella *et al.*, 2013) con algunas modificaciones para que se ajustara a las condiciones del estudio.

Las cepas seleccionadas para el ensayo fueron como Gram-positivas: *Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae, y Micrococcus luteus.* Como Gram-negativas: *Escherichia Coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens y Klebsiella pneumoniae.* Finalmente, como muestra de levadura se empleó *Candida albicans.*

Para llevar a cabo el ensayo se emplearon microplacas de 96 pocillos. En el primer pocillo de cada fila se añadió la concentración indicada de cada compuesto y en los siguientes pocillos de cada fila se realizaron diluciones 1:1 seriadas (Tabla 23) de forma que cada vez la concentración se reducía a la mitad con respecto al anterior pocillo. A continuación, se añadía una misma cantidad de bacteria crecida previamente en medio líquido de cultivo (cuya densidad óptica se encontrara en unos valores determinados de entre 0,3 y 0,5 para estandarizar el ensayo). Se utilizan dos valores iniciales de concentración del compuesto para poder obtener un valor más preciso de la MIC. También se ensayó un control positivo para corroborar que el medio de cultivo no se encuentra previamente contaminado y el crecimiento final de dicha contaminación enmascarara los resultados. Finalmente, la placa se incuba en una estufa a 30°C durante unas 20 – 24 horas. Una vez pasado este tiempo el crecimiento de la bacteria o la levadura aparece como turbidez en el medio de cultivo del pocillo, de modo que la MIC del

compuesto sería la concentración de éste en el último pocillo donde no se advierte crecimiento alguno.

Tabla 23. Concentraciones empleadas en cada pocillo de los ensayos de actividad antibiótica.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentraciones	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	+
de compuesto (µg/mL)	150	75	37,5	18,75	9,375	4,6875	2,34375	+

17. Ensayos de estabilidad

Los ensayos de estabilidad se emplearon para comprobar mediante cromatografía (UPLC en nuestro caso) si los compuestos de estudio sufren algún tipo de degradación que haga que desaparezcan o sean modificados (biotransformación) hacia otro tipo de compuestos derivados.

Para ello, en primer lugar, se realiza un preinóculo de esporas de la cepa *S. albus* ΔB29 en TSB durante aproximadamente unas 24 horas de forma que el cultivo alcance una densidad óptica (DO_{600}) de entre 0,2 y 0,5. A continuación, en matraces de 25 ml con 5 ml de medio R5A se añade una determinada cantidad del preinóculo en función del valor de DO obtenido en cada caso de forma que todos los matraces, en caso de emplear diferentes cepas, tengan una misma concentración de esporas inicial.

Una vez los matraces son inoculados se incuban a 30°C y 250 rpm durante 24 horas. Pasado este tiempo se recoge una muestra de 1 ml del matraz y seguidamente se añade en el cultivo restante el compuesto en estudio a una concentración final de 50 µg / ml. Nada más añadir el compuesto se agita suavemente el matraz para homogeneizar su contenido y se toma una muestra de 1 ml. Posteriormente vuelve a incubarse el matraz en las mismas condiciones y se toma muestra de 1 ml cada 24 horas durante dos días más.

Las muestras recogidas se extraen con el solvente adecuado de acuerdo al compuesto que se esté manejando y, tras secar la extracción, se procede al estudio de su estabilidad observando su comportamiento mediante cromatografía UPLC de modo que pueden observarse las variaciones en los cromatogramas de las muestras en forma de desaparición del compuesto, biotransformación en otro u otros compuestos derivados o desaparición por degradación debida al paso del tiempo.

Resultados

Resultados

1. Análisis de genomas

1.1. Análisis de agrupaciones biosintéticas de *Streptomyces albus* J1074

Para realizar el análisis bioinformático de la secuencia de *S. albus* J1074 se emplearon los programas AntiSmash 4.0. y PRISM. Aunque ambas aplicaciones aportan ligeras diferencias en el número y la localización de los agrupamientos génicos en sus análisis, un estudio comparativo entre ambos nos permitió comprobar que los datos ofrecidos por uno permitían completar a los que le faltaban al otro y viceversa. Por tanto, decidimos solapar los datos obtenidos con ambos programas. AntiSmash 4.0., aporta una mejor información a la hora de localizar los diferentes clústeres presentes en los genomas y, aunque su análisis de los genes de cada agrupamiento es muy completo presenta carencias que aporta el programa PRISM, como en lo referido a la predicción de la especificidad de dominios de adenilación en módulos NRPS.

En el genoma de *S. albus* J1074, como se indica en la introducción (apartado 2.3.1., tabla 2), existen al menos 27 agrupamientos génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Olano *et al*., 2014). Para este trabajo interesaban sobre todo aquellos clústeres que contuviesen genes que codificaran sintetasas de péptidos no ribosomales, NRPS (clústeres *9,* 12, 13, 14, 21 y 27), agrupaciones de tipo policétido sintasa, PKS (clústeres 5 y 6), e híbridos PKS-NRPS (clústeres 1, 3, 4 y 26). De entre todos ellos se descartaron aquellos cuyo producto final de biosíntesis ya fuera conocido (Tabla 24). De los agrupamientos restantes se hicieron análisis bioinformáticos para obtener predicciones acerca de cuál podría ser la naturaleza de su producto final y determinar cuál o cuáles podrían presentar un potencial mayor en cuanto al interés terapéutico del metabolito generado.

Tabla 24. Clústeres cuyos productos finales de biosíntesis eran previamente conocidos.

Clúster	Gen inicio	Gen final	Tipo	Producto final
4	SSHG_00054	SSHG_00069	PKS I - NRPS	Antimicinas
5	SSHG_00076	SSHG_00101	PKS I	Candicinas
6	SSHG_00144	SSHG_00155	PKS III	THN, flaviolina
9	SSHG_00311	SSHG_00315	NRPS	Indigoidina
26	SSHG_05699	SSHG_05729	PKS I - NRPS	6-*epi*-alteramidas

1.2. Búsqueda de agrupaciones génicas de biosíntesis

1.2.1. Estudio de clústeres biosintéticos de potencial interés

De acuerdo a los datos bioinformáticos recogidos decidimos seleccionar cuatro de los clústeres como objeto de estudio con el fin de determinar empíricamente el metabolito que

producen. Uno de ellos es un clúster que determinaría la síntesis de un compuesto híbrido PKSI-NRPS (clúster 1). Su selección se debió a que tradicionalmente este tipo de compuestos determinan la producción de compuestos bioactivos, como el caso de las 6-*epi*-alteramidas sintetizadas por el clúster 26 de esta misma cepa (Olano *et al*., 2014). Los otros tres agrupamientos seleccionados, 13, 14 y 21, determinarían la producción de compuestos peptídicos de la familia de los lipopéptidos sintetizados por NRPSs, compuestos que generalmente presentan actividad antibiótica y/o antitumoral entre otras (Gu *et al*., 2011; Sharma *et al*., 2014).

Para acotar los límites del clúster 1, PKSI-NRPS, fue necesario analizar en profundidad la región propuesta por AntiSmash ya que en él se engloba más de un posible agrupamiento génico. Viendo la propuesta del programa informático se comprobó que el clúster de interés para el estudio se encuentra en la parte final del agrupamiento, siendo SSHG_00007 (4-hydroxybenzoyl-CoA TE (4HBT)) el primer gen de interés y SSHG_00033 (proteína integral de membrana) el último del agrupamiento.

1.2.2. Organización genética de los clústeres

Durante el desarrollo de este trabajo se han ido realizando periódicamente, tanto de manera individual como de manera grupal, análisis bioinformáticos de los genes que conforman los cuatro clústeres en estudio, debido a que anualmente aparecen nuevas versiones o actualizaciones de los programas utilizados habitualmente, como AntiSmash, siendo la última versión la 4.0., que presenta mejoras respecto a versiones anteriores, como el realizar análisis específicos para secuencias bacterianas. En cada nueva versión de las aplicaciones informáticas utilizadas se incorporan mejoras del proceso de análisis incluyendo nuevas herramientas para la comparación de secuencias y predicción de estructuras. La utilización periódica de las nuevas versiones ha permitido identificar la posible función de varios de los genes estudiados que previamente aparecían anotados como proteínas hipotéticas. Incluso, en algunos casos, se han localizado nuevos genes que las versiones anteriores no habían identificado como tales.

En las siguientes tablas se muestran los genes que componen cada uno de los clústeres biosintéticos con los que se ha trabajado así como las características generales que presentan tras los análisis bioinformáticos ejecutados. Aquellos cuya existencia o función se ha visto actualizada con respecto a los datos publicados con anterioridad se han marcado con un asterisco (*****).

Tabla 25. Genes que conforman el clúster 1 de *S. albus* J1074.

Gen	Función	Posición	Hebra	Tamaño (bp)
SSHG_00007	4-hidroxibenzoil-CoA TE (4HBT)	4256-4735	-	480
SSHG_00008	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	4732-5763	-	1032
SSHG_00009	Proteína de escisión 3-keto-5-aminohexanoato *	5791-6684	-	894
SSHG_00010	Regulador transcripcional TetR	6754-7611	-	858
SSHG_00011	Regulador transcripcional TetR	7923-8573	+	651
SSHG_00012	Proteína hipotética	8583-9248	-	666
SSHG_00013	Glioxalasa *	9217-9591	-	375
SSHG_00014	Proteína hipotética	9551-9700	+	150
SSHG_00015	Proteína de resistencia a bleomicina	9788-10216	+	429
SSHG_00016	Transportador MFS *	10301-11857	-	1557
SSHG_00017	Tioesterasa *	11854-12717	-	864
SSHG_00018	Histona deacetilasa clase II *	12689-13837	-	1149
SSHG_00019	Proteína hipotética	13834-14142	-	309
SSHG_00020	Aminotransferasa	14208-17963	-	3756
SSHG_00021	Enzima de reparación de alquilación de ADN	17960-19081	-	1122
SSHG_00022	PKS I	19074-23384	-	4311
SSHG_00023	PKS I	23633-28716	-	5084
SSHG_00024	PKS I	30163-31566	-	1404
SSHG_00025	PKS I	31885-33349	-	1465
SSHG_00026	PKS I	34090-37395	-	3306
SSHG_00027	PKS I (dominio NRPS A)	38491-42393	-	3903
SSHG_00028	Rieske 2Fe-2S	43507-44667	-	1161
SSHG_00029	Monooxigenasa dependiente de FAD	44999-46240	-	1242
SSHG_00030	Regulador transcripcional LysR *	46781-47794	-	1014
SSHG_00031	Proteína hipotética conservada	47987-48304	-	318
SSHG_00032	Deshidrogenasa de cadena corta	48402-49199	-	798
SSHG_00033	Proteína integral de membrana	49361-49855	+	495

Tabla 26. Genes que forman parte del agrupamiento génico 13 en *S. albus* J1074.

Gen	Función	Posición	Hebra	Tamaño (bp)
SSHG_02472	NADH oxidasa *	2867608-2867972	+	426
SSHG_02473	Regulador transcripcional de dos componentes LuxR	2867971-2868582	-	612
SSHG_02474	Histidina quinasa	2868625-2869863	-	1239
SSHG_02475	Proteína de biosíntesis de goadsporina	2870034-2872253	-	2220
SSHG_02476	Proteína hipotética	2872322-2872636	-	315
SSHG_02477	Regulador transcripcional ArsR *	2872733-2873716	-	984
SSHG_02478	Succinato-semialdehido deshidrogenasa	2874577-2876004	+	1428
SSHG_02479	alpha/beta hidrolasa *	2876041-2876850	+	810
SSHG_02480	Proteína con dominio MbtH	2877118-2877375	+	258
SSHG_02481	Transportador ABC, permeasa *	2877439-2878236	-	798
SSHG_02482	Transportador ABC, ATPasa	2878233-2879174	-	942
SSHG_02483	Proteína hipotética	2879171-2879542	-	372
SSHG_02484	Regulador transcripcional GntR	2879638-2880054	+	417
SSHG_02485	Proteína de membrana *	2880255-2881361	+	1107
SSHG_02486	alpha/beta hidrolasa MppK	2881610-2882965	+	1356
SSHG_02487	NRPS	2883086-2889928	+	6843
SSHG_02488	NRPS	2890121-2900287	+	10167
SSHG_02489	NRPS	2900284-2913141	+	12858
SSHG_02490	NRPS	2913231-2936387	+	23157
SSHG_02491	NRPS	2936441-2941552	+	5112
SSHG_02492	NRPS	2941549-2944776	+	3228
SSHG_02493	NRPS	2944752-2945735	+	984
SSHG_02494	NRPS	2945896-2948922	+	3027
(-)[a]	Transportador de resistencia tipo EmrB/QacA*	2948956-2950315	-	1359
(-) [a]	Regulador transcripcional TetR *	2950313-2950925	-	612
SSHG_02495	Proteína hipotética	2950986-2951294	-	309
SSHG_02496	Transportador MFS *	2951394-2952968	-	1575
SSHG_02497	Proteína hipotética (proteína secretada)	2953235-2953660	-	426

a. Los genes que no tienen asignada una nomenclatura propia son aquellos no anotados en análisis bioinformáticos previos a este estudio.

Tabla 27. Genes que componen la agrupación génica 14 en *S. albus* J1074.

Gen	Función	Posición	Hebra	Tamaño (bp)
SSHG_02790	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa *	3254516-3255095	+	579
SSHG_02791	Proteína de membrana *	3255275-3256573	+	1299
SSHG_02792	Proteína con dominio PH*	3256551-3256916	-	366
SSHG_02793	Proteína con dominio barril-PRC *	3257053-3257463	-	411
SSHG_02794	Proteína hipotética conservada	3257706-3258104	+	399
SSHG_02795	Proteína hipotética	3258195-3258458	-	264
SSHG_02796	NRPS	3258771-3262154	+	3384
SSHG_02797	NRPS	3262772-3263578	+	807
SSHG_02798	NRPS	3267059-3269179	+	2121
SSHG_02799	Proteína MbtH*	3269264-3269473	+	210
SSHG_02800	Transportador ABC, ATPasa	3269470-3270492	+	1023
SSHG_02801	Transportador ABC-2	3270480-3271280	+	801
SSHG_02802	Histidina kinasa *	3271402-3272100	-	699
SSHG_02803	Proteína hipotética	3272273-3273037	-	765
SSHG_02804	Regulador transcripcional PadR	3272956-3273309	-	354
SSHG_02805	Proteína integral de membrana	3273420-3273899	+	480
SSHG_02806	Transportador MFS *	3273914-3275158	-	531

Tabla 28. Genes que forman parte del clúster 21 de *S. albus* J1074.

Gen	Función	Posición	Hebra	Tamaño (bp)
SSHG_04927	Regulador transcripcional TetR	5646427-5647071	+	645
SSHG_04928	Oxidorreductasa	5647088-5647879	+	792
SSHG_04929	Transportador ABC, ATPasa	5647885-5648691	+	807
SSHG_04930	Sensor de turgencia	5648714-5651272	+	2559
SSHG_04931	Regulador de turgencia	5651302-5651997	+	696
SSHG_04932	Proteína de unión a ácidos nucleicos	5652046-5652453	+	408
SSHG_04933	Proteína con dominio DUF 3159*	5652457-5653227	+	771
SSHG_04934	Transportador de potasio	5653366-5654049	-	684
SSHG_04935	Transportador de potasio	5654076-5654747	-	672
SSHG_04936	Permeasa de aminoácidos	5655224-5657287	+	2064
SSHG_04937	Metiltransferasa de ARN	5657585-5658886	+	1302
SSHG_04938	Esterasa de eritromicina*	5659040-5660371	-	1332
SSHG_04939	Tioesterasa *	5660458-5661195	-	738
SSHG_04940	Regulador transcripcional *	5661214-5662026	-	489
SSHG_04941	Proteína NikQ (P450)	5662080-5663258	-	1179
SSHG_04942	Transportador MFS *	5663321-5665276	-	1956
(-)[a]	Oxigenasa (Proteína secretada) *	5665275-5666256	-	981
SSHG_04943	NRPS	5665780-5675232	-	9453
SSHG_04944	NRPS	5675163-5675369	-	207
SSHG_04945	NRPS	5675423-5685661	-	10239
SSHG_04946	alpha/beta hidrolasa MppK	5685832-5687149	-	1318
SSHG_04947	Histidina quinasa*	5687305-5688690	-	1386
SSHG_04948	Regulador transcripcional de dos componentes	5688697-5689368	-	672
SSHG_04949	Transportador ABC, permeasa*	5689654-5691660	-	2007
SSHG_04950	Transportador ABC, ATPasa	5691648-5692394	-	747
SSHG_04951	Histidina quinasa	5692544-5693821	+	1278
SSHG_04952	Regulador de respuesta de dos componentes	5693821-5694474	+	654
SSHG_04953	Glicosiltransferasa	5694535-5695707	-	1173
SSHG_04954	Metiltransferasa FkbM	5695735-5696466	-	732
SSHG_04955	Proteína integral de membrana	5696463-5697785	-	1323
SSHG_04956	Deshidrogenasa de unión a zinc	5697889-5698884	-	996
SSHG_04957	Transportador ABC de azúcares, permeasa	5698881-5699747	-	867
SSHG_04958	Transportador ABC de azúcares, permeasa	5699744-5700664	-	921
SSHG_04959	Transportador ABC de azúcares, proteína de unión al substrato*	5700709-5702076	-	1368
SSHG_04960	Regulador transcripcional ARSR	5702199-5702960	-	762

a. Los genes que no tienen asignada una nomenclatura propia son aquellos no anotados en análisis bioinformáticos previos a este estudio.

1.2.3. Predicciones bioinformáticas

Una vez seleccionados los agrupamientos génicos de biosíntesis se realizó un análisis bioinformático pormenorizado de las posibles actividades individuales y sustratos de cada uno de los enzimas sintetizados a partir de genes estructurales, y del eventual resultado de su acción conjunta para obtener predicciones bioinformáticas referentes a la posible estructura de los metabolitos determinados por cada clúster.

Para el clúster 1 de *S. albus* J1074 se obtienen predicciones similares por las aplicaciones bioinformáticas AntiSmash y PRISM en cuanto a las posibles estructuras químicas de los metabolitos sintetizados (Figura 30). Pese a no obtenerse resultados idénticos en ambos programas, ambos guardan ciertas similitudes en cuanto a la estructura básica y también en cuanto a poseer un peso molecular relativamente pequeño.

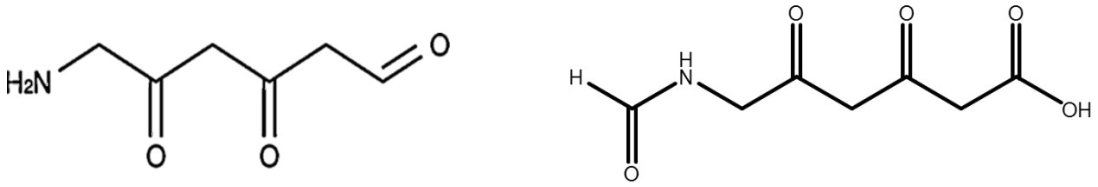


Figura 30. Predicciones obtenidas de posibles estructuras sintetizadas por el clúster 1 de *S. albus* J1074.

En el caso del clúster 13 contiene una NRPS con 18 dominios de adenilación (A) (18 módulos) así como otras proteínas que probablemente estarían involucradas en la producción del posible compuesto final. Dentro de estas proteínas acompañantes destacan varias de ellas por su semejanza con proteínas involucradas en otras rutas de biosíntesis. Por ejemplo, SSHG_02475 es similar a Gra-orf12, GodD y AknN de las rutas de granaticina, goadsporina y aclacinomicina respectivamente, análogos a SSHG_02480 (proteína que contiene el dominio MbtH) puede localizarse en la NRPS implicada en la biosíntesis de nikomicina NikP1 justo antes del dominio de adenilación, y SSHG_02486, similar a alpha/beta hidrolasas tipo MppK, que está implicada en la biosíntesis de manopeptimicina probablemente como proteína de terminación y ciclación del péptido. Las dos aplicaciones empleadas para el análisis bioinformático realizado sobre este agrupamiento génico coinciden en la estructura de los posibles metabolitos resultantes, tratándose de moléculas de gran tamaño molecular. En función de las predicciones obtenidas el compuesto o familia de compuestos sintetizados por este agrupamiento génico podrían ser lineales tipo goadsporina o cíclicos tipo tirocidina, de los que se han seleccionado dos ejemplos de cada uno (Figura 31).

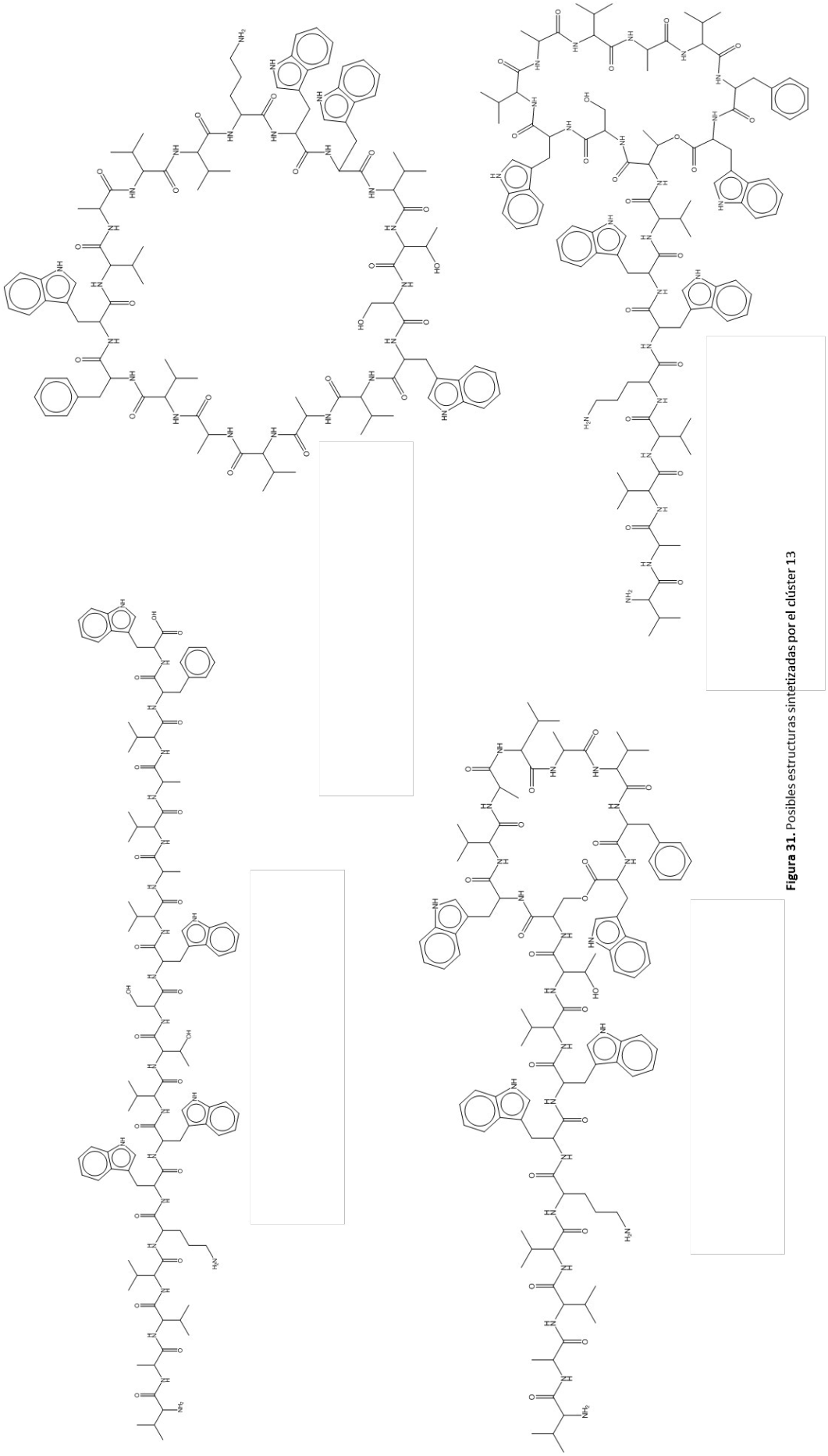


Figura 31. Posibles estructuras sintetizadas por el clúster 13

Las NRPSs codificadas por los genes del clúster 14 poseen en conjunto 3 ó 4 dominios de adenilación (A) (3 ó 4 módulos), dependiendo de la herramienta bioinformática utilizada para el análisis, presentando además proteínas adicionales posiblemente implicadas en la producción del compuesto final. Siguiendo las predicciones bioinformáticas obtenidas para este agrupamiento se obtienen diferentes alternativas en cuanto a la posible estructura del producto final. Una de las posibilidades, obtenida por AntiSmash, es la generación de un compuesto tripeptídico (Figura 32, **1**). Por otro lado, atendiendo a las predicciones de la aplicación PRISM, que consideran la presencia de un módulo adicional con respecto a los resultados de AntiSmash, se podría aventurar la generación de un tetrapéptido (Figura 32, **2**).

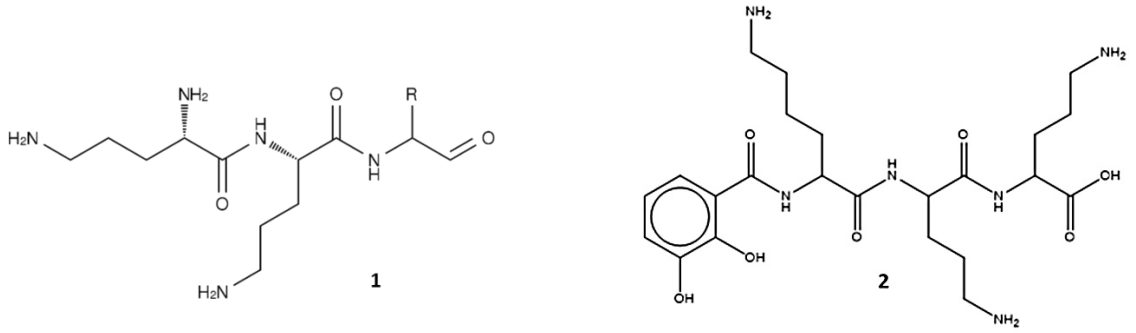


Figura 32. Predicciones estructurales de posibles compuestos sintetizados por el clúster 14 de *S. albus* J1074.

De los análisis bioinformáticos del clúster 21 se deduce que posee una NRPS con 6 dominios de adenilación (A) (6 módulos) además de otras proteínas que probablemente participarían en la producción del posible compuesto final. El gen SSHG_4928 codificaría una oxidorreductasa implicada en la modificación de compuestos aromáticos. La NRPS de este clúster introduciría una unidad de fenilalanina que podría ser hidroxilada por un citocromo P450 (SSHG_04941) y después, el grupo hidroxilo ser convertido a grupo ceto por la oxidorreductasa SSHG_04928. El gen SSHG_4939, codificaría una tioesterasa, similar a SanP, NikP2 (ambas implicadas en la biosíntesis de nikomicina) y PchC (de la ruta de biosíntesis del sideróforo piochelina). El gen SSHG_4941, codificaría un citocromo P450 similar a NikQ, SanQ y SalD (de las rutas de biosíntesis de nikomicina y salinosporamida), enzimas que podrían participar en la hidroxilación de fenilalanina. El gen SSHG_4944, codificaría una proteína que contiene un domino MbtH de función desconocida pero que está presente en la mayoría de sistemas NRPS y en particular en la NRPS de nikomicina NikP1 adyacente al dominio A. El gen SSHG_4946, codificaría un enzima tipo hidrolasa MppK implicada en la biosíntesis de mannopeptimicina probablemente como proteína de terminación y ciclación del péptido. El gen SSHG_4953, codificaría para una glicosiltransferasa (GTF) que, aunque no presenta similitud a GTFs implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, no podemos descartar que pueda introducir una unidad de glucosa en el péptido generado por la NRPS. Por último, el gen SSHG_4954, codificaría una metiltransferasa similar a enzimas de este tipo de la familia FkbM, 31-O-demetil-FK506 metiltransferasa implicada en la biosíntesis de FK506. En función de estas predicciones obtenidas con las herramientas bioinformáticas AntiSmash 4.0. (Figura 33, **1**) y

PRISM (Figura 33, **2**) se generaría un péptido de 6 aminoácidos. Otra alternativa plausible sería la de generar un péptido tipo gramicidina conteniendo dos cadenas de 6 aminoácidos ciclados. De forma adicional se podrían obtener derivados glicosilados con diversas O-metilaciones en algunos de los grupos hidroxilo disponibles (Figura 33, **3** y **4**).

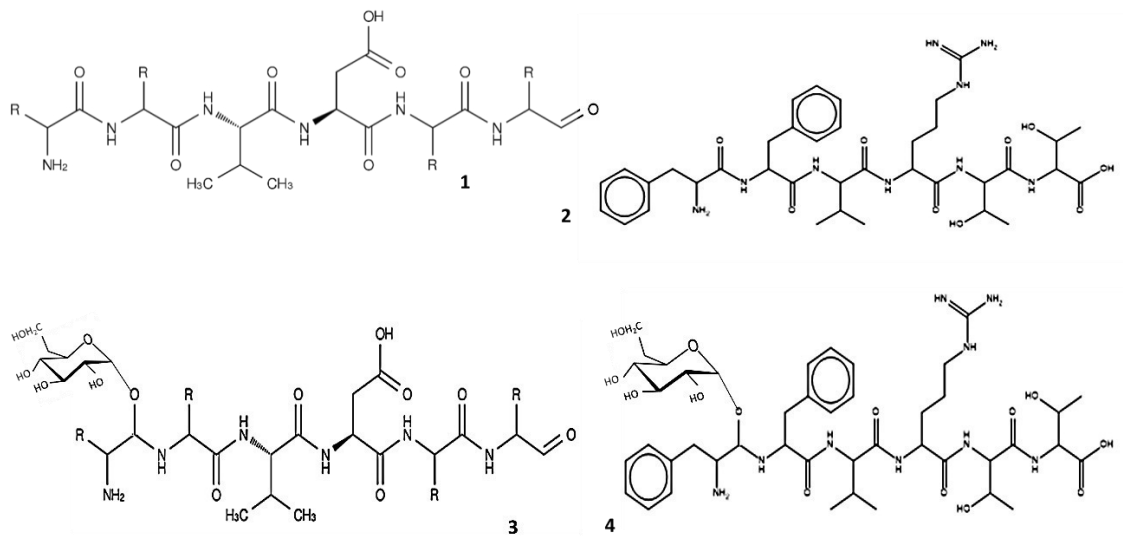


Figura 33. Configuraciones estructurales de posibles compuestos sintetizados por el clúster 21 de *S. albus* J1074.

1.3. Análisis comparativo de genomas en colección de cepas *Streptomyces sp.* CS

Como se indica en el apartado 1.1.3., nuestro laboratorio dispone de una colección de cepas de *Streptomyces* aisladas en la región de Lambayeque (Perú) a partir de hormigas cortadoras de hojas de la Tribu *Attini*.

Tras haber secuenciado el genoma completo de algunas de esas cepas se decidió comparar sus genomas con el de *S. albus* J1074 para comprobar si guardaban entre sí similitud en alguna región de sus cromosomas, para lo que se utilizaron las aplicaciones bioinformáticas AntiSmash y BLAST.

Una vez analizados los resultados destacó la presencia de ciertas regiones muy semejantes en los genomas de *S. albus* J1074 y de *Streptomyces sp.* CS227. Al indagar más en dichas regiones se comprobó que se trataba de dos clústeres 1 y 13 de *S. albus,* los cuales guardaban un alto grado de homología con los clústeres 20 y 16 respectivamente de *Streptomyces sp.* CS227 (Tabla 29).

En otras cepas también se encontraron regiones con similitud, en este caso con el clúster 14 de *S. albus*, pero ésta no llegaba al 80% frente al genoma de *Streptomyces* sp. CS065a y CS081a (Tabla 29). Cabe destacar que los genes más similares en todos los casos correspondían a los estructurales (en particular los que codifican NRPSs), mientras que el resto de los presentes en cada clúster (codificando enzimas de decoración, proteínas reguladoras o de transporte) presentaban altos grados de disimilitud.

El caso contrario lo constituye el clúster 21 de *S. albus* que mostró un grado de similitud moderado, rondando el 40%, con los genomas las cepas de la colección (Tabla 29). Al analizar los resultados se comprobó que en este caso los genes conservados eran aquellos que flanqueaban el operón de genes estructurales, siendo el núcleo central del clúster totalmente diferente en *S. albus* y en el resto de *Streptomyces* spp.

Tabla 29. Cepas de la colección *Streptomyces spp.* cuyos genomas se compararon con los de los cuatro agrupamientos génicos biosintéticos de *S. albus* J1074 estudiados. Se muestra en cada caso el grado de similitud cuando supera el 40%.

Streptomyces sp.	**Cluster 1**	**Cluster 13**	**Cluster 14**	**Cluster 21**
CS014	-	-	-	<45%
CS057	-	-	-	<45%
CS065a	-	-	<80%	<45%
CS081a	-	-	<80%	<45%
CS090a	-	-	-	<45%
CS113	-	-	-	<45%
CS131	-	-	-	<45%
CS147	-	-	-	<45%
CS149	-	-	-	<45%
CS159	-	-	-	<45%
CS207	-	-	-	<45%
CS227	93%	98%	-	<45%

1.3.1. *Streptomyces sp.* CS227

El análisis de la secuencia del genoma de *Streptomyces sp.* CS227 mediante la herramienta bioinformática AntiSmash permite identificar un total de 23 agrupaciones génicas de biosíntesis (Tabla 30), aunque en algunas de ellas parece claro que podrían ser en realidad dos o más agrupaciones diferentes que el programa identifica como una sola, como por ejemplo en los clústeres 2, 8 y 20 (Malmierca *et al*., 2018).

Tabla 30. Agrupamientos génicos identificados por AntiSmash 4.0. en el genoma de *Streptomyces sp.* CS227.

Agrupación génica	Tipo	Metabolito más probable
1	NRPS	-
2	Terpeno – NRPS	-
3	NRPS	-
4	PKS-I – NRPS	SGR-PTMs
5	Terpeno	-
6	Bacteriocina	-
7	Bacteriocina	-
8	Sideróforo	-
9	Terpeno	-
10	Terpeno	-
11	Tiopéptido	Albaflavenona
12	Bacteriocina	-
13	Bacteriocina	-
14	Lantipéptido	SAL-2242
15	NRPS	-
16	NRPS	-
17	Sideróforo	Desferrioxamina B
18	Ectoína	Ectoína
19	Bacteriocina – Terpeno	-
20	PKS-III – Lantipéptido – PKS-I – NRPS	Candicidinas y antimicinas
21	PKS-I	-
22	PKS-I	-
23	Butirolactona	-

Realizando comparativas más detalladas entre las regiones del genoma de *S. albus* y *Streptomyces sp.* CS227 que mostraban mayor grado de similitud se encontró que éstas correspondían a clústeres completos delimitados por AntiSmash. En el caso del clúster 13 de *S. albus* el clúster equivalente en *Streptomyces sp.* CS227 corresponde con el 16 (Tabla 31).

Tabla 31. Genes del clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227.

Gen	Función	Hebra	Tamaño (pb)
B9W68_17580	Proteína hipotética (proteína secretada)	-	426
B9W68_17590	Transportador MFS	-	1575
B9W68_17595	Proteína hipotética	-	309
B9W68_17600	Regulador transcripcional TetR	-	612
B9W68_17630	Transportador de resistencia tipo EmrB/QacA	-	1359
B9W68_17650	NRPS	+	12344
B9W68_17655	NRPS	+	23075
B9W68_17660	NRPS	+	12797
B9W68_17665	NRPS	+	16183
B9W68_17670	alpha/beta hidrolasa MppK	+	1356
B9W68_17675	Proteína de membrana	+	1107
B9W68_17680	Regulador transcripcional GntR	+	417
B9W68_17685	Proteína hipotética	-	372
B9W68_17690	Transportador ABC, ATPasa	-	942
B9W68_17695	Transportador ABC, permeasa	-	798
B9W68_17700	Proteína con dominio MbtH	+	258
B9W68_17705	alpha/beta hidrolasa	+	810
B9W68_17710	Deshidrogenasa succinato-semialdehido	+	1428
B9W68_17715	Regulador transcripcional ArsR	-	984
B9W68_17720	Proteína de biosíntesis de goadsporina	-	2220
B9W68_17725	Histidina quinasa	-	1239
B9W68_17730	Regulador transcripcional LuxR	-	612
B9W68_17735	NADH oxidasa	+	426

Tras delimitar la región abarcada por el clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227 se hizo una comparación con la secuencia del clúster 13 de *S. albus* J1074 que mostró un grado de identidad muy alto entre sus genes (del 95 al 100%) con tan solo dos genes del clúster 13 que se encuentran ausentes en el clúster 16 (Figura 34). Los dos genes diferenciales entre ambos clústeres corresponden con un gen que codificaría un transportador de resistencia tipo EmrB/QacA y un regulador transcripcional TetR, situados ambos de manera consecutiva en la región entre los genes SSHG_02494 y SSHG_02495 y que al no haber sido identificados en análisis bioinformáticos previos no poseen denominación.

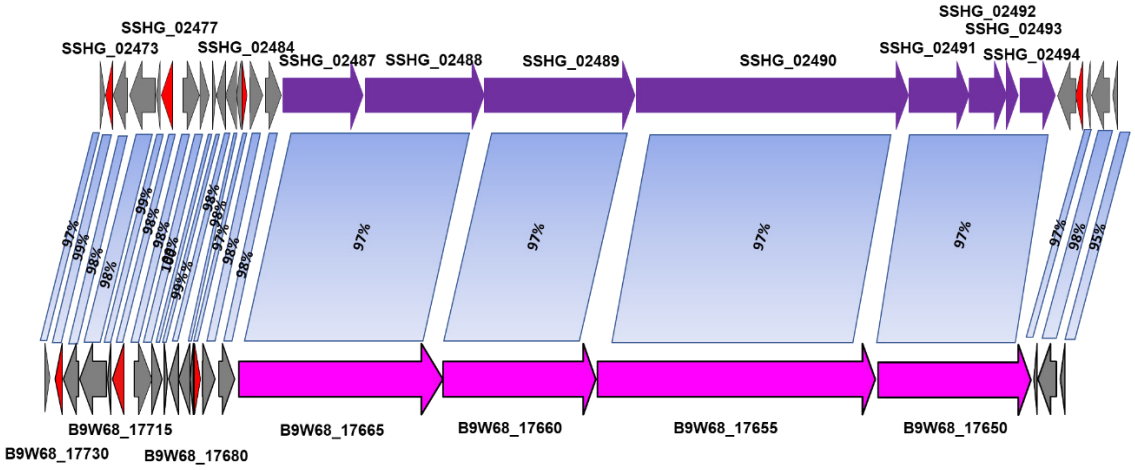


Figura 34. Análisis comparativo de los genes que componen el clúster 13 de *S. albus* J1074 y el clúster 16 de *Streptomyces sp.* CS227. Las barras indican el grado de identidad que presentan los genes entre sí.

Para el clúster 1 de *S. albus* el agrupamiento más similar en *Streptomyces sp.* CS227 corresponde al clúster 20, en el cual la aplicación bioinformática incluye tres agrupamientos adicionales no relacionados con el de *S. albus*. Dos de los agrupamientos adicionales corresponden a los de biosíntesis de candicidinas y antimicinas, mientras que el tercero contiene genes que codifican un sistema PKS-NRPS no relacionado con el presente en el clúster 1 de *S. albus*. El cuarto clúster, también conteniendo un sistema PKS-NRPS muestra un elevado grado de similitud con el clúster de interés en *S. albus* y que según los datos obtenidos abarca desde el gen B9W68_29550 al B9W68_29670 (Tabla 32).

Tabla 32. Genes del agrupamiento génico 20 de *Streptomyces sp.* CS227.

Gen	Función	Hebra	Tamaño (bp)
B9W68_29550	Monooxigenasa dependiente de FAD	+	1191
B9W68_29555	Rieske 2Fe-2S	+	1179
B9W68_29565	PKS (dominio NRPS A)	+	9234
B9W68_29595	PKS	+	8925
B9W68_29600	PKS (malonil CoA-ACP transacilasa)	+	6120
B9W68_29605	Proteína de reparación a alquilación de ADN	+	1122
B9W68_29610	Aminotransferasa	+	3744
B9W68_29615	Proteína hipotética	+	309
B9W68_29620	Histona deacetilasa tipo II	+	1149
B9W68_29625	Tioesterasa	+	843
B9W68_29630	Transportador MFS	+	1557
B9W68_29635	Glioxalasa/proteína de resistencia a bleomicina /dioxigenasa	-	492
B9W68_29640	Glioxalasa	+	375
B9W68_29645	Proteína hipotética	+	588
B9W68_29650	Regulador transcripcional TetR/AcrR	-	591
B9W68_29655	Regulador transcripcional TetR	+	897
B9W68_29660	Proteína de escisión 3-keto-5-aminohexanoato	+	894
B9W68_29665	Deshidrogenasa 3-hidroxibutiril-CoA	+	1017
B9W68_29670	Tioesterasa 4-hidroxibenzoil-CoA	+	480

Una vez acotada la región de interés en el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227 ésta se comparó de nuevo con el clúster 1 de *S. albus* mostrando un elevado grado de identidad (del 86 al 100%) entre la mayoría de sus genes. La diferencia más significativa entre ambos agrupamientos radica en la ausencia de 4 genes presentes en el clúster 1 de *S. albus* y ausentes en el 20 de *Streptomyces* sp. CS227 (Figura 35). Estos genes diferenciales codificarían una proteína integral de membrana (SSHG_00033), una deshidrogenasa de cadena corta (SSHG_00032), una proteína hipotética (SSHG_00031) y un regulador transcripcional del tipo LysR (SSHG_00030).

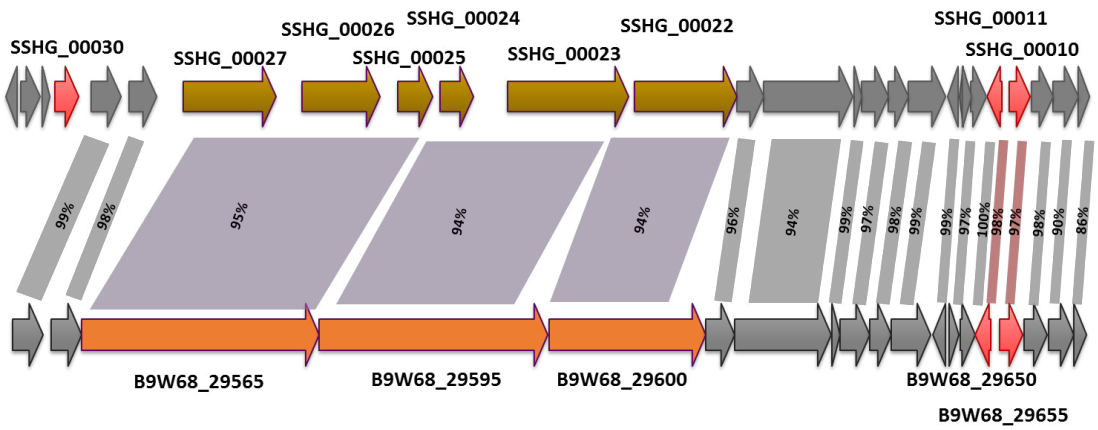


Figura 35. Análisis comparativo de los genes que componen el clúster 1 de *S. albus* J1074 y el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227. Las barras indican el grado de identidad que presentan los genes entre sí.

2. Caracterización del clúster 1 de *S. albus* J1074

Para identificar el producto o productos determinados por este clúster se llevaron a cabo varias estrategias que implicaron expresar el operón de genes biosintéticos y los diferentes genes reguladores que lo conforman *in situ*, empleando para ello el promotor constitutivo *ermE*p*, y generar paralelamente mutantes por reemplazamiento del operón de genes biosintéticos. También se llevó a cabo de forma paralela la expresión ectópica de los genes reguladores presentes en el clúster utilizando el plásmido multicopia pEM4T y el vector integrativo pSET152Ec.

Una vez obtenidas las nuevas cepas modificadas genéticamente, se cultivaron simultáneamente en diferentes medios de cultivo y se extrajeron muestras de los cultivos a diferentes tiempos (desde 24 hasta 168 horas) utilizando diferentes solventes orgánicos: acetato de etilo, acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, butanol y cloroformo. Los extractos se analizaron por UPLC y se compararon los cromatogramas obtenidos utilizando como control los correspondientes a la cepa silvestre. De este modo se pudo determinar si la sobreexpresión de algún gen o región inducia la aparición o aumentaba el tamaño de algún pico cromatográfico, o si por el contrario el reemplazamiento de algún gen o región conducía a la desaparición de picos observados en el control, indicando que la zona alterada está implicada en la biosíntesis de los compuestos ausentes.

Tras analizar los cromatogramas de las diferentes cepas cultivadas en diferentes medios de cultivo, se observó que el organismo silvestre (DRC-029) y la cepa mutante *S. albus* Δ1 (DRC-030) (portando una deleción de genes biosintéticos), ambas cultivadas en medio SM17 durante 120 horas y extraídas con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, presentaban una serie de picos diferenciales entre sí con diferentes espectros de absorción, aunque tres de los picos mostraban máximos de absorción similares que podría indicar que se trata de compuestos de la misma familia (Figura 36). Para dirimir qué compuestos contenía cada pico diferencial, ambos extractos fueron derreplicados para determinar las fórmulas moleculares asociadas a cada uno de los picos diferenciales y así determinar si se trataba de metabolitos desconocidos.

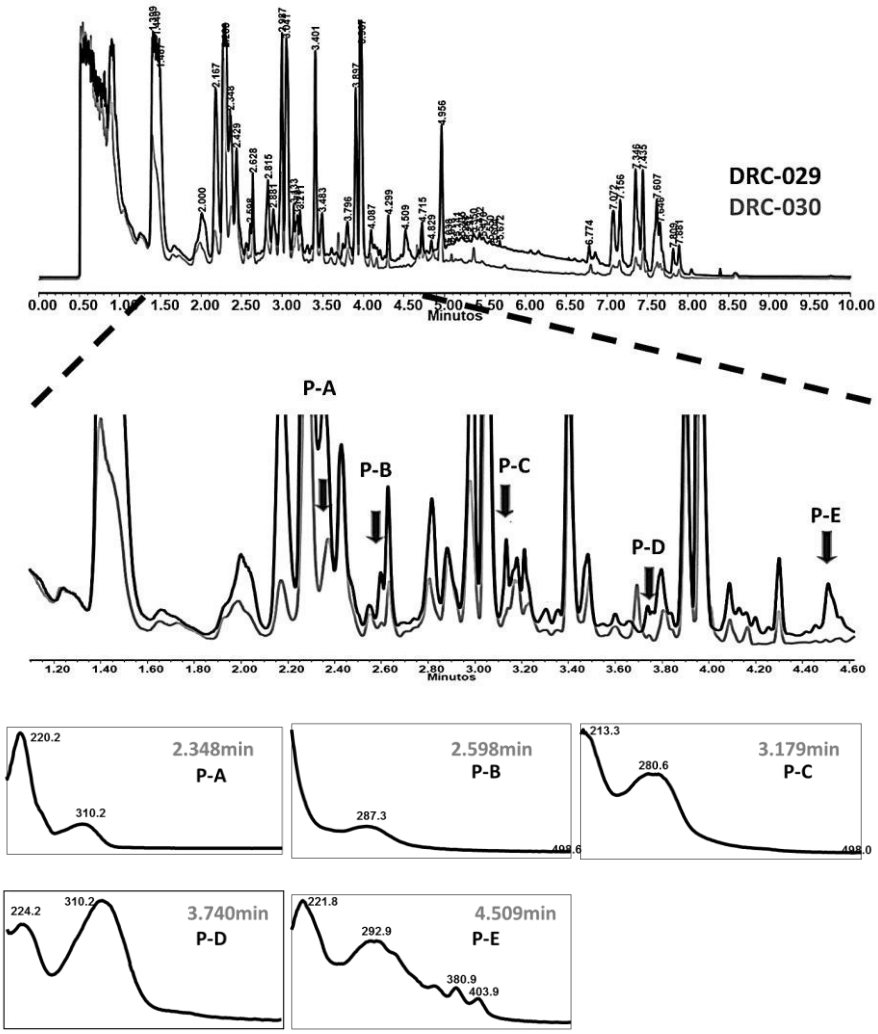


Figura 36. a. Cromatogramas comparativos obtenidos por UPLC (Maxplot) de *S. albus* J1074 (DRC-029) y del mutante *S. albus* Δ1 (DRC-030). Los extractos fueron obtenidos cultivando ambas cepas en medio de cultivo SM17 durante 120 horas y extrayéndolos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico. Los picos señalados con una flecha corresponden a los picos diferenciales encontrados (P-A a P-E). **b.** Espectros de absorción de los picos diferenciales. Para cada espectro se indica el tiempo de retención del pico al que representan.

La derreplicación (anexos, DRC-029 vs. DRC-030) indicaba la existencia de cinco picos diferenciales entre ambas muestras, de los cuales tres correspondían a compuestos conocidos: N-N-dimetiladenosina (**P-B**), ácido 2-aminobenzoico (**P-C**) y una mezcla de surugamidas, antimicinas y polienos (**P-E**). Dos de los picos contenían compuestos *a priori* desconocidos (Figura 37) que no se encontraban consignados en el diccionario de productos naturales para procariotas (DPN), P1 (**P-A**) al que se asoció la fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$, y P4 (**P-D**) que presenta la fórmula molecular $C_{18}H_{27}NO_5$.

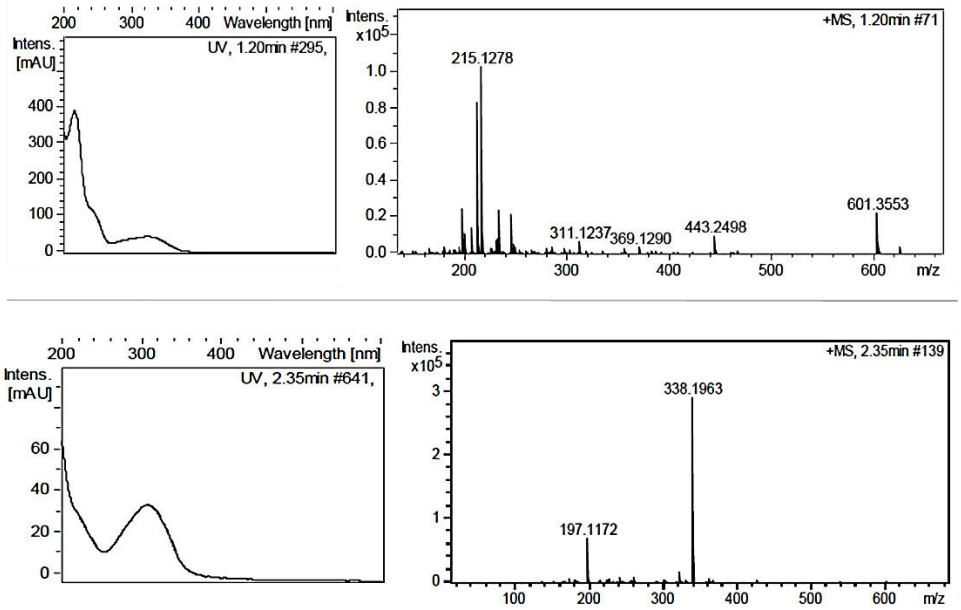


Figura 37. a. Espectros de absorción y masas relativas a los picos P1 (**P-A**) y P4 (**P-D**) obtenidos en la derreplicación DRC-029 vs DRC-030.

El pico P1 no se consiguió purificar al no ser localizado en los cromatogramas obtenidos durante la purificación en las condiciones de HPLC preparativo ensayadas. Por su parte, P4 fue purificado (UO-063) y su estructura molecular elucidada. Los resultados de esta elucidación mostraron la presencia de dos compuestos, uno mayoritario que resultó ser un metabolito ya descrito, ácido 9-(4-aminofenil)-3,7-dihidroxi-2,4,6-trimetil-9-oxo-nonoico (Wang *et al.,* 2010) y otro minoritario también descrito previamente como ácido 9-(4-aminofenil)-7-hidroxi-2,4,6-trimetil-9-oxo-2-nonenoico (Guan *et al.,* 2005), cuyas estructuras (Figura 38) no están asociadas a las actividades enzimáticas codificadas por genes del clúster 1 de *S. albus* J1074 ya que corresponden a versiones truncadas de candicidinas producidas por el clúster 5 .

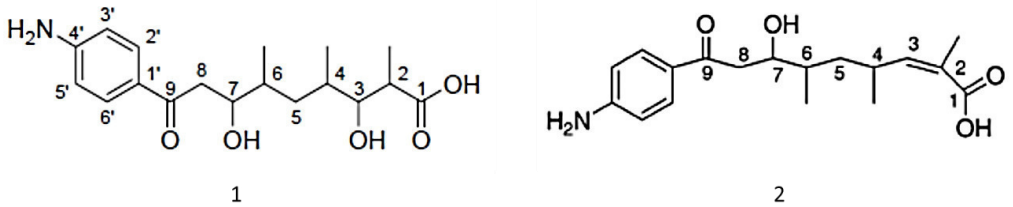


Figura 38. a. Estructura mayoritaria (**1**) y estructura minoritaria (**2**) obtenidas de la elucidación estructural del compuesto UO-063.

2.1. Caracterización del clúster 20 de *Streptomyces sp. CS227*

Para tratar de determinar el compuesto producido por este clúster, equivalente al clúster 1 de *S. albus* J1074, se generaron inicialmente dos cepas modificadas genéticamente. La primera, un mutante por reemplazamiento en el que se sustituyó el operón de genes biosintéticos (B9W68_29565, B9W68_29595 y B9W68_29600) por el gen de resistencia a apramicina

aac(3)IV. El segundo, una cepa con el mismo operón expresado bajo el control del promotor *ermE*p*. Posteriormente se llevó a cabo la sobreexpresión de los genes reguladores presentes en el clúster utilizando el plásmido multicopia pEM4T y el vector integrativo pSET152Ec.

Las diferentes cepas obtenidas junto con la cepa silvestre fueron cultivadas en múltiples medios de cultivo durante una semana a 30°C y 250 rpm de agitación. A partir de las 24 horas se apreciaban claramente diferencias cromáticas entre los cultivos de la cepa silvestre y los clones del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δ20 (Figura 39), a diferencia de lo observado con los cultivos de las diferentes cepas de *S. albus* con alteraciones en el clúster 1 donde no se apreciaron cambios similares. Las claras alteraciones en la coloración observadas entre la cepa silvestre y la mutante de *Streptomyces sp.* CS227 podría ser una indicación de la producción de compuestos diferenciales asociados a la presencia, ausencia, o cambio en el grado de expresión del clúster 20. Para comprobar este hecho se recogieron muestras cada 24 horas que fueron extraídas con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico o butanol para posteriormente analizar los extractos mediante UPLC y HPLC-MS.

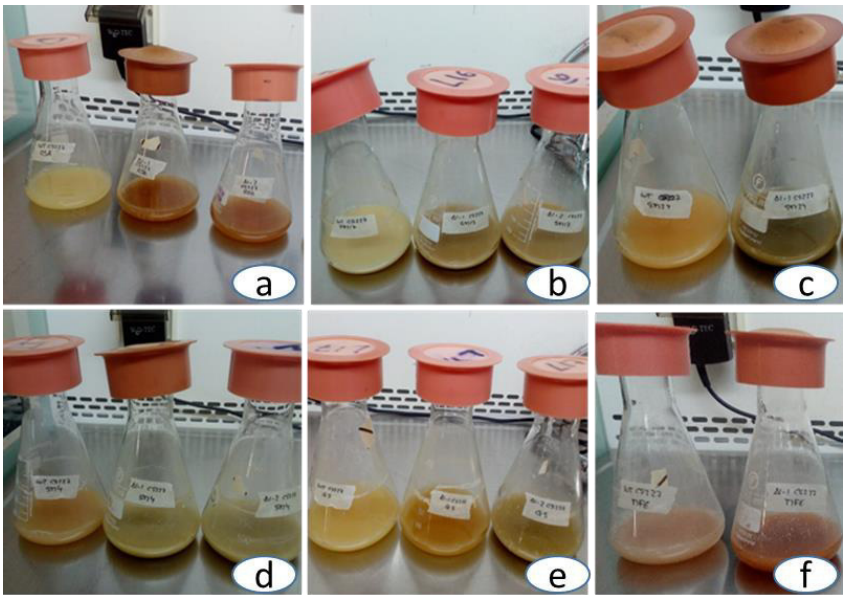


Figura 39. Cultivos de *Streptomyces sp.* CS227 y *Streptomyces sp.* CS227 Δ20 en diferentes medios de cultivo como R5A(**a**), SM17(**b**), SM24(**c**), SM4(**d**), GS(**e**) y MFE(**f**).

Al analizar los cromatogramas de los extractos generados a partir de cultivos en medio SM24 (también en MFE, GS y SM17) del organismo silvestre (DRC-062) y del mutante *Streptomyces sp.* CS227 Δ20 (DRC-063), obtenidos a uno y cinco días de cultivo utilizando acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, se identificaron tres picos diferenciales (Figura 40) que presentaban el mismo espectro y diferentes masas (*m/z* $[M+H]^+$) de 136,07, 184,16 y 259,9 Da, respectivamente (Figura 41).

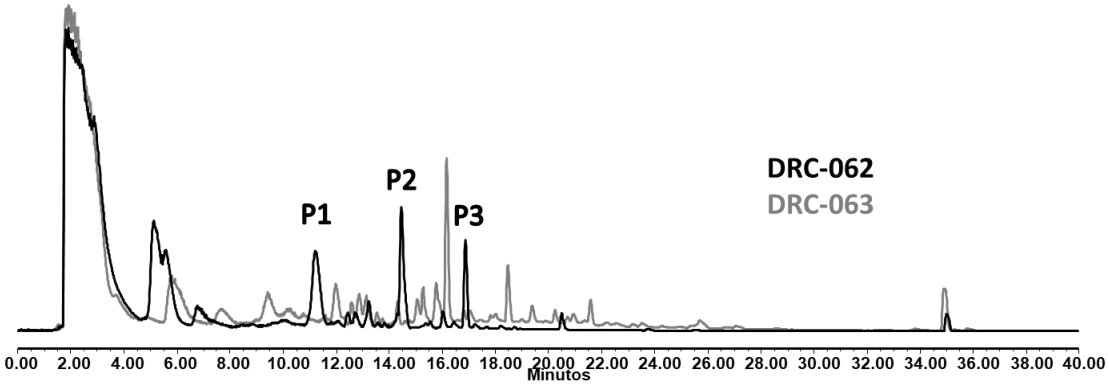


Figura 40. Cromatogramas comparativos obtenidos por HPLC-MS (Maxplot) de *Streptomyces sp.* CS227 (DRC-062) y de *Streptomyces sp.* CS227Δ20 (DRC-063). Los extractos fueron obtenidos cultivando ambas cepas en medio de cultivo SM24 durante 48 horas y extrayéndolos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico. Los picos señalados corresponden a los picos diferenciales localizados (picos 1 a 3).

Ambos extractos (DRC-062 y DRC-063) se enviaron a derreplicar para conocer las características químicas de los tres picos. No obstante, los resultados obtenidos (anexos, DRC-062 vs DRC-063) no fueron concluyentes ya que los picos aparecían en los cromatogramas en regiones sin absorbancia UV, por lo que no fue posible confirmar que los compuestos obtenidos en la derreplicación correspondieran con P1, P2 y P3.

3. Caracterización del clúster 13 de *S. albus* J1074

Para identificar el producto determinado por este clúster se generó un mutante por reemplazamiento en el que se sustituyó el operón de genes biosintéticos (B9W68_29565, B9W68_29595 y B9W68_29600) por el gen *aac(3)IV* y una cepa con el mismo operón expresado bajo el control del promotor *ermE*p*.

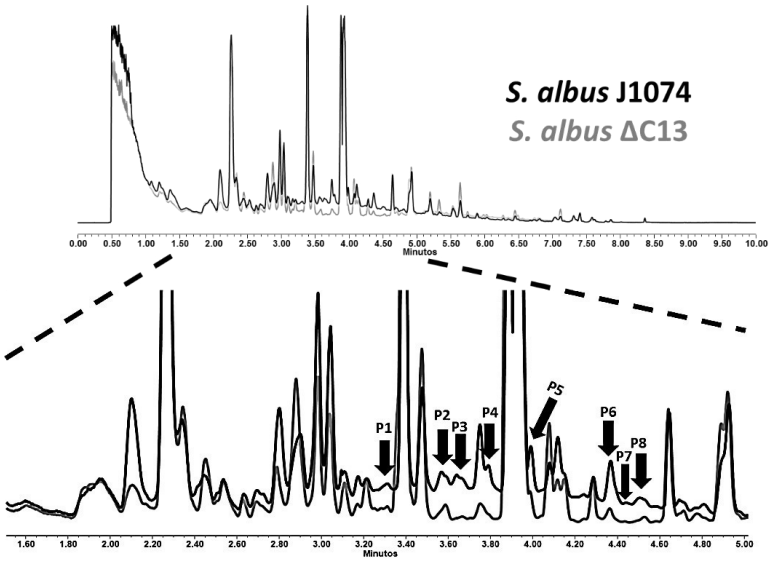


Figura 41. Cromatogramas comparativos obtenidos por UPLC (Maxplot) de *S. albus* J1074 y de *S. albus* ΔC13. Los extractos fueron obtenidos cultivando ambas cepas en medio de cultivo SM17 durante 120 horas y extrayéndolos

con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico. Los picos señalados corresponden a los picos diferenciales localizados (picos 1 a 8).

En el análisis de los cromatogramas de los extractos obtenidos a partir de cultivos en medio SM17 (Figura 41) usando acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, en el 5º día se observaban una serie de picos diferenciales o con una variación considerable con respecto a la producción correspondiente a la cepa silvestre. Sin embargo, a la hora de analizar sus espectros de absorción y masas se comprobó que la mayoría de estos picos diferenciales correspondían a compuestos ya conocidos (cabe destacar por su abundancia el caso de compuestos de la familia de las antimicinas observado en los picos P4, P5 y P6). El resto de picos, diferenciales o cuya producción en la cepa mutante se veía drásticamente reducida (P1, P2, P3, P7 y P8), eran pequeños por lo que resultó complicado abordar su identificación mediante el análisis de sus espectros de absorción y masas debido a la baja calidad que presentaban ambos espectros. Tampoco resultó útil para este fin el análisis cromatográfico de extractos de la cepa *S. albus* eC13 (contiene el promotor *ermE*p* clonado delante del operón de genes biosintéticos) ya que no se apreció aumento alguno en la producción de estos picos.

Sin embargo, analizando los datos obtenidos en la derreplicación DRC-029 correspondiente a la cepa silvestre cultivada durante 5 días en medio SM17 y extraída con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico (anexos, derreplicación DRC-029 Vs DRC-030) se observó una familia de compuestos identificados como surugamidas que por sus movilidad, espectros de absorción y masas (Figura 42) podían encajar con los correspondientes a los P2, P3, P7 y/o P8 señalados en los cromatogramas comparativos de *S. albus* J1074 y *S. albus* ΔC13. Las estructuras de las suguramidas A y E identificadas en *S. albus* J1074 así como otros representantes de la familia (Figura 43) encajan a la perfección con la ruta biosintética determinada por el clúster 13.

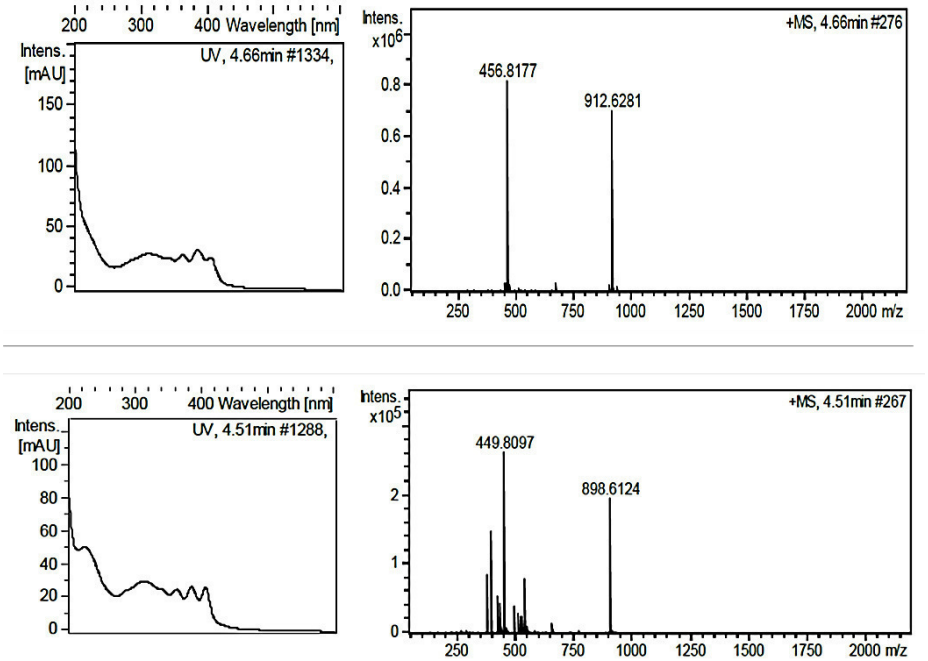


Figura 42. Espectros de absorción y de masas de surugamida A (superior) y surugamida E (inferior) obtenidas en la derreplicación DRC-029.

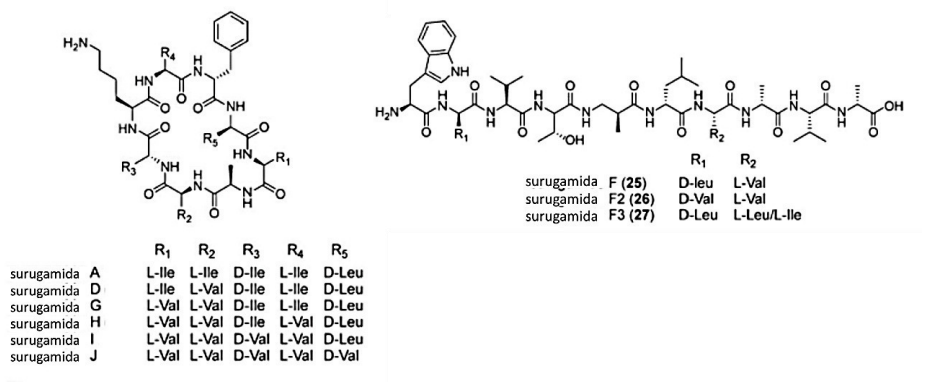


Figura 43. Estructuras moleculares de distintos compuestos de la familia de las surugamidas (imagen adaptada de Xu *et al.,* 2017).

El hecho de que pese a que el clúster posea 18 módulos NRPS los metabolitos sintetizados estén formados por una cantidad menor de aminoácidos se explica porque esta agrupación génica no implica a todos sus genes biosintéticos en la producción de un mismo metabolito, ya que se ha comprobado que en función del producto final generado actúan distintos genes biosintéticos pertenecientes al mismo agrupamiento (Ninomiya et al., 2016). Esto es, las surugamidas A–E son producidas por SurA y SurD, mientras que las surugamidas F serían sintetizadas por SurB y SurC, que actúan de manera independiente con respecto a la otra pareja de genes.

Pese a que se han encontrado homólogos a *surA*, *surB*, *surC*, y *surD* en varias cepas de estreptomicetos como en *Streptomyces sp.* JAMM992, *Streptomyces albus* J1074, *Streptomyces sp.* GBA 94-10 y *Streptomyces sp.* PVA 94-07 (Ninomiya et., al 2016), este mecanismo de biosíntesis aún deja ciertas incógnitas como por ejemplo el hecho de que las enzimas responsables de la producción de surugamidas A-E y surugamidas F carecen de dominios para la terminación de la cadena, como tioesterasa, reductasa terminal, o condensación. Se ha hipotetizado con que una β-lactamasa (Orf9, Figura 44) o una α/β hidrolasa putativa (Orf2, Figura 44) codificadas aguas arriba de surA-surD podría ser las encargadas de finalizar la biosíntesis, aunque no ha podido aún demostrarse.

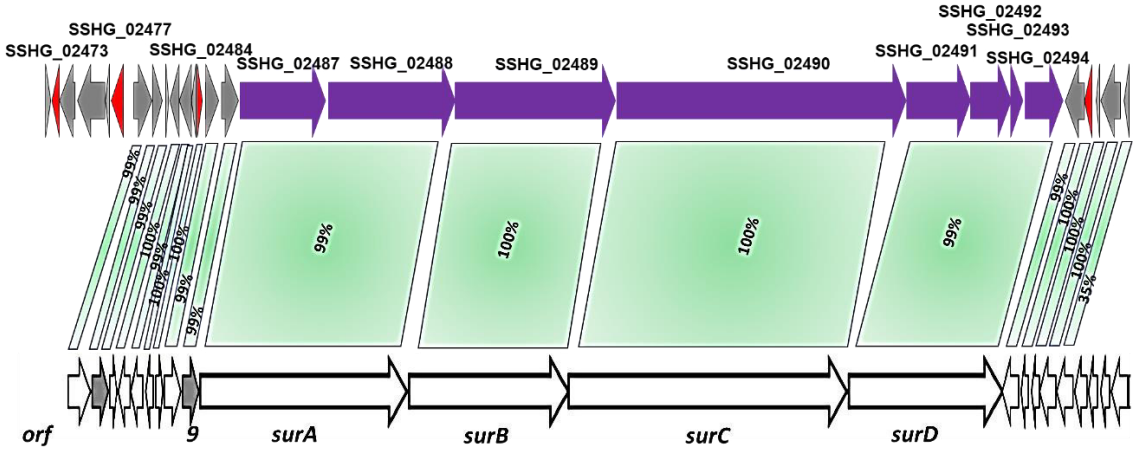


Figura 44. Comparación de los agrupamientos génicos de biosíntesis de surugamidas en *S. albus* J1074 y *Streptomyces sp.* JAMM992. Las surugamidas A-E y la surugamida F son producidas por surA/surD y surB/surC respectivamente. En gris se indican genes que codificarían una b-lactamasa (9) y una probable a / b hidrolasa.

Como se ha mencionado anteriormente el clúster 13 de *S. albus* J1074 presenta un alto grado de identidad con el clúster 16 de *Streptomyces* sp. CS227. Con objeto de lograr la caracterización de este clúster se llevó a cabo la misma estrategia que la ejecutada para activar el clúster 13 de *S. albus,* aprovechando incluso alguna de las construcciones diseñadas para *S. albus* J1074 debido a su alto grado de homología, y se obtuvieron con éxito las nuevas cepas modificadas genéticamente. Mientras se optimizaban las condiciones de cultivo para purificar los metabolitos sintetizados por los clústeres de *S. albus* y *Streptomyces sp*. CS227 y verificar su correcta adscripción a la familia de las surugamidas, se publicó un artículo en el cual se describía cómo se había logrado desencriptar este agrupamiento génico en *S. albus* 1074, elucidando la estructura de varios metabolitos análogos de la familia de las surugamidas (A, D, F, F2, F3, G, H, I y J) (Xu *et al.*, 2017). Por ello, se paró el estudio de este clúster.

4. Caracterización del clúster 14 de *S. albus* J1074

Para llevar a cabo la identificación del producto final de biosíntesis de este clúster se llevó a cabo la expresión del operón de genes biosintéticos y de los diferentes genes reguladores que lo conforman empleando el promotor *ermE*p* integrado *in situ* y la generación de mutantes por reemplazamiento tanto del operón de genes biosintéticos como de los diferentes genes reguladores.

La cepa silvestre y las modificadas genéticamente se cultivaron en diferentes medios de cultivo y se recogieron muestras diarias de los cultivos desde las 24 hasta las 168 horas que se extrajeron en diferentes solventes orgánicos (acetato de etilo, acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, butanol y cloroformo). Tras conseguir los extractos se comprobaron por UPLC y se compararon los diferentes cromatogramas obtenidos a partir de cultivos de la cepa silvestre con los de las distintas cepas portando *ermE*p* integrado y con los de las cepas mutadas por reemplazamiento. De esta manera se pudo comprobar si la expresión de alguna región o gen en concreto activaba o aumentaba la producción de algún pico o si el reemplazamiento de alguna región o gen regulador provocaba la desaparición de picos cromatográficos.

Tras analizar los resultados de los cromatogramas comparativos de los distintos cultivos para el clúster 14 en diferentes medios de cultivo (Figura 45) se observó que la cepa silvestre y la cepa mutante *S. albus* Δ14 (posee reemplazado el operón de genes biosintéticos por el gen *aaa(3)IV*) cultivadas en medio SM17 durante 120 horas, y extraídos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, presentaban una serie de picos diferenciales. Observando sus espectros se vio que algunos eran similares pudiendo indicar que se trataba de compuestos de la misma familia. Para comprobar con qué compuestos estaban relacionados estos picos diferenciales se derreplicaron ambos extractos.

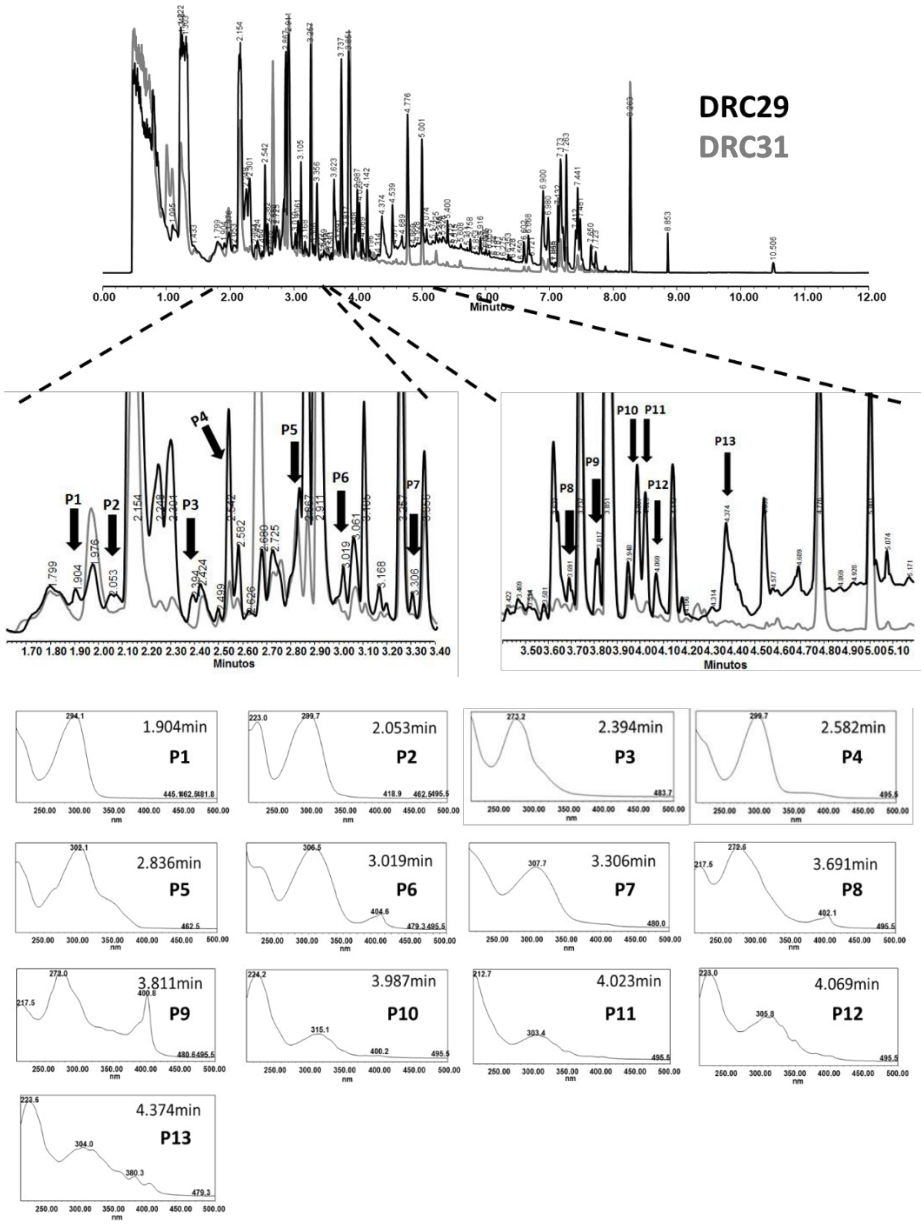


Figura 45. a. Cromatogramas comparativos de *S. abus* J1074 (DRC-029) y *S. albus* Δ14(DRC-031) obtenidos a partir de cultivos en medio cultivo SM17, 120 horas, extraídos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, donde se señalan en las regiones ampliadas del cromatograma original los picos diferenciales presentes entre ambas muestras. **b.** Espectros de absorción que presentan los picos diferenciales, indicando sus respectivos tiempos de retención.

Los resultados de esta derreplicación (anexos, DRC-029 vs DRC-031) mostraron tres picos (Figura 45, **P10**, **P11** y **P13**) presentes en los cromatogramas de la cepa silvestre que no se producen en la cepa mutante.

P10 tiene la fórmula molecular $C_{26}H_{43}NO_6$ y una masa de *m/z* 483.3430 [M+H$^+$] (Figura 46) que no se encuentra recogido en el DPN de procariotas. Este metabolito no se logró purificar al no haber resultado posible localizarlo en las condiciones ensayadas en el HPLC preparativo.

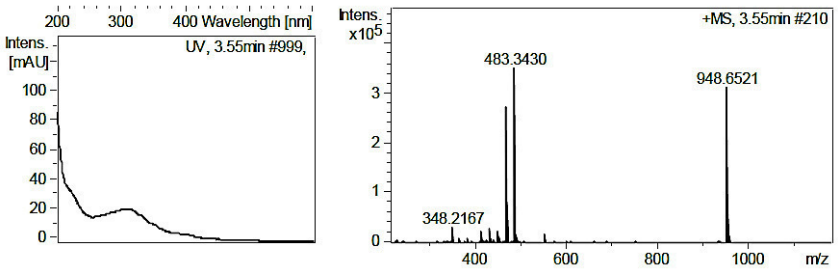


Figura 46. Espectro de absorción y masas relativos a P10 obtenidos en la derreplicación DRC-029 Vs DRC-031.

P11 presenta una fórmula molecular $C_{18}H_{30}NO_6S$, y masa de *m/z* 388.1788 [M+H$^+$], que no se encuentra recogido en el DPN de procariotas. El compuesto contenido en P11 (UO-132), aparentemente único, fue purificado para elucidar su estructura molecular. Los resultados mostraron que en realidad el pico contenía una mezcla de dos compuestos, que corresponden a urauchimicina D (Yao *et al.,* 2006) con un grupo formamida, mayoritario en la mezcla, y otro minoritario con la amina libre en esa posición (Figura 47). La urauchimicina D se localiza en los cromatogramas de UPLC como un pico separado de P11. No obstante durante la purificación utilizando un HPLC preparativo se comprobó que P11 y el pico correspondiente a urauchimicina D co-migraban, siendo el producto mayoritario del pico mezcla la urauchimicina D. Se abordó la separación de los dos componentes del pico mezcla utilizando diferentes solventes y gradientes cromatográficos pero finalmente el compuesto de P11 no consiguió ser obtenido con un grado de pureza aceptable para elucidar su estructura molecular.

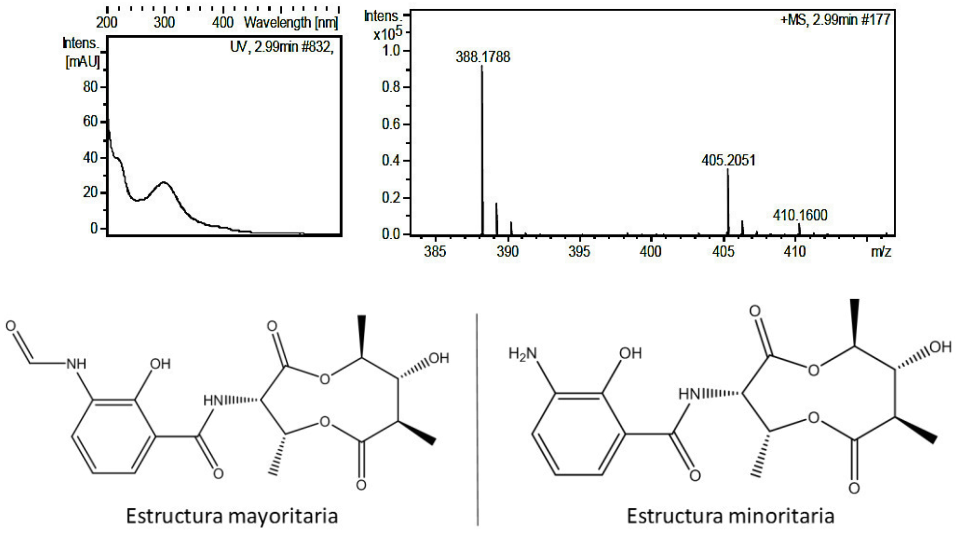


Figura 47. a. Espectro de absorción y masas correspondientes al compuesto UO-132 (P11) obtenidos en la derreplicación DRC-029 Vs DRC-031. **b.** Estructuras elucidadas del compuesto purificado UO-132.

P13 (UO-133) corresponde a la fórmula molecular $C_{13}H_{22}O_3$ con masa es de *m/z* 227.1641 [M+H$^+$], que en el DPN aparece representada por compuestos tipo furanona, si bien, ninguno de ellos tiene descrito un espectro de UV similar al experimental. Tras su purificación y posterior

elucidación estructural se comprobó que UO-0133 es una butenolida descrita para estreptomicetos marinos, tratándose de una mezcla de diastereómeros en *ratio* casi equimolar (Figura 48). No obstante, este compuesto no corresponde al esperado para la ruta de biosíntesis codificada por el clúster 14 de *S. albus* J1074, al no tratarse de un compuesto de naturaleza peptídica.

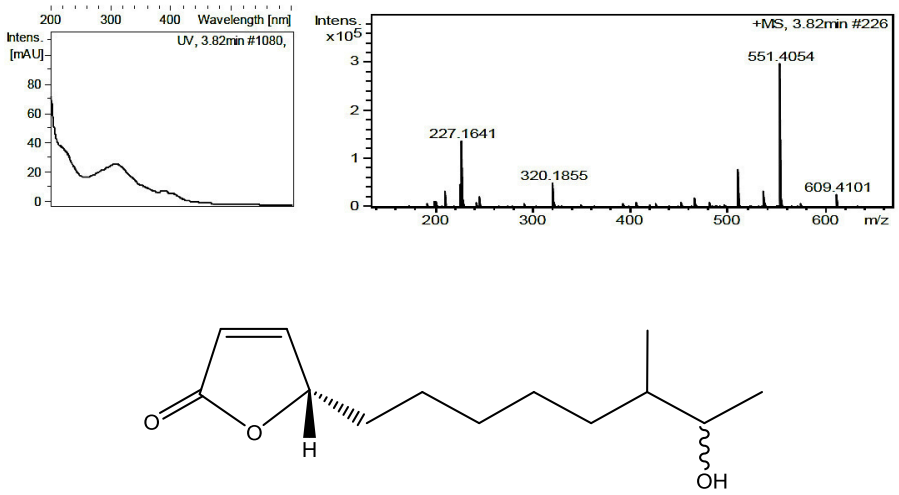


Figura 48. a. Espectro de absorción y masas relativos al compuesto UO-133 (P13) obtenidos en la derreplicación DRC-029 Vs DRC-031. **b.** Elucidación estructural del compuesto purificado UO-133.

5. Caracterización del clúster 21 de *S. albus* J1074

Los ensayos para caracterizar el clúster 21 se diseñaron siguiendo las mismas pautas mencionadas anteriormente para la caracterización del resto de clústeres de *S. albus*. Las diferentes cepas modificadas genéticamente se cultivaron en diferentes medios de cultivo tomando diariamente muestras de cada uno (de 24 hasta 168 horas) que se extrajeron utilizando diferentes solventes orgánicos (acetato de etilo, acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, butanol). Tras secar los extractos, estos se analizaron por UPLC.

Tras analizar los cromatogramas comparativos de los cultivos en diferentes medios de cultivo se observó que la cepa silvestre y la cepa mutante *S. albus* Δ21 (posee reemplazado el operón de genes biosintéticos por el gen *aac(3)IV*) cultivadas en medio GS durante 120 horas y extraídos con acetato de etilo presentaban una serie de picos diferenciales con espectros de absorción similares (Figura 49) aunque de baja calidad por el reducido tamaño de los picos.

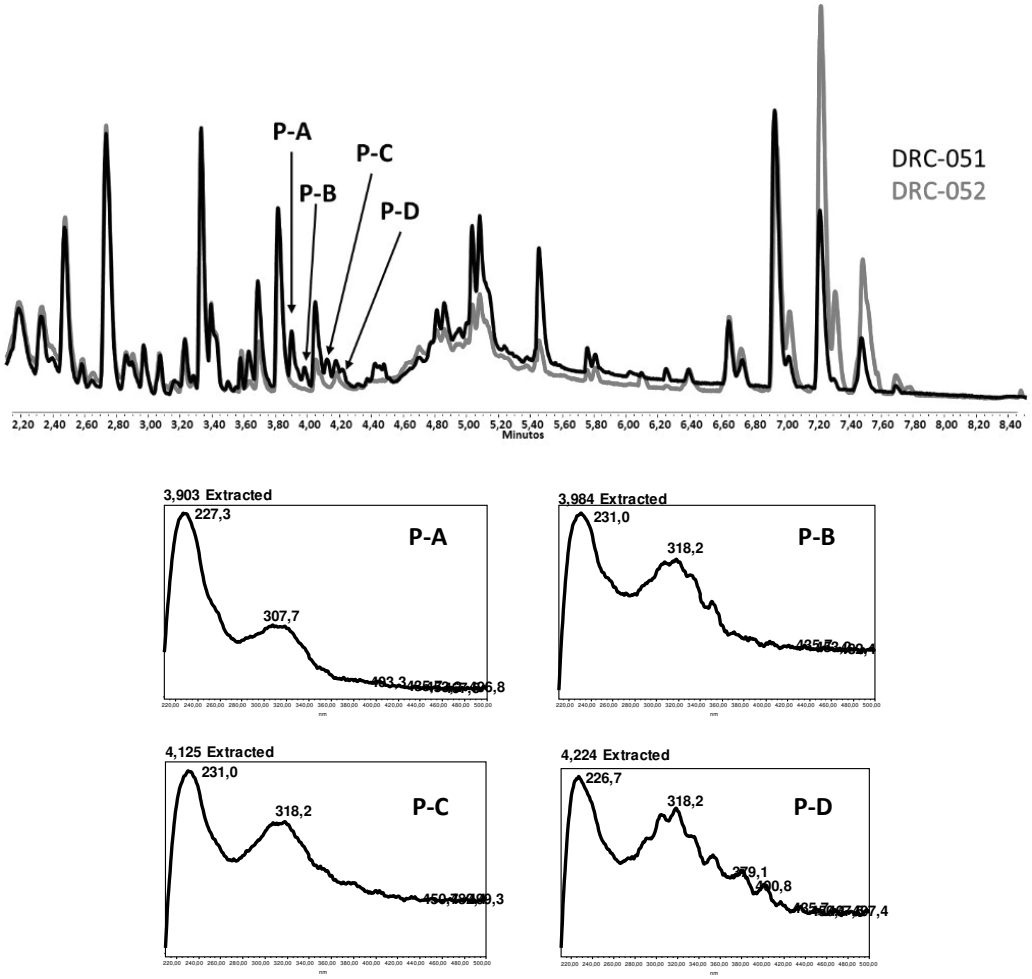


Figura 49. Cromatogramas comparativos obtenidos por UPLC (Maxplot) de *S. albus* J1074 y de *S. albus* Δ21. Los extractos fueron obtenidos cultivando ambas cepas en medio de cultivo GS durante 120 horas y extrayéndolos con acetato de etilo. Los picos señalados corresponden a los picos diferenciales localizados (picos A-D) cuyos espectros de absorción se detallan.

Los extractos se analizaron mediante HPLC-MS (Figura 50) para determinar las masas relativas a cada uno de los picos diferenciales. Sin embargo, en estos nuevos cromatogramas no se apreciaban los mismos picos diferenciales entre ambos extractos que los observados anteriormente en UPLC, lo cual es un problema bastante frecuente debido a las diferentes condiciones de solvente y características de columnas que emplean ambos sistemas cromatográficos. El primer pico detectado sí que parecía coincidir por su espectro con los hallados en UPLC, y se determinó su masa (*m/z* 481,53 $[M+H]^+$). En cambio, el segundo pico diferencial en HPLC-MS no poseía el mismo espectro que los de los cromatogramas de UPLC y no pudo ser localizado en éste al reanalizar el cromatograma. Este P2 presentaba una masa molecular de *m/z* 442,26 $[M+H]^+$. Ambas muestras, *S. albus* J1074 (DRC-051) y *S. albus* Δ21 (DRC-052), se derreplicaron para tratar de aclarar la naturaleza de los compuestos contenidos en los picos correspondientes.

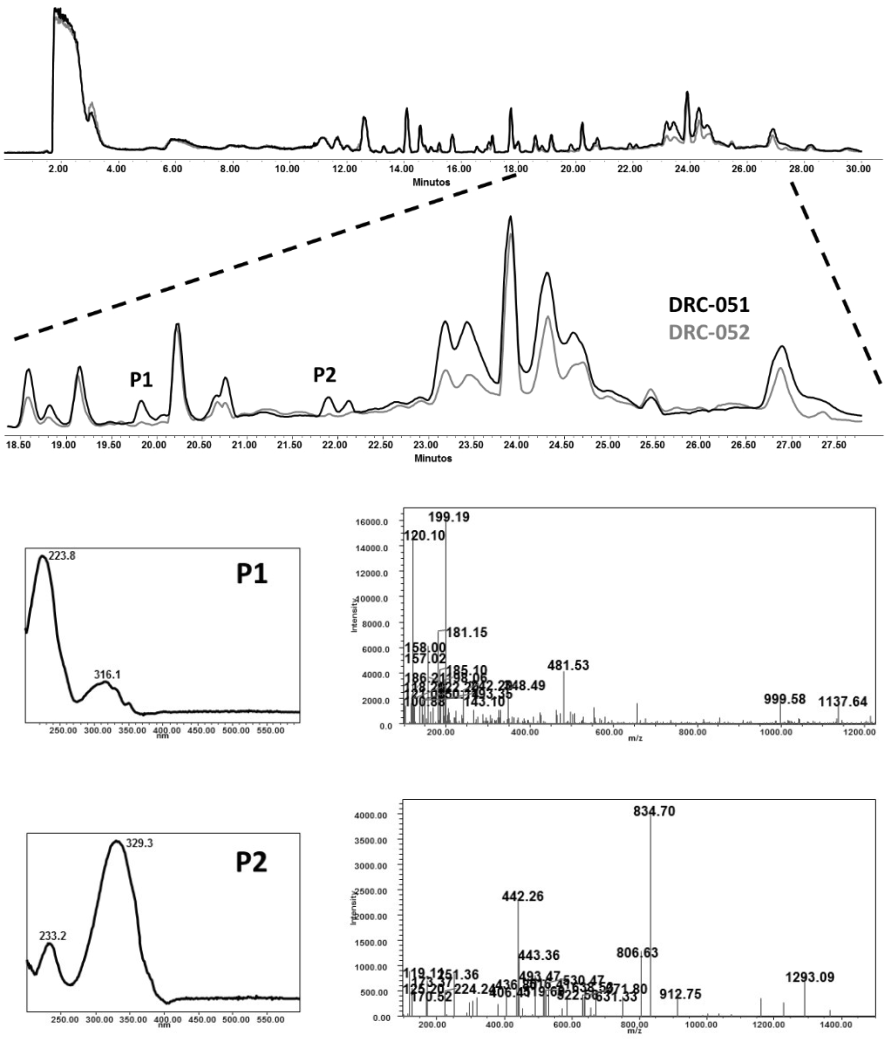


Figura 50. Cromatogramas de HPLC-MS comparativos de DRC-051 (*S. abus* J1074) y DRC-052 (*S. albus* Δ21) obtenidos a partir extractos secos de cultivos de ambas cepas en medio de cultivo GS durante 120 horas y extraídos con acetato de etilo. En la región ampliada del cromatograma original se indican los picos diferenciales P1 y P2. También se muestran los espectros de absorción que presentan ambos picos.

Los resultados (anexos, DRC-051 vs DRC-052) mostraban la presencia de tres picos diferenciales, pero se indicaba que la muestra en general estaba bastante saturada por polienos, lo cual enmascaraba y dificultaba sobremanera la determinación de los compuestos relativos a los picos de interés. Para el primer pico se sugería la fórmula molecular $C_{23}H_{32}N_2O_9$, la cual no está presente en el DPN. También se indicaba que, considerando su espectro de UV y la fórmula molecular, tuviera relación con antimicinas, cuya presencia era abundante también en la muestra. Por las características del espectro de absorción y de su masa molecular (*m/z* 481,2179 $[M+H]^+$) (Figura 51, **a**) este primer pico corresponde con el P1 que se halló en HPLC-MS (Figura 50).

El segundo pico presenta la fórmula molecular $C_{26}H_{35}NO_5$ y tampoco tiene coincidencias en el DPN para procariotas. Considerando la fórmula molecular y el espectro de UV (ignorando la contaminación por polienos presente), el componente muy probablemente se trate de un oxopolieno. Por sus características y masas molecular (*m/z* 442,2584 $[M+H]^+$) (Figura 51, **b**) este pico se trata claramente del P2 observado en los cromatogramas de HPLC-MS (Figura 50).

El tercer pico (Figura 51, **c**) localizado únicamente en la derreplicación muestra una fórmula molecular $C_{26}H_{37}NO_5$, sin coincidencias en el DPN para procariotas. Se trata de un componente relacionado con el analizado en el segundo pico, pero con el espectro de UV muy contaminado. Posiblemente también sea un oxopolieno. Se trató de localizar por su masa (*m/z* 444,2739 $[M+H]^+$), pero no se obtuvo resultados coincidentes en los cromatogramas del HPLC-MS.

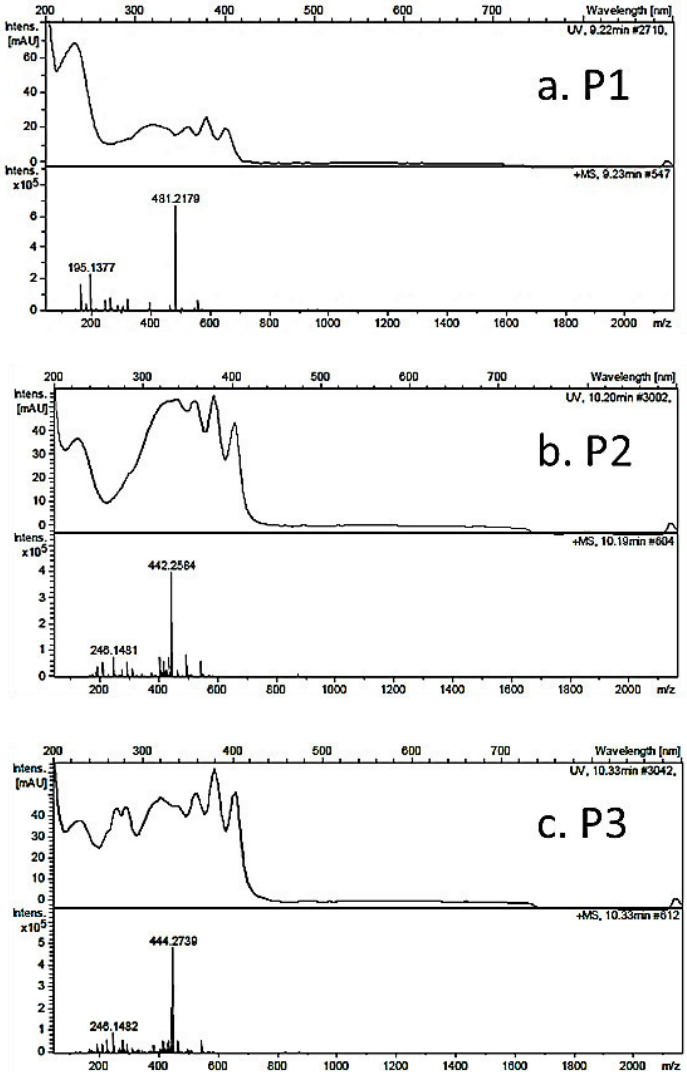


Figura 51. Espectros de absorción y masas relativos a los picos P1 (**a**), P2 (**b**) y P3 (**c**) obtenidos en la derreplicación DRC-051 vs DRC-052.

A partir de estos resultados, se dedujo estudiando sus características e intentando encajarlas con las características de los genes del clúster que estos compuestos no se trataban de compuestos producto de la ruta de biosíntesis de este agrupamiento génico y su falta de producción en la cepa mutante posiblemente sea debida a algún tipo de regulación cruzada con otro u otros clústeres biosintéticos. Esta aseveración se debe a que el clúster 21 es un clúster NRPS y los polienos identificados de acuerdo con sus características serían sintetizados por un clúster PKS-I ya que aparentemente se trata de formas truncadas de candicidinas ya identificadas en ensayos previos del grupo a la hora de realizar manipulaciones genéticas en el clúster de paulomicinas de *S. albus* J1074 (González *et al.,* 2016).

6. Aproximaciones metabólicas a la activación de clústeres biosintéticos

6.1. Pruebas de diferentes medios del cultivo

Con el fin de identificar nuevos metabolitos secundarios producidos por *S. albus* J1074 se siguió el método de variaciones en las condiciones de cultivo conocido por sus siglas en inglés como método OSMAC (*One Strain Many Compounds*).

Para este trabajo se cultivó *S. albus* J1074 en diferentes medios de cultivo (Tabla 33), tomando como control el medio R5A, ya que es el utilizado sistemáticamente de forma rutinaria, y se realizaron análisis cromatográficos (UPLC y HPLC-MS) de los extractos obtenidos a diferentes tiempos usando diferentes solventes. También fueron cultivadas en la batería de medios de cultivo todas las cepas modificadas genéticamente descritas en los apartados anteriores.

Tabla 33. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de las cepas en estudio. En verde se muestran aquellos cultivos en los que se identificó y purificó algún pico diferencial, en amarillo los cultivos con picos diferenciales observados por cromatografía pero de los que no se logró su purificación, y en rojo medios de cultivo en los que no se encontraron picos diferenciales.

	***S. albus* J1074**	**Clúster 1 *S. albus***	**Clúster 13 *S. albus***	**Clúster 14 *S. albus***	**Clúster 21 *S. albus***	**Clúster 16 *Streptomyces sp.* CS227**	**Clúster 20 *Streptomyces sp.* CS227**
R5A							
SM17							
Gauze							
SM19							
SM20							
SM26							
SM							
MFE							
SM12							
SM6							
GS							
SM10							
SM10 (-K_2HPO_4)							
SM24							
SM25							
SM1							
SM4							
SM5							

De manera general, podía apreciarse en los cromatogramas comparativos de *S. albus* J1074 y de las diferentes cepas modificadas en algún punto de su cromosoma que había variaciones importantes en ciertos picos que correspondían, de acuerdo a sus respectivos espectros de absorción, a compuestos ya identificados en trabajos previos del grupo como productos de biosíntesis de esta cepa (Olano *et al.,* 2014): paulomicinas, alteramidas, antimicinas y candicidinas (Figura 52).

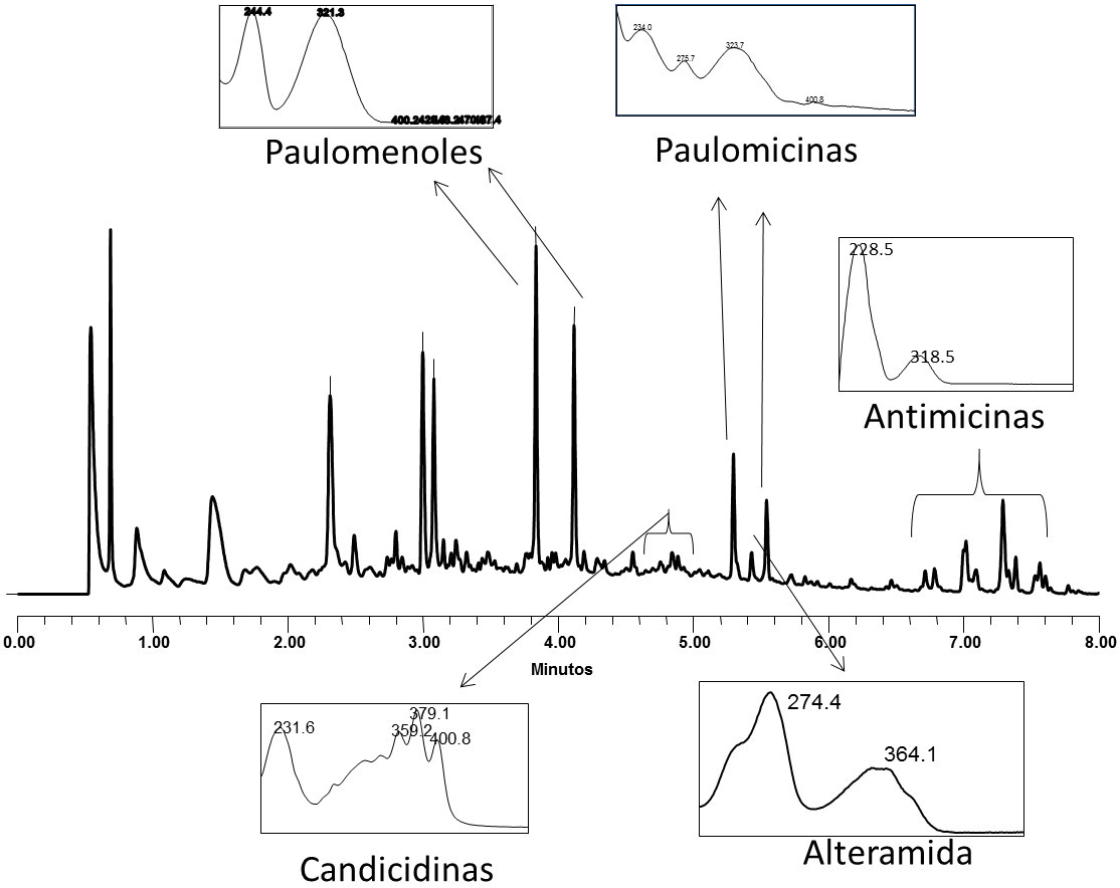


Figura 52. Metabolitos identificados que son sintetizados por la cepa *S. albus* J1074 en medio de cultivo R5A.

Este hecho llevó a revisar la literatura sobre estas familias de compuestos y se advirtió que las candicidinas y las antimicinas están implicados en una serie de procesos de regulación cruzada entre ellos (McLean *et al.*, 2016) y a su vez con otra serie de compuestos como alteramidas y paulomicinas, todos ellos producidos por *S. albus* J1074. De ahí que en muchos casos se observaran una serie de picos diferenciales entre los cromatogramas comparados, indicando que la modificación de ciertas regiones, aunque no sean las propias encargadas de la biosíntesis de estos compuestos, implican cambios de pauta en la producción de compuestos generados por otras rutas biosintéticas del genoma de la cepa (Figura 53). Este hecho ya se reportó en una Tesis Doctoral previa del grupo (González, 2016b) indicándose que las modificaciones genéticas introducidas impulsaban cambios en el modelo habitual de producción de ciertos metabolitos no relacionados con los genes o agrupaciones génicas manipulados.

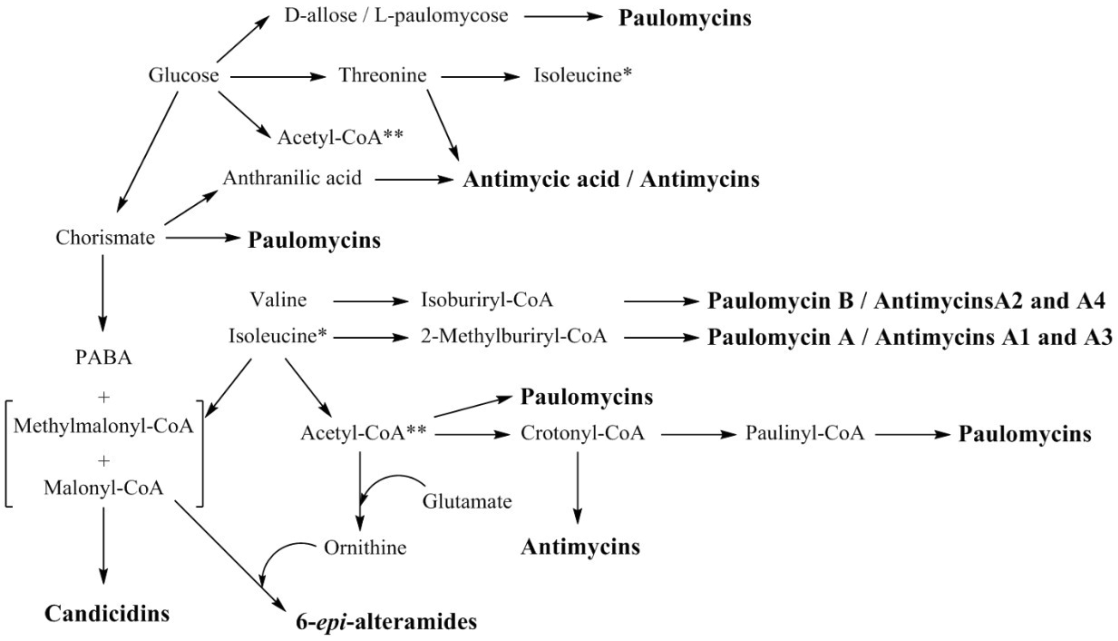
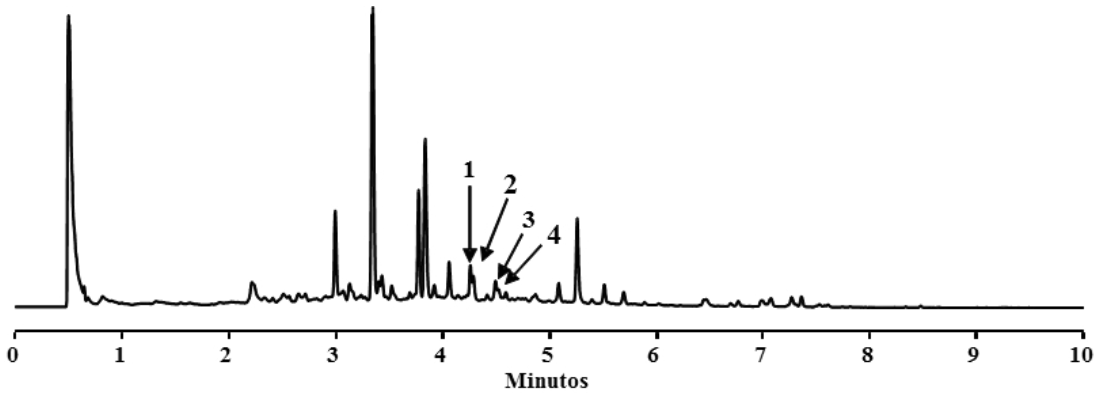


Figura 53. Origen metabólico de los precursores necesarios para la biosíntesis de paulomicinas, 6-*epi*-alteramidas, candicidinas y antimicinas. Los productos finales se representan en negrita. Con asterisco se señalan aquellos precursores localizados en diferentes ramas (González *et al*., 2016b).

En los extractos de la cepa silvestre de *S. albus* J1074 cultivada en medio MFE durante 120 horas y extraídos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico se observaron cuatro picos cuyos espectros de absorción hacían recordar a compuestos de la familia de las paulomicinas. Estos compuestos fueron purificados (Figura 54) y se corroboró que se trataba de metabolitos derivados de paulomicinas. Todo el trabajo relacionado con su identificación, purificación y análisis se detalla en el apartado 8.



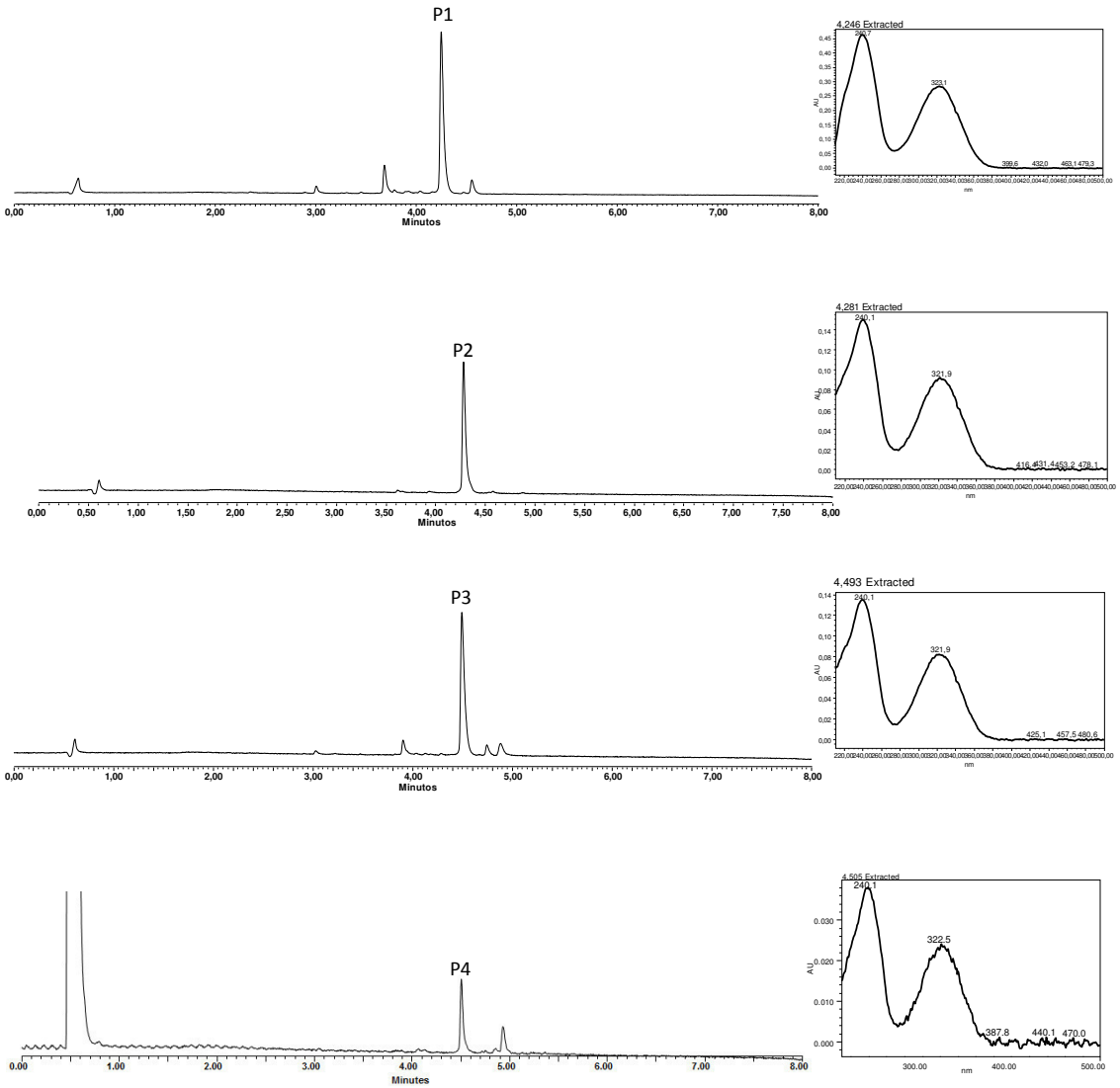


Figura 54. Cromatograma de UPLC a una longitud de onda de 238 nm obtenidos de cultivos de *S. albus* J1074 en medio MFE durante 4 días extraídos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico. Los picos señalados corresponden a los cuatro picos localizados (numerados del **1** al **4** respectivamente). Además, se muestran los cromatogramas resultantes de las purificaciones de los cuatro picos junto con sus respectivos espectros de absorción.

En los cultivos de la cepa silvestre en medio SM17 se podía ver de forma generalizada un considerable aumento en la producción de la mayor parte de los compuestos observados en los cromatogramas, es por ello que éste sea el medio de cultivo en el que más casos de picos diferenciales se han encontrado en este estudio. Sin embargo, este aumento tan pronunciado en la producción suponía que gran cantidad de los picos contuvieran más de un compuesto coeluyendo con la misma movilidad, hecho que dificultaba sobremanera su purificación al resultar imposible separarlos aplicando diferentes gradientes, solventes y columnas en el HPLC preparativo empleado para tal fin. Pese a estas trabas ha sido posible estudiar ciertos picos que suscitaban interés por sus características químicas.

En los cultivos de *S. albus* (Figura 55) caben destacar cuatro picos que, pese a no haberse podido purificar con un grado óptimo de calidad para hacer un análisis profundo sobre ellos, sí que han dejado muestras de ser potenciales candidatos a los diferentes casos de estudio.

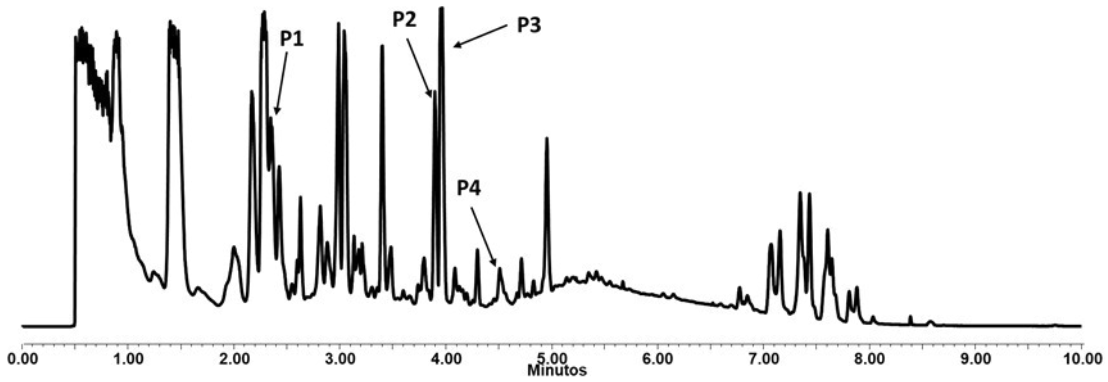


Figura 55. Cromatograma de un extracto de *S. albus* J1074 cultivado durante 120 horas en medio SM17 y extraído con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico.

En el caso del P1, éste desaparecía en los cromatogramas de la cepa *S. albus* Δ1, pudiendo indicar que el operón de genes biosintéticos que esta cepa posee reemplazados sería el responsable de su producción. Los extractos de la cepa silvestre y de la cepa mutante obtenidos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico fueron derreplicados (anexos, DRC-029 vs DRC-030) y los resultados mostraron que este pico no se encontraba en el DPN y podría ser un potencial candidato a ser derivado de la ruta de biosíntesis de este agrupamiento génico. Sin embargo, no fue posible purificarlo al no ser localizado en los cromatogramas obtenidos durante la purificación en el HPLC preparativo empleado.

Los picos P2 y P3 se encontraron en los cromatogramas de la cepa silvestre mientras que en los de la cepa *S. albus* Δ14 no se apreciaba su producción. Su derreplicación (anexos, DRC-029 vs DRC-031) indicó que se trataba de metabolitos no consignados en el DPN, y acorde a las masas moleculares que presentaban podían ser productos sintetizados por los genes que forman parte de este agrupamiento. No pudieron purificarse con la suficiente calidad como para elucidar su estructura química, debido a que a su alrededor había una cantidad de metabolitos que resultaron imposibles de separar.

El pico 4 (Figura 55) se mostraba, en la misma derreplicación en la que se analizó P1 (DRC-029), como una mezcla de varios compuestos como surugamidas, antimicinas y polienos. Analizando las características de los compuestos de la familia de las surugamidas (Figura 43) se comprobó que podrían encajar en la ruta biosintética del clúster 13 de *S. albus* y de su homólogo clúster 16 en *Streptomyces sp.* CS227. Al llevar a cabo su purificación ésta no fue posible porque su producción era muy baja, sumado a que al coeluir con antimicinas y polienos impedían alcanzar una cantidad de producto suficiente y un grado de pureza mínimamente aceptable para hacer los oportunos análisis. Por otro lado, en el momento en que se estaba desarrollando su purificación el grupo de Xu y colaboradores publicaron un artículo en el que caracterizaron el

clúster 13 de *S. albus* y confirmaron que las surugamidas (A, D, F, F2, F3, G, H, I y J) eran los productos de biosíntesis implicada por los genes que lo conformaban (Xu *et al.*, 2017).

En los cultivos de *Streptomyces sp.* CS227 surgieron una serie de cromatogramas (Figura 56) que al compararlos con los de *Streptomyces sp.* Δ20 mostraban una serie de picos diferenciales que poseían el mismo espectro de absorción, indicando que estaban relacionados químicamente. Estos extractos fueron enviados a derreplicar y de acuerdo con los resultados obtenidos no se ha podido obtener un resultado concluyente al encontrarse los tres picos en el cromatograma en regiones sin absorbancia UV que no permitían asegurar que los resultados mostrados correspondieran con P1, P2 y P3.

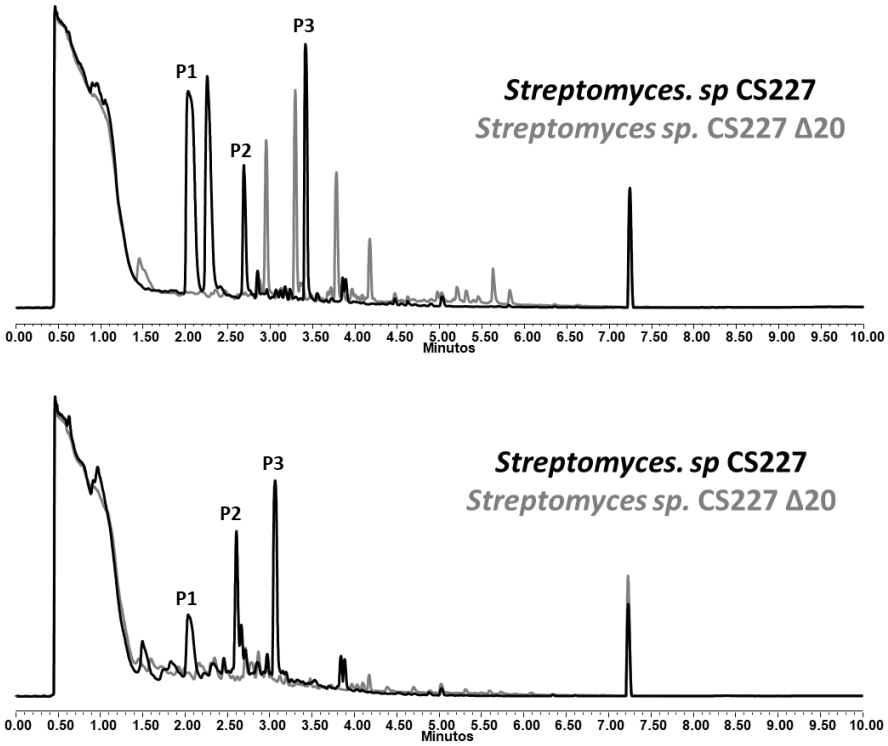


Figura 56. Cromatogramas comparativos de UPLC obtenidos a partir de extractos de *Streptomyces sp.* CS227 frente a *Streptomyces sp*. CS227 Δ20 obtenidos a partir de cultivos en medio MFE (superior) y en SM24 (inferior).

6.1.1. Elicitores

Como medio de cultivo base para la utilización de elicitores químicos se usó R5A y MM, que servirán como controles para determinar qué variaciones metabólicas provocan en las distintas cepas los distintos elicitores. Los elicitores químicos empleados fueron etanol (EtOH) 1% y 6%, DMSO (dimetil sulfóxido) 3% y 5%, escandio como ejemplo de tierras raras a una concentración final de 200µM, N-acetil-glusosamina (NAcGl) a una concentración final de 50mM y triptófano a una concentración final de 37 µg/ml (Tabla 34). Estos elicitores fueron seleccionados al haberse demostrado su eficacia en otros ensayos publicados (Introducción, apartado 2.4.2.).

Tabla 34. Medios de cultivo [R5A y MM (medio mínimo)] suplementados con diferentes elicitores. En rojo se muestran los medios de cultivo en los que no se encontraron picos diferenciales.

	Clúster 1 *S. albus*	**Clúster 13 *S. albus***	**Clúster 14 *S. albus***	**Clúster 21 *S. albus***	**Clúster 16 *Streptomyces sp.* CS227**	**Clúster 20 *Streptomyces sp.* CS227**
R5A + EtOH 1%						
R5A + EtOH 6%						
R5A + DMSO 3%						
R5A + DMSO 5%						
R5A + Escandio (200µM)						
MM + NAcGl (50mM)						
MM + Triptófano						

En ninguno de los casos se obtuvieron picos nuevos diferenciales ni se observó un aumento significativo con respecto al obtenido en los cultivos con medios sin suplementar. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se concluyó que los elicitores ensayados o las concentraciones empleadas no ejercieron un efecto positivo sobre la expresión de los agrupamientos génicos en estudio. Por el contrario, algunos elicitores a una determinada concentración mostraron un efecto inhibidor sobre el crecimiento y por ende sobre la producción de alguna familia de compuestos. Por ejemplo, en los cromatogramas obtenidos en R5A suplementado con etanol al 1% no se apreciaban picos diferenciales nuevos con respecto al control, aunque sí era claro que el elicitor actuaba como inhibidor de la síntesis de varios compuestos como candicidinas y antimicinas (Figura 57).

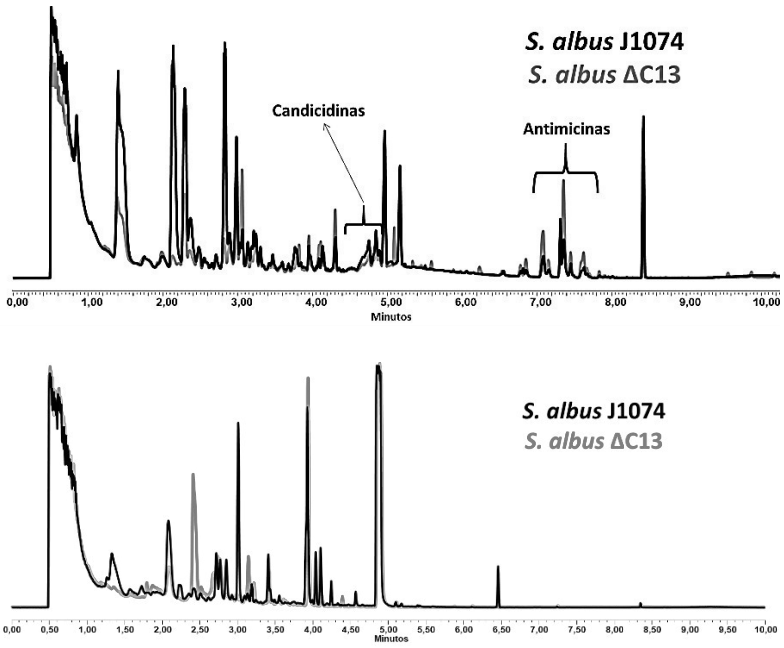


Figura 57. Cromatogramas de producción de *S. albus* J1074 y *S. albus* Δ13 en R5A (superior) y R5A + 1% etanol (inferior).

7. Cuantificación de la expresión de genes en clústeres biosintéticos

Dado el escaso éxito obtenido en los experimentos encaminados a la identificación de los compuestos determinados por los diferentes clústeres en estudio, se diseñó un sistema para determinar el grado de expresión de cada clúster cuantificando el nivel de expresión de los promotores esenciales en cada uno de ellos.

7.1. Generación de un vector testigo

A la hora del diseño de un plásmido que actuara como sistema testigo de los promotores de los genes biosintéticos se decidió plantearlo usando el plásmido suicida pOJ260, incapaz de replicación en *Streptomyces* spp., que portaría como gen testigo el gen de biosíntesis de indigoidina SSHG_00313 de *S. albus* J1074.

En primer lugar, se probó si el medio de cultivo podría afectar de alguna manera a la producción del pigmento, para lo que se usó una cepa productora de indigoidina, *S. albus* 313 que posee el gen SSHG_00313 sobreexpresado bajo el promotor *ermE*p* (Olano *et al.*, 2014), en cuatro medios de cultivo sólidos diferentes (TSA, R5A, Bennet y MA) y en dos medios de cultivo líquidos (R5A y TSB), todos ellos medios de cultivo empleados rutinariamente para cultivar cepas de *Streptomyces*.

En los medios sólidos se comprobó cómo *S. albus* 313 cultivado en TSA esporulaba con mayor dificultad que en los otros dos medios, además la coloración azul de la indigoidina apenas pudo observarse a las 24 horas de cultivo, ya que a partir de ese momento la coloración adquiría un tono marrón y hacía imposible apreciar si había síntesis del pigmento (Figura 58). Por otra parte, tanto en MA como en Bennett sí que se apreciaba claramente la síntesis de indigoidina gracias a la pigmentación azul en el medio de cultivo. Además, se comprobó un hecho no descrito previamente en ensayos publicados sobre el tema, y es que el micelio quedaba totalmente blanco sin presencia del pigmento, lo que indica que las células son capaces de expulsarlo al medio extracelular. La indigoidina generada es aparentemente soluble en el medio de cultivo ya que difunde por toda la placa (Figura 58).

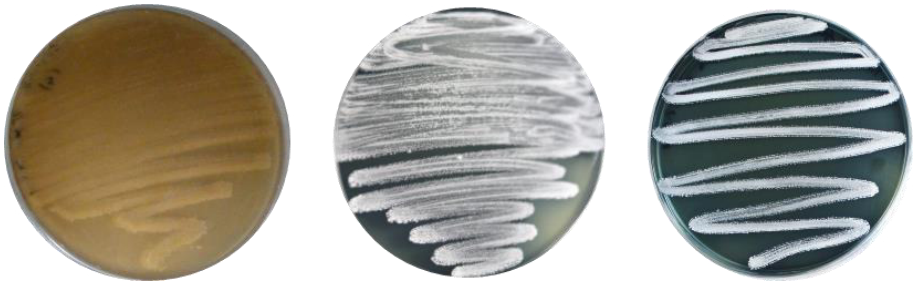


Figura 58. Cultivos en medio sólido de *S. albus* 313. Los medios empleados fueron **a.** TSA, **b.** Bennett y **c.** MA.

En cultivos líquidos (Figura 59) se observó que en el medio TSB ocurría con el pigmento el mismo fenómeno que en su forma sólida, tornando el color azul rápidamente a un tono marrón. Al agitarlo volvía a aparecer la coloración azul de manera tenue, pero rápidamente volvía al tono

marronáceo. Esto podría indicar que lo que ocurre es que en este medio el pigmento sufre una reducción que hace que cambie de color, y que la oxidación producida por la agitación ejercida provoca en cierta manera que recupere momentáneamente la forma azulada. En R5A, sin embargo, no sucedía este fenómeno de reducción del compuesto hasta que habían transcurrido varios días de cultivo, lo que indica que el medio TSB tiene en su composición algún agente que acelera el proceso de reducción de la indigoidina. Este hecho es debido al comportamiento del pigmento frente al pH del medio, factor que afecta tanto a su coloración como a su solubilidad (Elazari-Volcani, 1939) en caso de que el pH sea excesivamente ácido, torna a un color marrón, y en caso de un pH básico adquiere un tono amarillento.

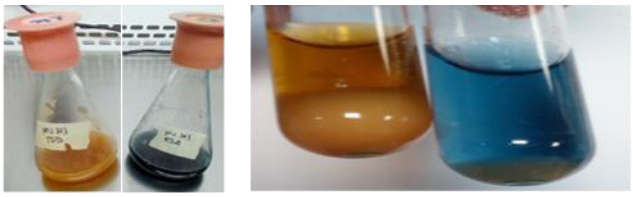


Figura 59. a. Cultivos en medio líquido (TSB y R5A) tras 24 horas para la *S. albus* 313. **b.** Cultivos centrifugados (TSB y R5A). Se observa cómo la indigoidina (o su forma reducida en el caso del medio TSB) son solubles en el agua del medio de cultivo. Además, también cabe destacar que los pellets son totalmente blancos, lo que indica que el pigmento es secretado completamente al medio extracelular.

7.2. Cuantificación del nivel de expresión de los promotores de estudio

Para la construcción del vector pOJ260ind (Figura 60), base para el sistema testigo, el primer paso consistió en el diseño de oligonucleótidos (tabla 13 apartado materiales y métodos) con los que amplificar SSHG_00313 añadiendo en sus extremos enzimas de restricción (EcoRV y EcoRI) para así poder clonarlo en pOJ260. Una vez amplificado el gen por PCR se insertó el fragmento en el plásmido comercial pCRBlunt para secuenciarlo usando los cebadores universales M13fw y M13rv, además de otros cebadores internos del gen diseñados para secuenciar el amplicón en su totalidad debido al gran tamaño que posee.

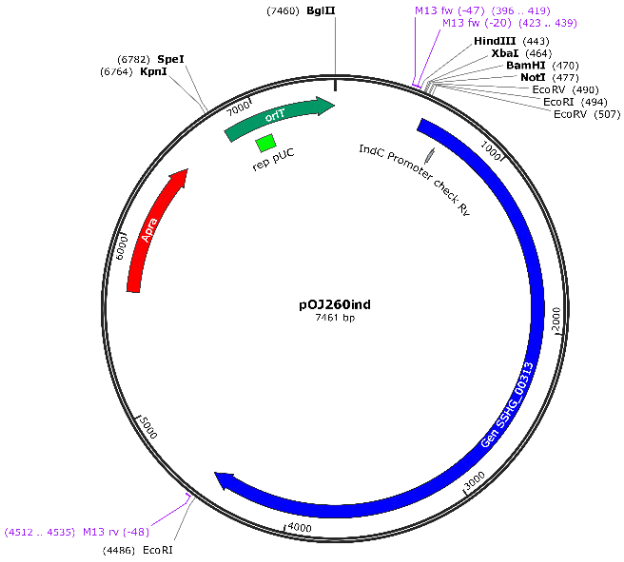


Figura 60. Mapa del vector pOJ260ind

Una vez clonados en el vector pOJ260ind las regiones promotoras a estudiar (Figura 61 y Tabla 21, Material y métodos) se introdujeron en *S. albus* J1074 para de esta forma insertar el gen SSHG_00313 *in situ* en la posición adecuada. La correcta inserción del gen SSHG_00313 en cada una de las nuevas cepas obtenidas se verificó mediante PCR utilizando para ello cebadores externos a cada uno de los promotores en cuestión y un cebador interno al gen productor del pigmento.

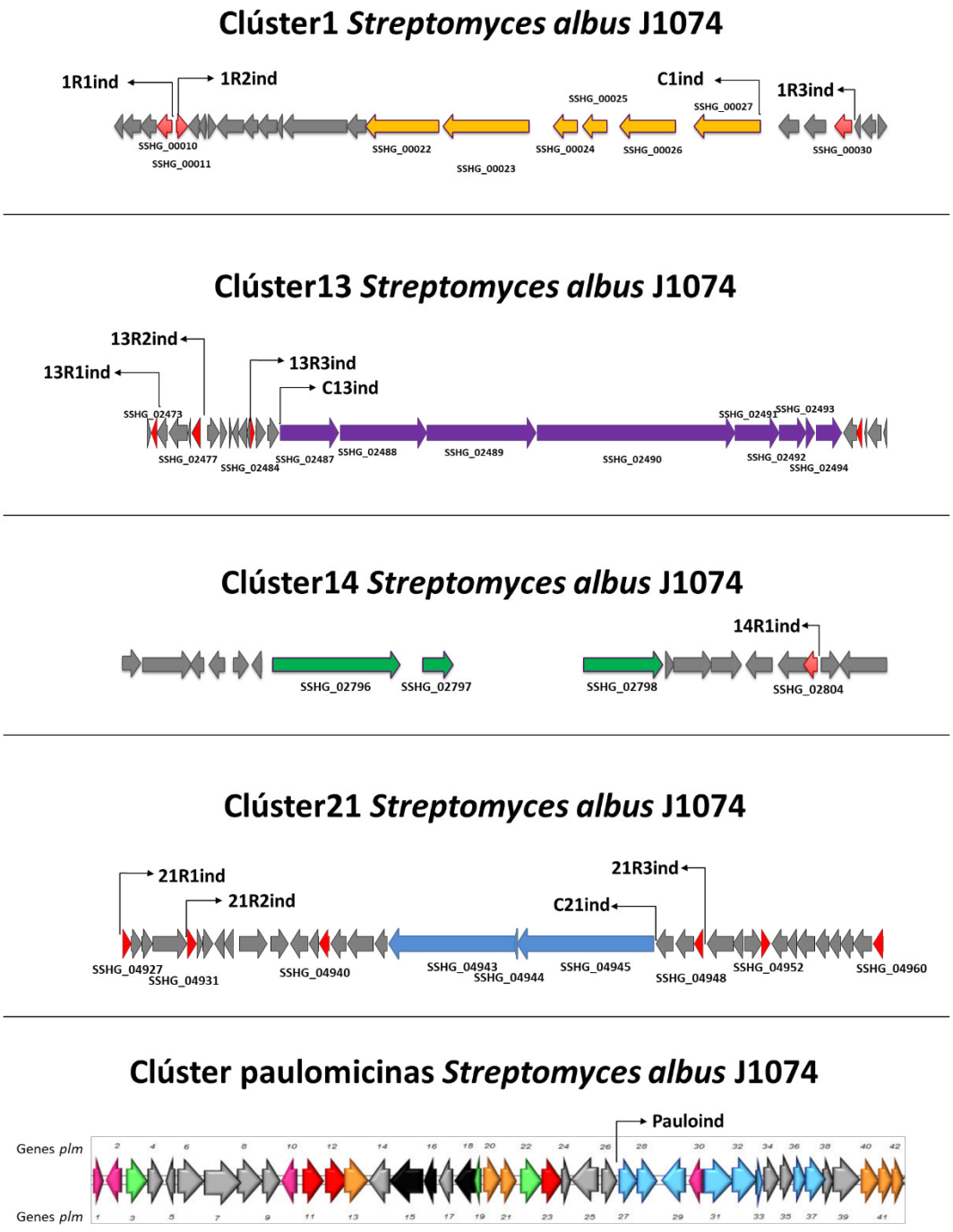


Figura 61. Diferentes localizaciones de las regiones promotoras bajo cuyo control se ha situado el gen testigo SSHH_00313 para cuantificar su nivel de expresión.

Para corroborar que el plásmido pOJ260ind puede actuar como un sistema testigo cuantificable para medir el nivel de expresión de promotores se diseñó un ensayo en el cual, una vez obtenidas las distintas cepas con el plásmido integrado situando al gen SSHG_00313 aguas abajo de los distintos promotores de estudio, se cultivaran esporas de cada cepa en medio R5A (Figura 62) para posteriormente poder medir su densidad óptica (DO) por espectrofotometría a una longitud de onda de 590 nm siguiendo el protocolo descrito en Materiales y métodos, apartado 14.4.2. El control positivo para estos ensayos lo constituyó la cepa *S. albus* 313 que contiene el gen SSHG_00313 bajo el control del promotor *ermE*p* (pOJ313).

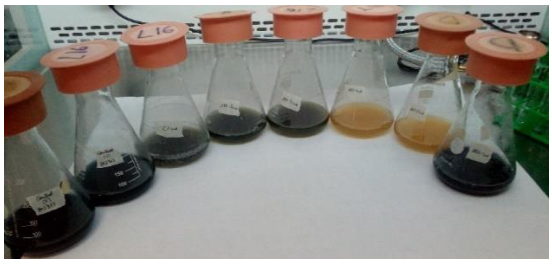


Figura 62. Cultivos para el estudio de la cuantificación de los niveles de expresión de los promotores del clúster 1 de *S. albus* J1074. Pueden apreciarse claramente diferentes tonalidades en los medios de cultivo, lo cual es extrapolable al nivel de expresión de cada uno de los promotores [pOJ313 como control + (**1** y **2**), C1ind (**3**), 1R1ind (**4** y **5**), 1R2ind (**6** y **7**) y 1R3ind (**8**)].

La validación del sistema en cuanto a su capacidad para cuantificar diferentes niveles de expresión que sean extrapolables a distintos niveles de producción de los compuestos generados por la ruta de biosíntesis implicada en cada caso, se realizó cuantificando el nivel de expresión de promotores de la ruta de biosíntesis de paulomicinas en dos cepas de *S. albus* J1074, una de ellas superproductora de paulomicinas (WT-2) y otra no productora de paulomicinas (WT-1). En concreto, se clonó el gen SSHG_00313 delante del promotor situado al comienzo del operón de genes biosintéticos de ácido páulico, en la región intergénica situada entre los genes *plm*26 (SSHG_05338) y *plm*27 (SSHG_05339). De este modo podría comprobarse si el sistema testigo diseñado era válido para cuantificar por espectrometría la producción o no producción de metabolitos secundarios de acuerdo a la cantidad de indigoidina generada por la expresión de los promotores propios de cada gen o agrupación génica estudiados.

A la hora de llevar a cabo la cuantificación del nivel de expresión de cada promotor de interés (Tabla 21) se diluyeron 200µl de cultivo en 800µl de medio de cultivo estéril en cubetas de espectrofotometría (Figura 63) para evitar una posible saturación en las medidas del espectrofotómetro que generara errores en el aparato, de forma que el resultado obtenido de la muestra diluida representaba ¼ del valor real.

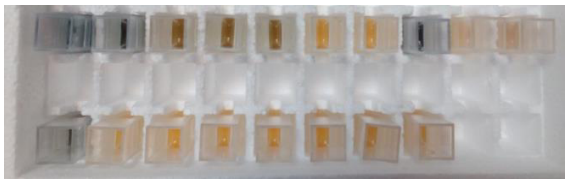


Figura 63. Cubetas de espectrofotometría de distintas muestras cuantificadas.

En los resultados obtenidos con la cepa superproductora de paulomicinas y la cepa no productora (Figura 64) se observa de manera fehaciente cómo hay una gran diferencia en el valor de DO obtenido (la superproductora alcanza valores de 9,2 mientras que la no productora apenas llega a alcanzar 0,25) y, por lo tanto, el valor obtenido es extrapolable ya no sólo a la diferencia en el nivel de expresión de los promotores propios de cada gen o agrupamiento génico, sino también al nivel de producción de metabolitos sintetizados en la ruta biosintética de la que forman parte.

Tras realizar las comprobaciones anteriores se procedió a aplicar el ensayo para la serie de promotores de interés (Tabla 21, Figura 61). En primer lugar, se cultivaron las distintas cepas obtenidas y el control *S. albus* 313 (Olano *et al.*, 2014) en medio R5A, al ser éste el medio de cultivo habitual empleado en ensayos rutinarios de producción. A partir de los resultados de este ensayo de cuantificación de la indigoidina generada (Figura 64) se extrae, en primer lugar, que el control (+) empleado muestra unos valores de DO relativamente altos como cabía esperar, llegando a alcanzar valores de 6 unidades de DO, de manera que el promotor *ermE*p* sobreexpresa de una manera fuerte al gen SSHG_00313. En algunas de las muestras se obtienen valores aún mayores que los del control, lo que indica que los promotores implicados en esos casos expresan el gen correspondiente de una forma aún mayor que *ermE*p* en las condiciones de cultivo probadas.

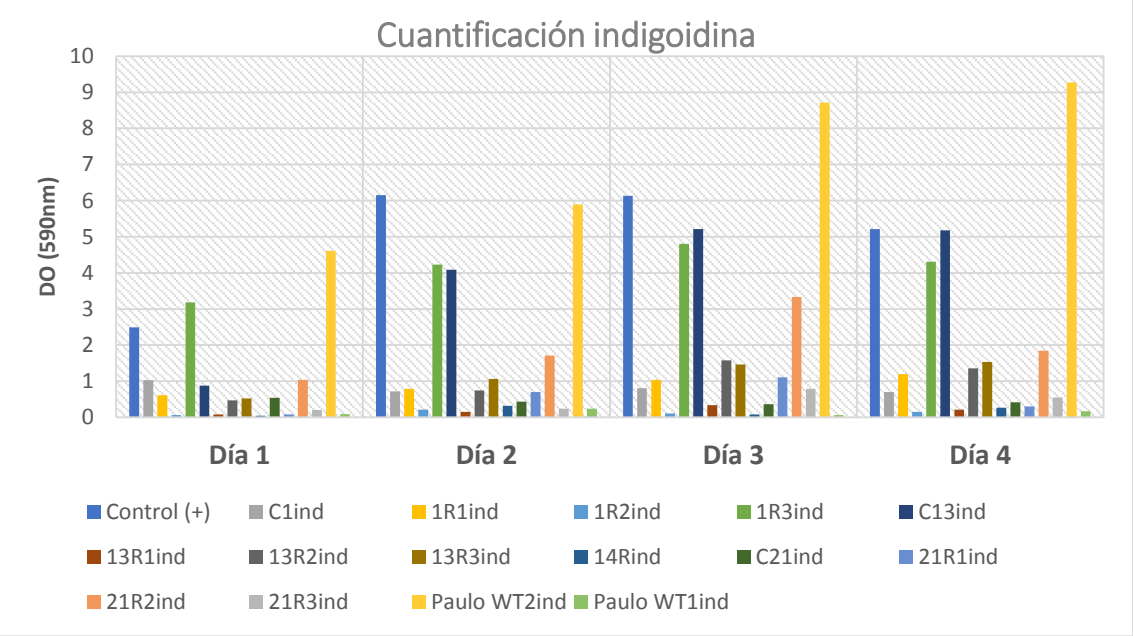


Figura 64. Valores de DO (medida a una longitud de onda de 590nm) obtenidos en los ensayos de cuantificación de indigoidina obtenidos para la medida de los niveles de expresión de los distintos promotores de los genes o agrupaciones génicas de estudio de la Tesis Doctoral.

Los valores obtenidos para el clúster 1 muestran que el promotor del operón de genes biosintéticos no es muy activo, presentando valores de DO (590) en torno a 1, por lo que se entiende que no se expresa en un alto grado. En cuanto a los promotores de los reguladores de

este clúster hay dos (1R1ind y 1R2ind) también con valores de DO (590) cercanos a 1 en el primer caso y apenas 0,25 en el segundo. Sin embargo, el promotor del gen SSHG_00030 (1R3ind), un regulador transcripcional del tipo LysR/GntR, tiene valores de DO (590) bastante altos llegando a alcanzar incluso un valor de 5, lo que indica que se está expresando de una manera fuerte. Viendo las características de este último gen cabe pensar que se trata de un gen regulador que inhibe la síntesis de los genes biosintéticos del clúster, hecho que podría ser la causa de la baja producción mostrada en los cromatogramas realizados (Resultados, apartado 2).

Para el clúster 13 se clonaron los promotores del operón de genes biosintéticos así como también los de tres genes reguladores (SSHG_02473, SSHG_02477 y SSHG_02484) que al comienzo de este estudio se tenía constancia de su presencia. Examinando los resultados del promotor del operón de genes biosintéticos de surugamidas (C13ind), que producen cantidades pequeñas de estos compuestos, se observa cómo su valor de DO (590) de 5 es menor que para la muestra de la cepa superproductora de paulomicina (WT-2ind), la cual produce cantidades de paulomicinas y derivados mucho mayores. Con estos datos se reafirma la idea de que los resultados de este método no sólo indican el grado de sobreexpresión de los promotores implicados, sino que también pueden ser extrapolables para obtener una estimación grosera de la cantidad de compuesto sintetizado. De los tres promotores de genes reguladores, dos de ellos (6R2ind y 6R3ind) presentan un grado de expresión mucho menor que C13ind, alrededor de 1,5 unidades de DO, dato curioso que aparentemente contradice la clasificación inicial de estos genes como represores de la síntesis de surugamidas.

En el clúster 14 se cuantificó el nivel de expresión del promotor del gen SSHG_02804 (regulador transcripcional PadR) (14Rind) único regulador presente en el clúster. Pese a que con los datos obtenidos se observa que la expresión de este promotor es casi nula, con un valor cercano a 0,3 unidades de DO y, en principio, su acción no estaría afectando a la biosíntesis del clúster, ante la eventualidad de que se trate de un activador se diseñó una cepa que tuviera el gen expresado bajo la acción del promotor *ermE*p*. Sin embargo, en los cromatogramas no se observaron picos diferenciales que indicaran un incremento en la producción de algún metabolito.

En el caso del clúster 21 se clonaron en el vector pOJ260ind tanto el promotor del operón de genes biosintéticos como los promotores de los tres genes reguladores (SSHG_04927 denominado 21R1, SSHG_04931 denominado 21R2 y SSHG_04948 denominado 21R3) (Figura 61). Tanto el promotor del operón de genes biosintéticos (C21ind), como el del gen SSHG_04948 (regulador transcripcional de dos componentes) (21R3ind) no parecen expresarse de manera significativa (Figura 64), presentando valores de 0,5 y 0,8 unidades de DO respectivamente. Por otro lado, los promotores de los genes SSHG_04927 (regulador transcripcional del tipo TetR) (21R1ind) y SSHG_04931 (regulador transcripcional) (21R2ind) muestran valores de expresión más relevantes comparados con los anteriores, de 1,1 para 21R1ind y de 3,3 para 21R2ind. Esto podría indicar que estos dos genes poseen una función inhibidora y que debido a su expresión estaría impidiendo la activación de los genes biosintéticos del clúster. Aunque faltaría por analizar el nivel de expresión de los promotores de los tres genes reguladores que fueron hallados más tarde mediante análisis bioinformáticos (SSHG_04940, SSHG_04952 y SSHG_04960) se han diseñado oligonucleótidos para poder generar nuevas cepas mutantes que tengan reemplazados estos seis genes (Tabla 9), ya sea de manera individual o combinada, con

el fin de tratar de mostrar si alguno o algunos de ellos impiden por su efecto inhibitorio la activación de la maquinaria biosintética de este clúster y así tener una explicación de por qué no se ha conseguido activar dicha maquinaria con las diferentes aproximaciones empleadas durante este estudio.

8. Caracterización estructural de nuevos metabolitos detectados mediante OSMAC

Tal como se mencionó en el apartado 6.1., en el cultivo de *S. albus* J1074 en medio MFE, cuyos extractos se realizaron con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico, se localizaron cuatro picos cuyos espectros de absorción aparentemente podrían estar relacionados con compuestos de la familia de las paulomicinas. Para poder afianzar esta posible relación entre los cuatro compuestos y las paulomicinas se cultivó en medio MFE la cepa *S. albus* J1074 y el mutante *S. albus* B29 que presenta una deleción en el clúster de biosíntesis de paulomicinas y, por tanto, no produce los antibióticos correspondientes. En caso de que los nuevos metabolitos detectados pertenezcan a la familia de las paulomicinas no serán detectados en *S. albus* B29 al carecer ésta de los genes necesarios para su síntesis (Figura 65).

El ensayo corroboró la relación entre los nuevos compuestos y las paulomicinas. En el cromatograma correspondiente a la cepa silvestre (WT) podían observarse los picos de los cuatro productos de estudio (**1**-**4**) y las paulomicinas A y B (**5** y **6**), así como los productos de degradación de estas últimas, paulomenoles A y B (**7** y **8**). Sin embargo, en el cromatograma obtenido del cultivo de la cepa mutante (B29) no se detectaba la producción de ninguno de los compuestos mencionados anteriormente (Figura 65).

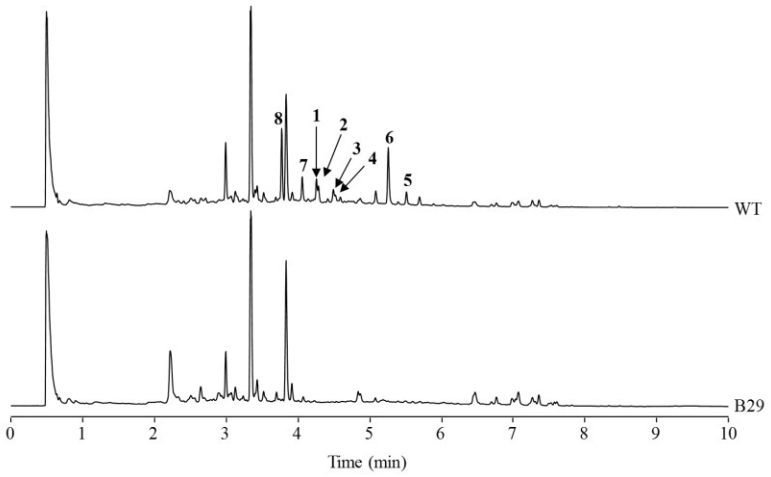


Figura 65. Cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 238 nm de *S. albus* J1074 (WT) y *S. albus* B29 (B29). Los extractos se obtuvieron cultivando ambas cepas 96 horas en medio de cultivo MFE y extrayéndolos con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico. Los picos señalados corresponden a los nuevos derivados UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090 (numerados del **1 al 4** respectivamente), paulomicina A (**5**), paulomicina B (**6**), paulomenol A (**7**) y paulomenol B (**8**).

8.1. Nuevos derivados de paulomicinas

Tras esta comprobación anterior los picos 1-4 fueron purificados para determinar la estructura de los correspondientes compuestos, a los que se asignó el nombre de UO-087 (**1**), UO-088 (**2**), UO-089 (**3**) y UO-090 (**4**) respectivamente.

8.1.1. Purificación de compuestos

La purificación de los picos 1-4 se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente para el aislamiento de paulomicinas (Braña *et al*., 2014) y está descrito en detalle en el apartado 15.4. (Materiales y métodos). Las cantidades resultantes obtenidas de cada uno de los picos purificados fueron 1,2 mg de P1, 1,2 mg de P2, 0,5 mg de P3 y 0,5 mg de P4 y sus respectivos análisis cromatográficos obtenidos por HPLC-MS se muestran en la figura 66.

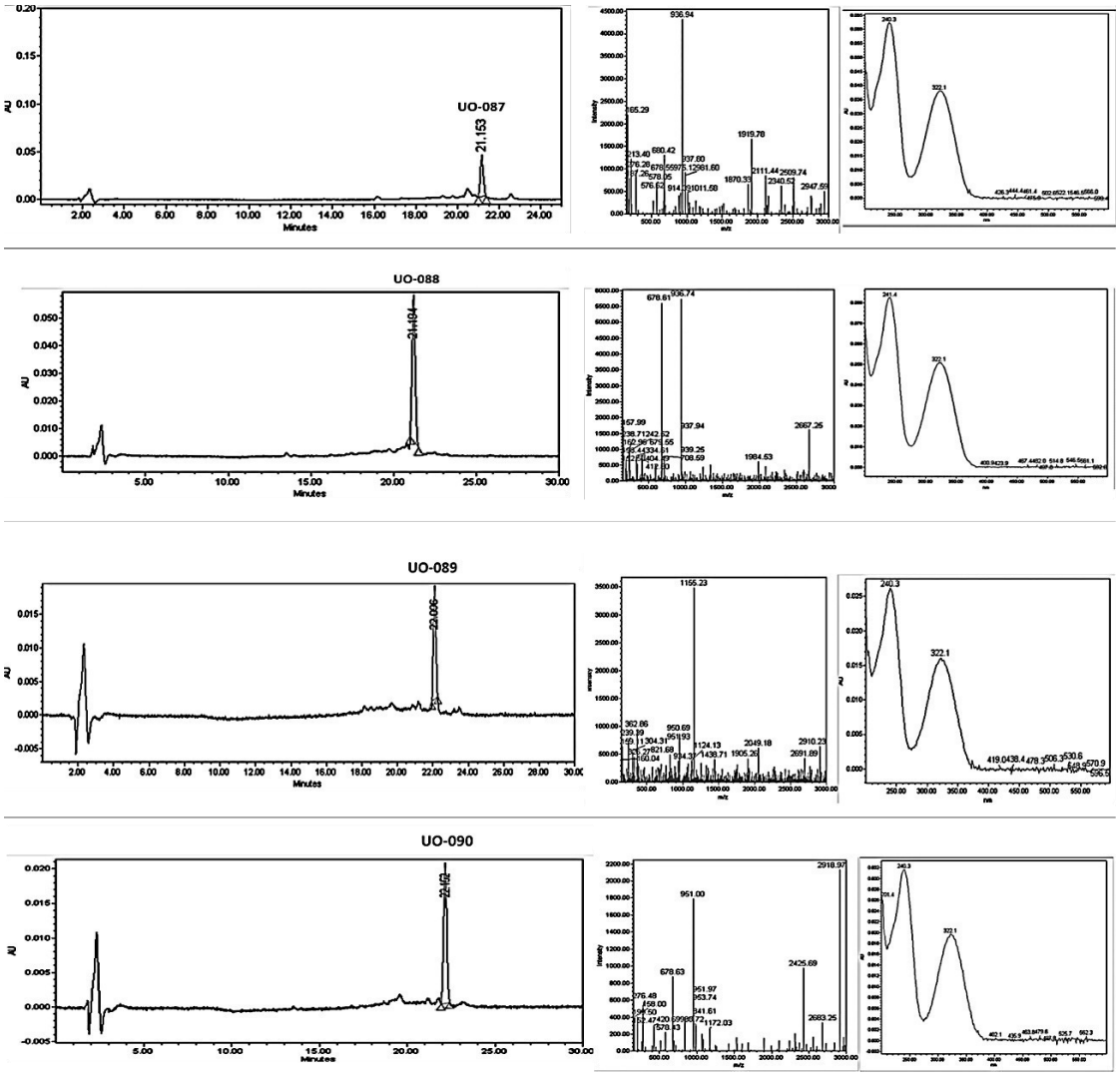


Figura 66. Cromatograma de HPLC-MS a 320 nm obtenido tras la purificación de los compuestos UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090. También se muestra su espectro de absorción así como su espectro de masas.

8.1.2. Elucidación estructural

Tras la elucidación de su estructura se comprobó que los cuatro nuevos metabolitos son análogos a los antibióticos $273_{a2\alpha}$ y $273_{a2\beta}$ (Figura 67) pero conteniendo un grupo tiazol, posiblemente debido a una adición de Michael intramolecular.

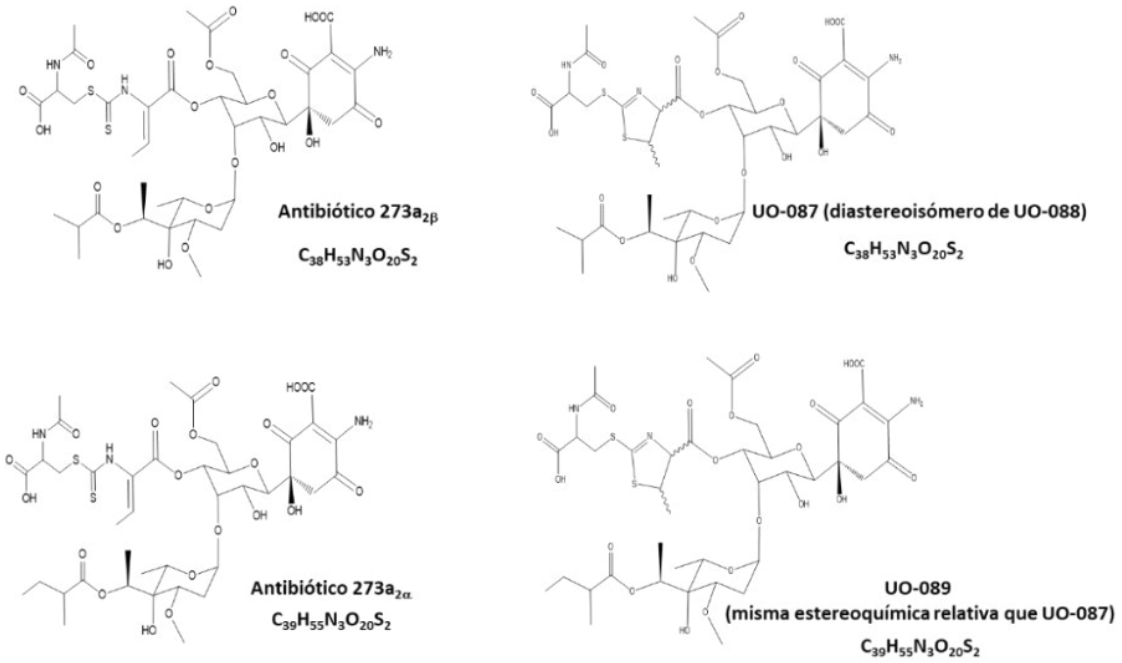


Figura 67. Estructuras de los antibióticos $273_{a2\alpha}$ y $273_{a2\beta}$ y de los nuevos compuestos derivados de paulomicinas UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090.

Pese a que en los cromatogramas obtenidos en nuestro laboratorio, tanto de UPLC (Figura 65) como de HPLC-MS (Figura 66), los cuatro picos purificados aparecían aislados sin presencia de picos contaminantes, los resultados de la elucidación estructural de cada compuesto mediante LC-DAD-HRMS mostraron en cada uno de ellos la presencia de dos compuestos principales con tiempo de retención cercano, pero diferenciable. Tras valorar los resultados obtenidos se determinó que el segundo compuesto de cada muestra se trataba de la forma deshidratada del compuesto anexo (Figuras 68-71).

8.1.2.1. UO-087

Polvo amorfo amarronado; Compuesto 1: HRESIMS *m/z* 936,2739 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{54}N_3O_{20}S_2^+$ = 936,2739); compuesto 1' (producto 1 después de la extracción de una molécula de H_2O): HRESIMS *m/z* 918.2636 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{52}N_3O_{19}S_2^+$ = 918.2631).

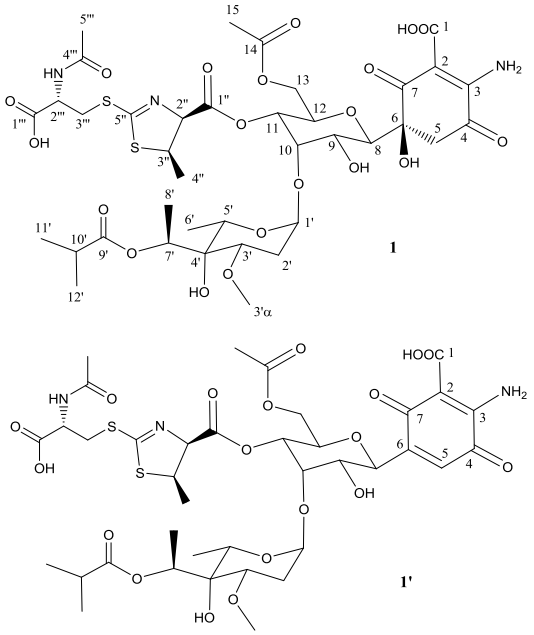


Figura 68. Estructura del compuesto UO-087 (**1**) deducida por ^{1}H- y ^{13}C-NMR y estructura propuesta del producto secundario deshidratado UO-087' (**1'**).

8.1.2.2. UO-088

Polvo amorfo amarronado; compuesto 2: HRESIMS *m/z* 936.2737 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{54}N_3O_{20}S_2^+$ = 936,2739); compuesto 2' (producto 2 después de la extracción de una molécula de H_2O): HRESIMS *m/z* 918.2630 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{52}N_3O_{19}S_2^+$ = 918.2631).

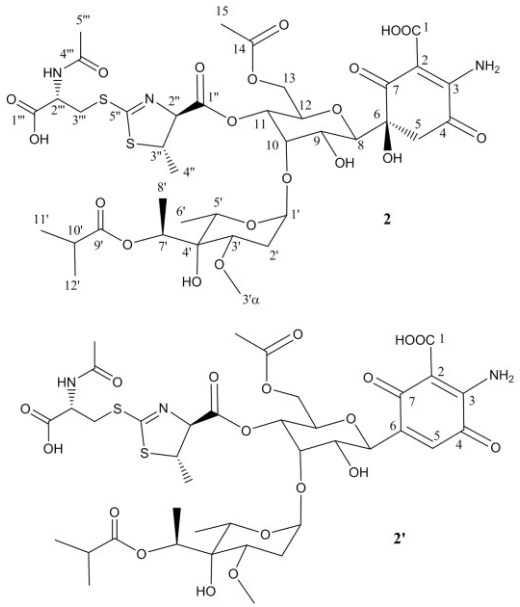


Figura 69. Estructura del compuesto UO-088 (**2**) deducida por ^{1}H- y ^{13}C-NMR y estructura propuesta del producto secundario deshidratado UO-088' (**2'**).

8.1.2.3. UO-089

Polvo amorfo amarronado; compuesto 3: HRESIMS *m/z* 950.2893 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2^+$ = 936.2893); compuesto 3' (producto 3 después de la abstracción de una molécula de H_2O): HRESIMS *m/z* 932.2782 [M+H] + (calculado para $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2^+$ = 932.2787).

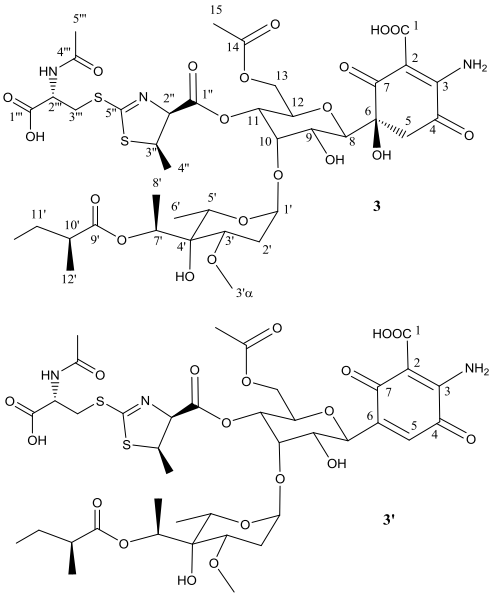


Figura 70. Estructura del compuesto UO-089 (**3**) deducida por ^{1}H- y ^{13}C-NMR y estructura propuesta del producto secundario deshidratado UO-089' (**3'**).

8.1.2.4. UO-090

Polvo amorfo amarronado; compuesto 4: HRESIMS *m/z* 950.2899 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2^+$ = 936.2893); compuesto 4' (producto 4 después de la extracción de una molécula de H_2O): HRESIMS *m/z* 932.2782 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2^+$ = 932.2787).

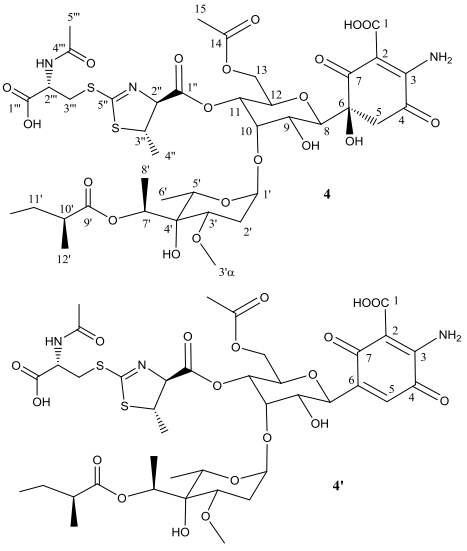


Figura 71. Estructura del compuesto UO-090 (**4**) deducida por ^{1}H- y ^{13}C-NMR y estructura propuesta del producto secundario deshidratado UO-090' (**4'**).

8.1.3. Análisis de actividad biológica

8.1.3.1. Análisis de actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los cuatro derivados de paulomicinas se probó frente a una batería de líneas celulares tumorales humanas: adenocarcinoma de colon (HT29), cáncer de pulmón no microcítico (A549), adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), carcinoma gástrico (AGS), leucemia promielocítica (HL-60), adenocarcinoma pancreático (CAPAN) y carcinoma de ovario (A2780), usando como control para evaluar la citotoxicidad frente a células no malignas la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón NIH/3T3.

Tabla 35. Datos obtenidos del ensayo de actividad citotóxica de los cuatro derivados de paulomicinas frente a diferentes líneas celulares tumorales humanas.

Datos de IC50 medidos a 72 h de incubación con los compuestos (expresados en µM)

	A549	HT29	AGS	A2780	HL60	MDAMB231	CAPAN	NIH3T3
UO-087	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
UO-088	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
UO-089	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
UO-090	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Analizando los resultados obtenidos (Tabla 35) se comprobó que ninguno de los cuatro compuestos presenta actividad antiproliferativa frente a ninguna de las líneas celulares neoplásicas ensayadas ni frente a la línea celular no maligna de fibroblastos embrionarios de ratón NIH/3T3 empleada como control.

8.1.3.2. Análisis de actividad antibiótica

Se realizaron análisis de la actividad antibacteriana de los cuatro derivados de paulomicina y de las paulomicinas A y B mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a una serie de bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae y Micrococcus luteus) y* Gram-negativas (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens y Klebsiella pneumoniae*). También se analizó su actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.

La MIC se realizó utilizando cultivos bacterianos con un OD_{600} inicial de 0.3 y dos diluciones seriadas de cada compuesto, de 200 µg/ml a 3.12 µg/ml y de 150 µg/ml a 2.34 µg/ml. El crecimiento en las placas de microtitulación (Figura 72) se determinó pasadas 24 h de incubación a 37 °C.

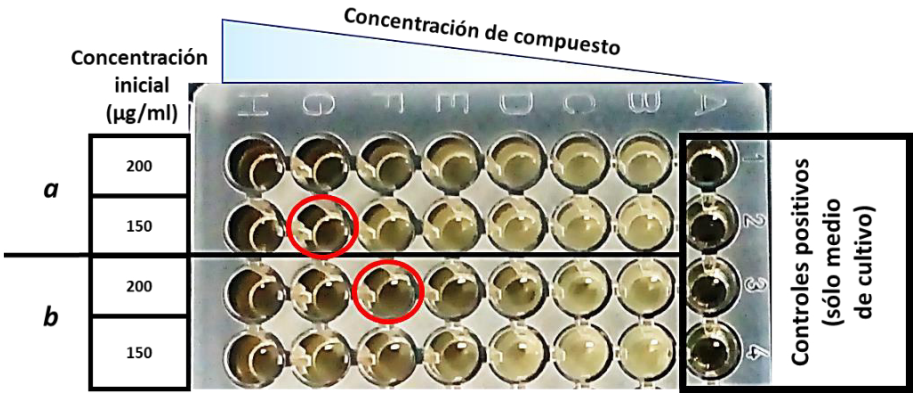


Figura 72. Ensayo de análisis de actividad antibiótica del compuesto UO- 87 frente a las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* **(a)** y *Staphylococcus epidermidis* **(b)**. En el primer pocillo de cada fila se añadió la concentración indicada de cada compuesto, llevándose a cabo en los siguientes pocillos de la misma fila diluciones seriadas 1:1. Seguidamente se añadió la misma cantidad de bacteria a todos los pocillos (salvo en el último de cada fila, que actúa como control) y la placa se incubó a 30 °C durante unas 20 horas. El crecimiento bacteriano se observa como turbidez en el medio de cultivo y un depósito blanco en el fondo de los pocillos. La CMI es la concentración de antibiótico presente en el último pocillo que no muestra crecimiento (marcado con un círculo rojo).

Tras analizar los resultados obtenidos (Tabla 36) de los cuatro derivados y comparándolos con los de las paulomicinas A y B, se determinó que los nuevos análogos poseen una actividad antibiótica menor frente a bacterias Gram-positivas, pero en cambio muestran de manera general una mayor actividad antibiótica frente a Gram-negativas. Al igual que las paulomicinas, los cuatro metabolitos no presentan una actividad antifúngica relevante.

Tabla 36. Valores de MIC obtenidos de los distintos compuestos purificados y de las paulomicinas A y B frente al hongo *C. albicans* y la batería de bacterias propuestas para el ensayo.

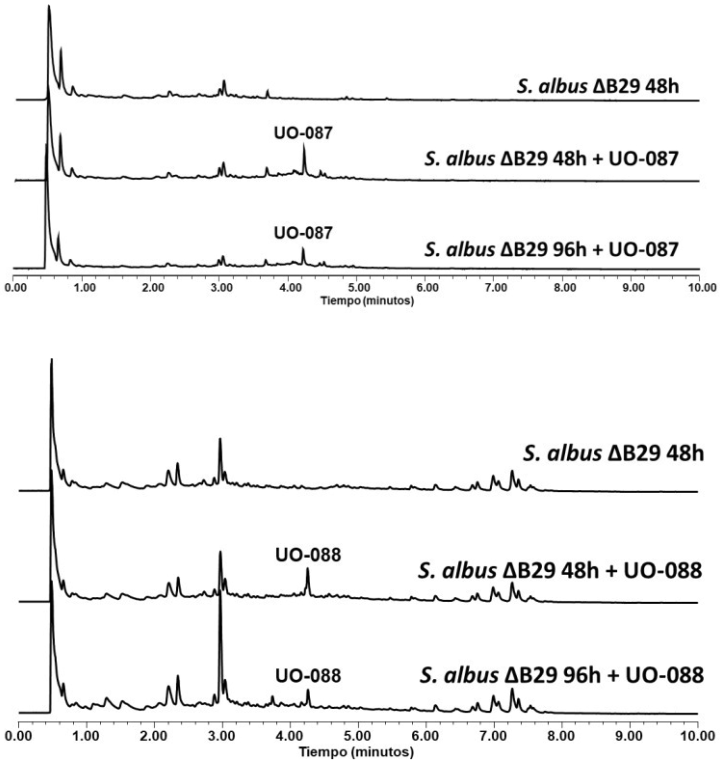
	MIC (µg/mL)					
	UO-087	UO-088	UO-089	UO-090	Paulomicina A	Paulomicina B
Staphylococcus aureus	75	75	37,5	25	<2,34	<2,34
Staphylococcus epidermidis	50	50	18,75	12,5	<2,34	<2,34
Streptococcus agalactiae	150	150	200	>200	>200	>200
Micrococcus luteus	150	200	150	200	>200	150
Escherichia Coli	150	150	75	100	>200	>200
Pseudomonas aeruginosa	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Serratia marcescens	200	200	200	>200	>200	>200
Klebsiella pneumoniae	150	150	100	100	>200	>200
Candida albicans	200	>200	200	>200	>200	>200

8.1.4. Ensayos de estabilidad

En un trabajo previo de nuestro grupo (Olano *et al.,* 2014a) se mostró que los paulomenoles A y B, al contrario de lo especulado hasta entonces, no son intermediarios en la biosíntesis de las paulomicinas A y B, sino que corresponden a productos de degradación de éstas por la pérdida del ácido páulico. Ya que los paulomenoles carecen de actividad antibacteriana mientras que tanto los antibióticos 273a2α y 273a2β y paldimicinas A y B (Argoudelis *et al.,* 1987 a y b; Brumfitt *et al.* 1987) así como los derivados tiazol de los antibióticos 273a2α y 273a2β (compuestos UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090), todos ellos caracterizados por la presencia de una unidad de N-acetil-L-cisteína unida al ácido páulico, muestran actividad antibacteriana, nos hizo plantearnos si la incorporación del grupo N-acetil-L-cisteína podría representar un mecanismo que estabilizase la estructura de las paulomicinas, manteniéndose de este modo la actividad antibiótica.

Para llevar a cabo el ensayo se preparó un preinóculo de esporas de *S. albus* B29 en medio de cultivo TSB durante 24 horas hasta alcanzar una D.O. de aproximadamente 10. Seguidamente, dependiendo de la D.O. alcanzada, se calculó la cantidad de preinóculo necesaria (aproximadamente 1 ml) para inocular matraces de 25 ml con 5 ml de medio de cultivo R5A en cada matraz. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 30 °C y 250 rpm obteniéndose a las 48 horas una muestra de 1 ml de cada cultivo. A continuación, se añadió a cada matraz 150µg/ml de cada compuesto e inmediatamente se tomó 1 ml de muestra que servirá como control. Finalmente se toman muestras a las 72 horas y a las 96 horas.

Todas las muestras de cultivo se extrajeron con acetato de etilo + 1% de ácido fórmico y se analizaron mediante UPLC para poder comparar las muestras obtenidas a diferentes tiempos (Figura 73) y, de esta manera, comprobar si los compuestos añadidos permanecían estables a lo largo del tiempo o, en cambio, sufrían algún tipo de degradación.



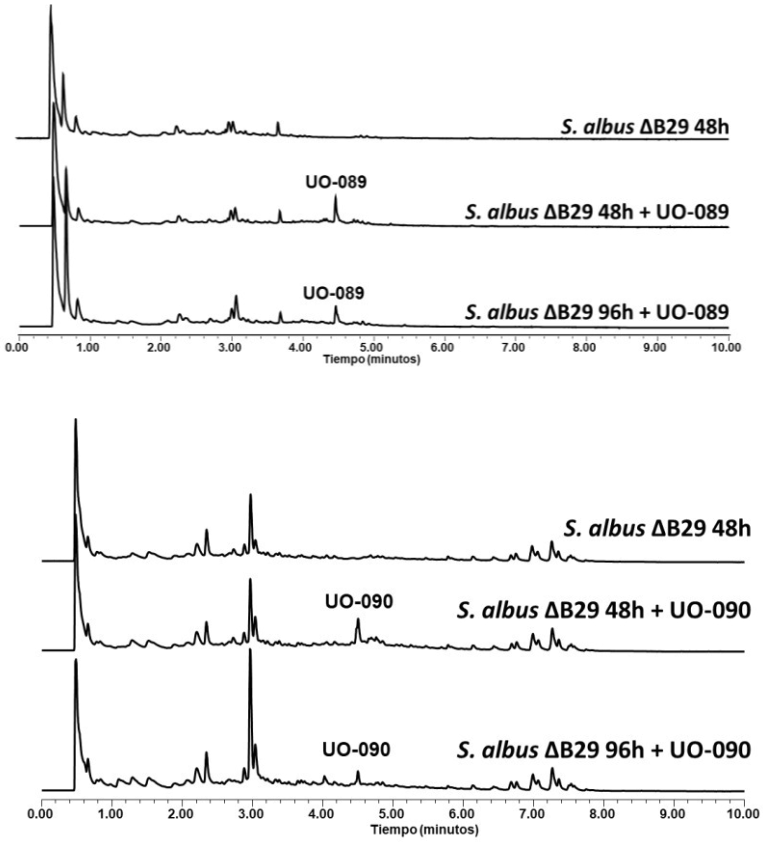


Figura 73. Cromatogramas comparativos de dos cultivos a los que se añadieron dos de los compuestos de estudio (a. UO-087, b. UO-088, c. UO-089 y d. UO-090). Puede observarse que ninguno de los cuatro compuestos sufre conversión en otro compuesto.

Los cuatro nuevos metabolitos muestran una mayor estabilidad en cultivo que las paulomicinas A y B, lo que podría ser debido a la presencia del grupo de N-acetil-L-cisteína unido al carbono del isotiocianato del ácido páulico mediante un enlace tioéster y la consiguiente ciclación intramolecular del ácido páulico para generar un heterociclo de tiazol. Esta modificación, según los resultados obtenidos, dotaría a las paulomicinas de una mayor estabilidad estructural sin la cual se produce la degradación de paulomicina en paulomenoles inactivos. Otro dato importante que se extrae de este experimento es que puede observarse que ninguno de los compuestos ensayados es convertido en los correspondientes paulomenoles, a diferencia de lo que ocurre con las paulomicinas (Olano *et al.* 2014).

Para constatar de manera fehaciente la relación entre los cuatro metabolitos purificados y las paulomicinas se diseñó un ensayo con el que comprobar cómo la modificación sufrida por las paulomicinas A y B en cultivo deriva en la aparición de paulomenoles (Olano *et al.*, 2014) y también en la aparición de los compuestos UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090 (Figura 74). El procedimiento seguido fue el mismo que el del ensayo anterior, pero esta vez añadiendo paulomicina A o paulomicina B al cultivo de *S. albus* B29. Los resultados confirmaron lo esperado ya que tras añadir las paulomicinas purificadas al cultivo a partir de las 24 horas se pudo detectar la aparición de paulomenoles y de los nuevos derivados activos.

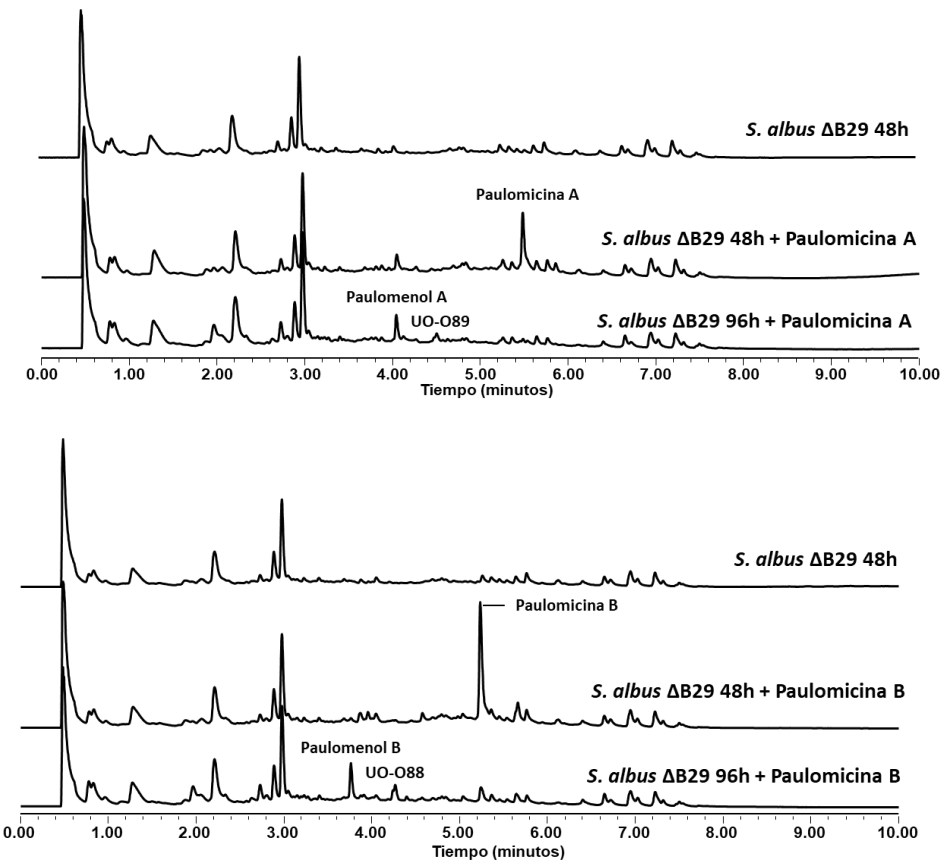


Figura 74. Pruebas de estabilidad de las paulomicinas A y B. En los cromatogramas puede observarse cómo la modificación de paulomicinas deriva en la aparición de paulomenoles y de los compuestos UO-089 y UO-088.

Discusión

Discusión

El rápido desarrollo de los métodos de secuenciación de genomas ha revolucionado casi todos los aspectos de la biología, incluida la investigación de productos naturales. Hay disponibilidad de muchas herramientas que posibilitan la aplicación de la minería genómica computacional de datos genéticos y conectarlos con metabolitos secundarios conocidos. Se ha recorrido un largo camino durante los últimos años desde la identificación y manipulación de los primeros genes productores de metabolitos secundarios hasta la secuenciación del genoma completo de miles de genomas bacterianos y metagenomas para finalmente facilitar el rápido descubrimiento de nuevos productos naturales y determinar su papel en el medio ambiente.

En la actualidad, aplicando las nuevas tecnologías desarrolladas, como la genómica unicelular y la metagenómica, con la ingente cantidad de genomas bacterianos disponible y las colecciones de cultivos que están siendo secuenciadas, se generan una cantidad masiva de datos que requieren un análisis profundo. La mayor colección de agrupaciones génicas extraídas mediante minería genómica es el "Atlas de clústeres de genes biosintéticos", un componente de la plataforma "Genomas Microbianos Integrados" del Joint Genome Institute (JGI IMG-ABC) (Hadjithomas *et al.*, 2015).

A comienzos del nuevo milenio y coincidiendo con la obtención de la secuencia completa del genoma de dos cepas ampliamente estudiadas como *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.,* 2002) y *Streptomyces avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) se descubrió el inexplorado potencial oculto en los genomas bacterianos. Esos estudios revelaron que el genoma de *Streptomyces* spp. contiene un promedio de 30 clústeres de genes de metabolitos secundarios potencialmente bioactivos, de los que en el mejor de los casos sólo unos pocos eran conocidos con anterioridad (Ziemert *et al.*, 2016), y que además en su gran mayoría se encuentran silenciados o se expresan de forma pírrica en condiciones de laboratorio (Weber *et al.*, 2015).

La secuencia genómica de *S. albus* J1074 está disponible desde el año 2008 bajo el número de acceso es **NZ_DS999645.1**. (Broad Institute). Años más tarde, se publicó una revisión de la secuencia, más completa y mejorada con respecto a la anterior, con el número de acceso **CP004370.1** (Zaburannyi *et al.*, 2014). Su análisis permitió descubrir que el genoma de este microorganismo está compuesto por 27 agrupamientos génicos de biosíntesis considerados de metabolismo secundario. Varios de estos agrupamientos han sido activados, como los implicados en la biosíntesis de carotenoides (Myronovskyi *et al.*, 2013) y cinco adicionales implicados en la biosíntesis de un compuesto citotóxico y antifúngico (6-*epi*-alteramida A), un pigmento (indigoidina), dos familias de compuestos antifúngicos (candicidinas y antimicinas) y una familia de compuestos con actividad antibiótica (paulomicinas) (Olano *et al.*, 2014). La ruta de biosíntesis de las paulomicinas realmente no se encuentra silenciada, ya que la cepa silvestre *per se* es capaz de sintetizarlas, aunque con unos niveles de producción escasos, lo que supone una producción de compuestos muy baja y además poco reproducible.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han estudiado, partiendo de análisis bioinformáticos exhaustivos, los agrupamientos génicos de *S. albus* J1074, seleccionándose, de acuerdo con el potencial interés terapéutico de su posible producto final de biosíntesis, cuatro de ellos para analizarlos en profundidad y tratar de identificar los productos naturales sintetizados por las correspondientes rutas de biosíntesis. Se trata de un clúster híbrido PKSI-NRPS (clúster 1) y otros tres de tipo NRPS (clústeres 13, 14 y 21). La selección del híbrido PKSI-NRPS se debió a que tradicionalmente este tipo de compuestos determinan la producción de compuestos bioactivos, como el caso de las 6-*epi*-alteramidas sintetizadas por el clúster 26 de esta misma cepa (Olano *et al.*, 2014). La selección de las agrupaciones NRPSs, 13, 14 y 21, se debió a su potencial producción de compuestos peptídicos de la familia de los lipopéptidos, los cuales generalmente presentan actividad antibiótica y/o antitumoral entre otras (Gu *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014).

Se han aplicado diversas estrategias de ingeniería genética para tratar de determinar el producto de biosíntesis de estos cuatro clústeres de *S. albus* J1074 así como de los dos clústeres homólogos al 1 y 13 identificados en el genoma de *Streptomyces sp.* CS227 (clúster 20 y 16, respectivamente). Se han generado mutantes por reemplazamiento génico donde se inserta el gen *aaa(3)IV* sustituyendo el operón de genes biosintéticos o los distintos genes reguladores presentes en él. También se generaron cepas que expresaran, bajo la acción del promotor constitutivo *ermE*p,* el operón de genes biosintéticos o los genes reguladores. De esta forma se planeaba estudiar de manera individual si la ausencia o la expresión de alguna de estas regiones o genes implicaba un cambio en la pauta de producción del clúster con respecto a la cepa silvestre, lo que indicaría su función. Para ello se han cultivado en paralelo las cepas manipuladas genéticamente y la silvestre para seguidamente analizar comparativamente por cromatografía (UPLC y HPLC-MS) los extractos obtenidos con diferentes solventes orgánicos (acetato de etilo, acetato de etilo + 1% ácido fórmico, butanol, etc.). Para ampliar más el estudio, se siguió el método OSMAC (*One Strain Many Compounds*) que implica la búsqueda de nuevos productos naturales introduciendo variaciones en las condiciones de cultivo, como medios de cultivo, temperatura, velocidad de agitación, etc., con el fin de identificar las condiciones óptimas en las que producir los PNs determinados por cada una de las diferentes rutas biosintéticas en estudio.

Debido a la escasa producción observada de manera generalizada en los experimentos de identificación de los compuestos determinados por cada agrupamiento génico estudiado, otro de los objetivos del trabajo consistió en medir los niveles de expresión de cada clúster, tanto de los operones de genes biosintéticos como de los genes reguladores presentes en cada caso. Para ello se diseñó un plásmido testigo, pOJ260ind, con el que determinar el grado de expresión de cada gen cuantificando el nivel de expresión de los promotores correspondientes. Este vector porta como testigo el gen SSHG_00313 de *S. albus* J1074, que codifica una NRPS encargada de la síntesis del pigmento azul indigoidina.

Se probó la viabilidad del sistema tanto en medio de cultivo líquido como sólido, tomando como modelo control *S. albus* 313, que expresa SSHG_00313 bajo el control del promotor constitutivo *ermE*p.* En estos ensayos pudo apreciarse que la composición del medio puede acelerar el proceso de reducción de la indigoidina, tornándose ésta hacia un color marrón. Del mismo modo se comprobó cómo el comportamiento del pigmento varía en función del pH

del medio, afectando tanto a su coloración como a su solubilidad (Elazari-Volcani, 1939) en caso de que el pH sea excesivamente ácido, torna a un color marrón, y cuando se trata de un pH básico adquiere un tono amarillento.

El siguiente paso consistió en clonar las regiones promotoras a estudiar en el vector pOJ260ind, aguas arriba del gen testigo, de tal forma que una vez introducido en *S. albus* SSHG_00313 se inserte en la posición adecuada del cromosoma. Una vez obtenidas las nuevas cepas, éstas fueron cultivadas en medio R5A, medio de cultivo habitual empleado en ensayos rutinarios de producción, monitorizando la producción de indigoidina mediante espectrofotometría.

De los resultados obtenidos se determinó en primer lugar que el sistema generado permite asociar los valores de producción de indigoidina al nivel relativo de expresión de cada promotor estudiado. En segundo lugar, después de estandarizar el método de baremación de los grados de expresión obtenidos, se observó que el control positivo empleado muestra unos valores de DO relativamente altos como cabía esperar, llegando a alcanzar valores de 6 unidades de DO, de manera que el promotor *ermE*p* expresa de una manera fuerte a SSHG_00313. De manera general, se aprecia que el grado de expresión mostrado por los diferentes promotores estudiados es bajo, no alcanzando apenas valores de 1 unidad de DO. Estos grados bajos de expresión no resultan lo suficientemente fuertes como para permitir la identificación efectiva de compuestos. No obstante, en algunas de las muestras se obtienen valores mayores que los del control, lo que indica que los promotores implicados en esos casos expresan el gen correspondiente de una forma más fuerte que *ermE*p* en las condiciones de cultivo ensayadas.

Como prueba de concepto de que mediante la cuantificación de la producción de indigoidina se podrían extrapolar los datos obtenidos a la producción de los metabolitos asociados a la región génica en estudio, se clonó el gen testigo aguas abajo del promotor del operón de genes biosintéticos de paulomicinas en dos cepas de *S. albus* J1074 disponibles en nuestro grupo. Una de las cepas no produce paulomicinas y otra produce los antibióticos en suficiente cantidad para su detección cromatográfica y posterior purificación. Los resultados de la cuantificación espectrofotométrica mostraban claramente cómo la cepa no productora no sintetizaba pigmento azul, mientras que la superproductora generaba en abundancia este pigmento que teñía de color azul el cultivo presentando valores de 9 unidades de DO.

En cuanto a los resultados referentes al clúster 1 se comprobó que tanto el promotor del operón de genes biosintéticos como los de dos de los reguladores de este clúster (1R1ind y 1R2ind) no son muy activos, alcanzando valores menores a 1 unidad de DO. Sin embargo, el promotor del gen regulador restante, 1R3ind, adquiere un valor de 5, indicando que se está expresando de modo similar a *ermE*p*. Las características de este último gen, un regulador transcripcional del tipo LysR/GntR, dan pie a pensar que codifica un represor que inhibe la síntesis de los genes biosintéticos del clúster, factor que podría ser el motivo de que la ruta de biosíntesis estuviese silenciada.

En el clúster productor de surugamidas, clúster 13, se aprecia que el promotor de los genes biosintéticos (C13ind) alcanza valores en torno a 5 unidades de DO, un valor comparable al de *ermE*p,* y a pesar de ello no se traduce en una alta producción de metabolitos. En cuanto a los promotores de los genes reguladores estudiados, 6R1ind apena alcanza valores de 0,25

unidades de DO, lo que indica que se expresa de forma pírrica. Los otros dos, 6R2ind y 6R3ind, presentan un grado de expresión de alrededor de 1,5 unidades de DO, un valor mucho menor que C13ind lo cual teniendo en cuenta que se clasificaron inicialmente como represores de la síntesis de surugamidas indicaría que su bajo nivel de expresión es el factor que determina la producción, y consiguiente detección, de estos compuestos.

El análisis de los datos obtenidos para el clúster 14 muestra que la expresión del promotor 14Rind del gen regulador SSHG_02804 (regulador transcripcional PadR) es casi nula, con un valor cercano a 0,3 unidades de DO y, en principio, su acción no afectaría a la biosíntesis del clúster. Ante la eventualidad de que se trate de un activador se diseñó una cepa que tuviera el gen expresado bajo el control del promotor *ermE*p*. Sin embargo, en los cromatogramas resultantes no se observaron picos diferenciales que indicaran un incremento en la producción de algún metabolito específico.

Los resultados de los análisis de expresión del clúster 21 demuestran que el promotor del operón de genes biosintéticos (C21ind), así como el de SSHG_04948 (regulador transcripcional de dos componentes, 21R3ind) no muestran una expresión relevante presentando valores de 0,5 y 0,8 unidades de DO respectivamente. Por otro lado, los promotores de SSHG_04927 (regulador transcripcional del tipo TetR, 21R1ind) y SSHG_04931 (regulador transcripcional, 21R2ind) presentan valores de expresión más significativos comparados con los anteriores, de 1,1 para 21R1ind y de 3,3 para 21R2ind. Esto podría indicar que las proteínas codificadas por estos dos genes poseen una actividad inhibitoria y que su expresión estaría reprimiendo a la de los genes biosintéticos del clúster. Pese a que aún quedaría por analizar el nivel de expresión de los promotores de los tres genes reguladores que fueron hallados más tarde mediante análisis bioinformáticos (SSHG_04940, SSHG_04952 y SSHG_04960) se han diseñado cebadores para poder obtener nuevas cepas mutantes que tengan reemplazados los seis genes reguladores, bien individualmente o de forma combinada, con el fin de tratar de comprobar si alguno o algunos de ellos de forma individual o actuando conjuntamente, impiden la activación de la maquinaria biosintética de este clúster.

Un detalle en el que se reparó al observar el crecimiento de las cepas portando la construcción testigo *in situ* era que el pigmento se secretaba al medio de cultivo sin retenerse en el interior celular, siendo además perfectamente soluble en los diferentes medios de cultivo probados, no como en los casos reportados en trabajos previos (Müller *et al*., 2012; Knirschova *et al*., 2015; Brown *et al.*, 2017). El denominador común en esos trabajos es que, tanto en los cultivos en medio sólido como en medio líquido, se debía extraer el pigmento del medio intracelular y seguidamente tratar de solubilizarlo con diferentes solventes, apareciendo en todos los casos problemas de precipitación en diferente grado (Brown *et al.*, 2017). Este hecho llevó a pensar que debería haber diferencias fundamentales entre el clúster de biosíntesis de indigoidina de *S. albus* J1074 y el presente en otros productores que determinara la secreción y capacidad de solubilización del pigmento. Al comparar la secuencia de los diferentes clústeres se observó que entre ellas había ciertas diferencias, pero estando la mayoría muy conservados. La particularidad que presenta el clúster de *S. albus* J1074 es que posee una permeasa ABC (SSHG_00315) que ninguna de las otras cepas contiene. Este hecho nos llevó a plantear si el transportador estaría encargado de expulsar el pigmento de la célula, ya que en el resto de especies productoras la indigoidina no es secretada al medio de cultivo de manera natural y para

monitorizar su producción se emplean métodos de ruptura celular además de solubilizar el pigmento usando diferentes solventes (Knirschova *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Para aclarar esta duda se diseñó un sistema testigo derivado de pOJ260ind que portara SSHG_00315 además de SSHG_00313. De este modo se podrá verificar si la secreción de indigoidina varía en función de la ausencia o presencia del transportador. Actualmente este trabajo está llevándose a término en colaboración con la Dra. Ana Ceniceros.

Los ensayos de activación de los clústeres mencionados anteriormente arrojaron resultados que mostraron claramente una serie de incidencias comunes a todos los experimentos llevados a cabo. En primer lugar, se ha detectado que la manipulación genética aplicada en diferentes regiones del genoma de *S. albus* J1074 suponían la alteración en el patrón de producción de metabolitos específicos cuya síntesis no está relacionada con la ruta biosintética para la que están programados los diferentes agrupamientos génicos biosintéticos manipulados. Compuestos como, por ejemplo, las antimicinas o las candicidinas veían aumentada su producción en las nuevas cepas modificadas en distintos genes o regiones génicas, de forma que su presencia aumentaba en grandes cantidades. Este hecho supuso una enorme dificultad a la hora de purificar los compuestos potencialmente interesantes detectados en los cromatogramas comparativos debido a que en muchos casos estos metabolitos coeluían en los mismos picos que los compuestos de interés resultando imposible su separación con los métodos de HPLC preparativo empleados, pese a probar múltiples variaciones de solventes, columnas de cromatografía, etc.

En el caso del clúster 1 de *S. albus,* tras analizar los datos de derreplicación, se procedió a la purificación de compuestos sintetizados por la cepa silvestre que no se detectaron en el mutante *S. albus* Δ1. Uno de ellos, P1, no se consiguió purificar con un grado de pureza aceptable para elucidar su estructura molecular, debido a la presencia de metabolitos coeluyentes. Para el otro pico purificado, P4 (UO-063), los resultados de su elucidación estructural indicaron que contenía dos compuestos, cuyas estructuras no pueden asociarse a las actividades enzimáticas codificadas por genes del clúster ya que corresponden a versiones truncadas de candicidinas. La presencia de este tipo de compuestos de la familia de los ácidos *p*-aminoacetofenónicos ya había sido descrita en un trabajo previo sobre *S. albus* (González *et al.,* 2016a) en el que se realizaron manipulaciones genéticas en el clúster de las paulomicinas que dieron lugar a la síntesis de ácido (*2E*)-17-(4'-aminofenil)-3,11,15-trihidroxi-10,12,14-trimetil-17-oxo-heptadeca-4,6,8-trienoico. Sobre su presencia podría concluirse que deriva de la acumulación de corismato y su conversión en ácido *p*-aminobenzoico (PABA), precursor directo de candicidinas.

En los ensayos llevados a cabo con el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227 se obtuvieron una serie de picos diferenciales cuyos espectros de absorción eran iguales entre sí. Las derreplicaciones efectuadas no resultaron concluyentes debido a que los tres picos de interés se encontraban en una zona sin absorbancia UV, por lo que no fue posible determinar que los compuestos diferenciales observados en la derreplicación correspondieran con P1, P2 y P3. Para confirmar que los tres picos guardan relación con el clúster se procedió a purificar cada uno de ellos para, en futuras investigaciones, tratar de elucidar de una manera fehaciente su estructura molecular.

El trabajo de estudio de la ruta de biosíntesis determinada por los clústeres 13 de *S. albus* J1074 y 16 de *Streptomyces sp.* CS227 se detuvo, pese a haberse localizado el producto generado, debido a la publicación de un artículo en el que se muestra la caracterización del correspondiente clúster en *S. albus* J1074 y la identificación de su producto final, que resultó ser una familia de compuestos denominados surugamidas (Xu *et al.,* 2017). La localización de las surugamidas como producto final de biosíntesis de este clúster resultó complicada porque las predicciones bioinformáticas no identificaban el clúster homólogo que había sido publicado meses antes (Ninomiya *et al.,* 2016) al no haber sido aún incluida su secuencia en la aplicación MIBIG (Medema *et al.,* 2015). Por otro lado, los cuatro genes biosintéticos que codifican NRPs en este clúster no actúan conjuntamente en la síntesis de una única familia de metabolitos, sino que se asocian dos a dos para producir distintos tipos de surugamidas. Las surugamidas A–E son producidas por las NRPSs SurA y SurD, mientras que la surugamida F es sintetizada por las NRPSs SurB y SurC. Es por ello que, pese a que las NRPSs codificadas por el clúster posean un total de 18 módulos, los metabolitos sintetizados estén formados por una cantidad menor de aminoácidos y posean un tamaño menor al esperado de acuerdo con las predicciones bioinformáticas manejadas.

Los ensayos relacionados con el clúster 14 de *S. albus* J1074 mostraron tres picos (P1, P2 y P3) presentes en la cepa silvestre que no se producen en el mutante *S. albus* Δ14. La elucidación de P1 (UO-132) mostró que no se consiguió un grado de pureza suficiente para obtener resultados fiables. P2 no pudo purificarse al no resultar posible localizarlo en los cromatogramas del HPLC preparativo utilizado. Tanto P1 (UO-132), como P2 no se encuentra en el DPN de procariotas. Por su parte, P3 (UO-133) corresponde con un butenolido descrito para estreptomicetos marinos, tratándose de una mezcla de diasteréomeros en *ratio* casi equimolar. De acuerdo con su composición química esta molécula está relacionada con las lactonas denominadas avenolidos cuya biosíntesis fue descrita por primera vez en *S. avermitilis* (Kitani *et al.,* 2011) y más recientemente en *S. albus* J1074 (Ahmed *et al.*, 2017; Nguyen *et al.,* 2018). Se ha demostrado que estos avenolidos (hormonas microbianas que actúan como moléculas señal) poseen una importante función reguladora en el desarrollo del metabolismo secundario en estreptomicetos. Por ejemplo, en *S. albus* J1074 su presencia está íntimamente relacionada con la producción de metabolitos como indigoidina, antimicinas, candicidinas, 6-*epi*-alteramida y paulomicinas (Ahmed *et al.,* 2017). También en *S. albus* J1074 se han descrito butenólidos que actúan como moléculas señal en la expresión de la síntesis de avermictinas en *S. avermitilis* (Nguyen *et al.,* 2018) indicando una relación interespecífica en *Streptomyces* spp., que da una idea de las complejas interacciones que se producen entre ellos.

La labor realizada con el clúster 21 de *S. albus* J1074 generándose diferentes cepas modificadas genéticamente no arrojó ningún resultado positivo en cuanto a aparición de nuevos compuestos, al no haberse logrado la activación de su maquinaria biosintética con ninguna de las estrategias empleadas a tal efecto.

A la vista de los resultados obtenidos para la activación de los agrupamientos génicos estudiados en *S. albus* J1074, exceptuando el clúster para el que pudo asociarse a la producción de surugamidas, barajamos la posibilidad de que algunas de estas agrupaciones puedan no ser funcionales y que ése sea el motivo por el que no haya resultado posible determinar su producto final. Esta hipótesis se sustenta en el origen de *S. albus* J1074, cepa que se obtuvo a partir de *S.*

albus G por medio de un tratamiento de mutagénesis, lo que podría haber supuesto en el mutante seleccionado no sólo inactivar el sistema de restricción-modificación SalI, sino también introducir múltiples mutaciones aleatorias adicionales en su genoma que puedan afectar a la funcionalidad de regiones génicas adicionales. El genoma de *S. albus* G no ha sido secuenciado por lo cual no se ha podido realizar un análisis comparativo entre ambos microorganismos.

Para los clústeres 1, 14 y 21 de *S. albus* y el clúster 20 de *Streptomyces sp.* CS227 se diseñaron cebadores (Materiales y métodos, apartado 13.1.1.) para obtener nuevas cepas mutantes en las que los genes reguladores de todos esos clústeres fueran inactivados mediante reemplazamiento por el gen de resistencia a apramicina y así comprobar en futuros ensayos si cada una de las potenciales proteínas reguladoras codificadas actúan como activadores o represores de la expresión del clúster.

Durante todo el trabajo desarrollado se ha venido aplicando el denominado método OSMAC para realizar aproximaciones metabólicas para la activación de clústeres, que consiste en introducir variaciones en las diferentes condiciones del cultivo como temperatura de crecimiento, medio de cultivo, velocidad de agitación, etc. y estudiar si alguna de esas alteraciones o diferentes combinaciones entre ellas suponen un cambio en la pauta de producción habitual de metabolitos de una cepa bacteriana.

Otra aproximación metabólica utilizada para la activación de clústeres fue la de suplementar los medios de cultivo R5A y MM con elicitores químicos que podrían actuar como señales que provocaran alteraciones metabólicas en las distintas cepas obtenidas en este trabajo. Los elicitores empleados fueron seleccionados al haber sido previamente descritos como eficientes para este fin en otros ensayos publicados. Tras analizar los resultados no se obtuvieron picos nuevos diferenciales ni se observó un aumento significativo con respecto al patrón de producción observado en los medios no suplementados. Por tanto, los elicitores ensayados o las concentraciones empleadas no ejercieron un efecto positivo sobre la expresión de los agrupamientos génicos en estudio. Es más, alguno de los elicitores a una determinada concentración produjeron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y por ende sobre la producción de alguna familia de compuestos. Valga como ejemplo la utilización de etanol al 1% que indujo una clara inhibición de la biosíntesis de antimicinas y candicidinas.

A pesar de que todas las aproximaciones empleadas en el estudio de los cuatro clústeres de *S. albus* seleccionados no condujeron a resultados positivos en cuanto a identificar los compuestos cuya biosíntesis determinan, el método OSMAC sí proporcionó resultados positivos en forma de cuatro nuevos derivados de paulomicinas, denominados UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090, cuya característica principal es la presencia de un residuo N-acetil-L-cisteína unido al ácido páulico y ciclado formando un heterociclo tiazol.

Se estudió el posible papel de la N-acetil-L-cisteína en las estructuras de los cuatro nuevos derivados y se observó que se había descrito su presencia previamente como elemento estructural de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos, no solo en el caso de antibióticos derivados de paulomicina A y B como 273a2$_\alpha$, 273a2$_\beta$, y paldimicinas A y B (Argoudelis *et al.*, 1987a; Argoudelis *et al.*, 1987b), sino también en otros compuestos con diferentes orígenes biosintéticos tales como lactacistina (Camery *et al.*, 1997), antibiótico fenazina SB 212305 (Gilpin *et al.*, 1995), seongomicina (Hooper *et al.*, 1998), naftomicinas I y J

(Omura *et al.*, 1991), cinabaramidas F y G (Stadler *et al.*, 2007), aducto de piceamicina N-acetil-L-cisteína (Schulz *et al.*, 2009), coelimicina P1 (Gómez-Escribano *et al.*, 2012), homoseongomcina (Woo *et al.*, 2013), cislabdano (Ikeda *et al.*, 2016) y argimicinas PI y PII (Ye *et al.*, 2017). En algunos de estos ejemplos, como SB 212305 y piceamicina, la presencia de N-acetil-L-cisteína se ha asociado con una pérdida de actividad biológica, antibiótica (en el caso del SB 212305) y antibiótica y citotóxica (en el caso del aducto de piceamicina N-acetil-L-cisteína). Sin embargo, su presencia no tiene efecto sobre la actividad citotóxica de lactacistina y cinnabaramidas F y G, o sobre la potencia de la actividad de imipenem contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en el caso de cislabdan (Fukumoto *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la incorporación del grupo N-acetil-L-cisteína durante la biosíntesis de cislabdano se produce mediante la excreción de un intermedio de epóxido de tipo labdano usando una detoxificación xenobiótica mediada por micotiol MSH. Se ha propuesto un mecanismo similar para la biosíntesis de seongomicina, naftomicina J, lactacistina y homoseongomicina.

Dados estos antecedentes, se estudió la actividad biológica de los nuevos derivados de paulomicinas para comprobar si la presencia de la N-acetil-L-cisteína implicaba cambios bien en la actividad antiproliferativa o bien en la antibiótica con respecto a las paulomicinas. Los resultados mostraron que los nuevos análogos poseen una actividad antibiótica menor que las paulomicinas frente a bacterias Gram-positivas, si bien de manera general muestran una mayor actividad antibiótica frente a Gram-negativas. En cuanto a su actividad antifúngica, al igual que en las paulomicinas, no se percibe una actividad reseñable. Asimismo, se realizaron ensayos para medir la actividad citotóxica de estos nuevos compuestos ya que, pese a que las paulomicinas no presentan actividad antiproliferativa, recientemente se ha identificado una nueva paulomicina obtenida a partir de cultivos de *Micromonospora matsumotoense* M-412, paulomicina G, que sí presenta actividad citotóxica frente a algunas líneas celulares tumorales humanas (Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2017). Los resultados del ensayo mostraron que ninguno de los cuatro compuestos presenta actividad citotóxica frente a ninguna de las líneas celulares neoplásicas ensayadas, tampoco frente a la línea NIH/3T3 (células no malignas de fibroblastos embrionarios de ratón) empleada como control.

En derivados de paulomicinas A y B como los antibióticos $273a_{2\alpha}$ y $273a_{2\beta}$, las paldimicinas A y B (Argoudelis *et al.,* 1987 a y b; Brumfitt *et al.* 1987) y los derivados de tiazol de antibióticos $273a_{2\alpha}$ y $273a_{2\beta}$ (UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090) la incorporación del grupo N-acetil-L-cisteína a través de un enlace tioéster, y la subsecuente ciclación intramolecular en los cuatro nuevos compuestos identificados, parece un mecanismo de estabilización que conduce a estructuras más estables en cultivo y que, por lo tanto, retienen actividad antibiótica en contraste con la inestabilidad de las paulomicinas que de no sufrir esta modificación se degradan para dar lugar a paulomenoles inactivos (Figura 75).

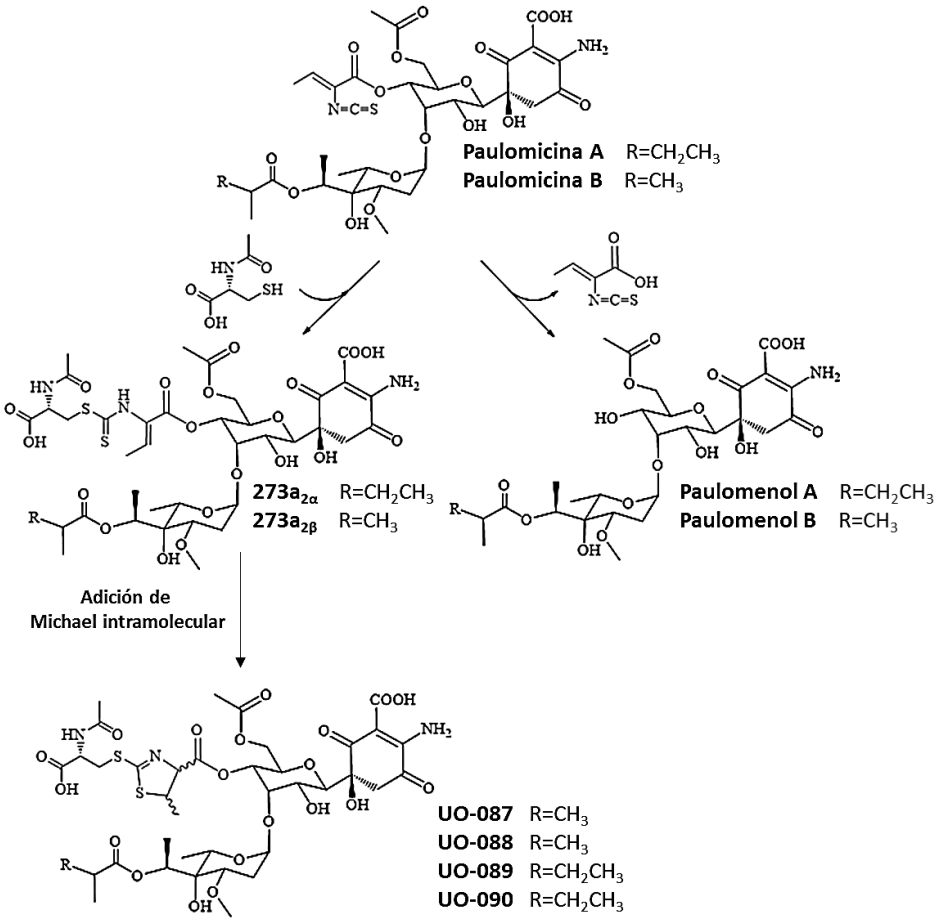


Figura 75. Ruta propuesta para el destino de las paulomicinas en condiciones de cultivo que llevan a su degradación en paulomenoles o su conversión en antibióticos 273a2 y derivados de tiazol UO-087, UO-088, UO-089 y UO-090 en *S. albus* J1074.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El genoma de *Streptomyces albus* J1074 está compuesto por 27 agrupamientos génicos de biosíntesis considerados de metabolismo secundario, de los cuales se han seleccionado cuatro de acuerdo con el potencial interés terapéutico de su posible producto final de biosíntesis. La manipulación genética de cada uno de ellos ha supuesto la alteración del patrón de producción de metabolitos no relacionados con el agrupamiento en estudio, impidiendo en la mayoría de los casos la identificación de su producto final real.

2. Únicamente en el caso del clúster 13 se ha podido identificar el producto de la ruta biosíntética como una familia de compuestos peptídicos denominados surugamidas.

3. Cabe la posibilidad de que algunas de las agrupaciones estudiadas no sean funcionales. Esta posibilidad se basa en que *S. albus* J1074 se obtuvo a partir de *S. albus* G por medio de un tratamiento de mutagénesis, lo que podría haber supuesto en el mutante seleccionado tanto inactivar el sistema de restricción-modificación SalI así como introducir múltiples mutaciones aleatorias adicionales en su genoma que puedan alterar la funcionalidad de regiones génicas no esenciales.

4. El sistema testigo basado en el gen estructural responsable de la síntesis de indigoidina ha sido validado en cultivos en medios líquido y sólido demostrando que es de utilidad para valorar el nivel de expresión relativo de promotores *in vivo*.

5. Los datos de producción de indigoidina asociados a diferentes promotores en un cluster, junto al análisis bioinformático de los reguladores específicos de ruta permite diseñar aproximaciones más eficientes para la activación de agrupamientos génicos silenciosos.

6. Existe la posibilidad de mejorar el sistema testigo utilizando como elemento adicional el gen SSHG_00315 que codifica un transportador ABC. Esta mejora permitiría utilizar de forma eficiente este sistema en otros actinomicetos.

7. El método OSMAC ha resultado el más efectivo de los utilizados, conduciendo a la identificación de cuatro nuevos derivados de paulomicinas cuya característica principal es la presencia de un residuo N-acetil-L-cisteína unido al ácido páulico a través de un enlace tioéster y posteriormente ciclado formando un heterociclo tiazol.

8. La incorporación del grupo N-acetil-L-cisteína y la subsecuente ciclación intramolecular parece actuar como un mecanismo de estabilización que conduce a estructuras más estables en cultivo y que, por lo tanto, retienen actividad antibiótica en contraste con la inestabilidad de las paulomicinas que de no sufrir esta modificación se degradan para dar lugar a paulomenoles inactivos.

Referencias

REFERENCIAS

Ahmed, Y., Rebets, Y., Tokovenko, B., Brötz, E., and Luzhetskyy, A. (2017). Identification of butenolide regulatory system controlling secondary metabolism in *Streptomyces albus* J1074. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11.

Aigle, B., Lautru, S., Spiteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P. and Pernodet, J.L. (2013). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 41**:** 251-263.

Altschul, S.F., Gish, W., Millar, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.

Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Prieto-Domínguez, A., Martínez-Burgo, Y. and Liras, P. (2014). Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* ΔccaR:: Tsr: Effects of the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator CcaR on global regulation. *Microbial Biotechnology*, *7*, 221-231.

Amano, S., Morota, T., Kano, Y.K., Narita, H., Hashidzume, T., Yamamoto, S., Mizutani, K., Sakuda, S., Furihata, K., Takano-Shiratori, H., Takano, H., Beppu, T. and Ueda, K. (2010). Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Journal of Antibiotics*, 63, 486-491.

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. and White O. (2008). Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS* 12, 137-141.

Arakawa, K. (2018). Manipulation of metabolic pathways controlled by signaling molecules, inducers of antibiotic production, for genome mining in *Streptomyces spp. Antonie van Leeuwenhoek*, *Journal of Microbiology 111*(5), 743–751.

Argoudelis A.D., Baczynskyj L., Buege J.A., Marshall V.P., Mizsak S.A. and Wiley P.F. (1987a). Paulomycin-related antibiotics: paldimycins and antibiotics 273a2. Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, *40*, 408–418.

Argoudelis, A.D., Baczynskyj, L., Mizsak, S.A., Shilliday, F.B., Spinelli, P.A. and Dezwaan, J. (1987b). Paldimycins A and B and antibiotics 273a2$_\alpha$ and 273a2$_\beta$. Synthesis and characterization. *The Journal of Antibiotics, 40*, 419–436.

Arora, N., Kumar, S., Satti, N. K., Ali, A., Gupta, P. and Katoch, M. (2018). A strain of *Streptomyces sp.* isolated from rhizospheric soil of *Crataegus oxycantha* producing nalidixic acid, a synthetic antibiotic. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(6), 1393–1400.

Arrand, J.R., *Myers,* P.A., Roberts, R.J. (1978) A new restriction endonuclease from *Streptomyces albus* G. *Journal* of *Molecular Biology*, 118, 127-135.

Bachmann, B.O. and Ravel, J. *In silico* prediction of microbial secondary metabolic pathways from DNA Sequence Data. 2009. *Methods in Enzymology,* 458, 181-217.

Baker, D.D., Chu, M., Oza, U. and Rajgarhia, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, 24, 1225-1244.

Baltz, R.H. and Matsushima, P. (1981) Protoplast fusion in *Streptomyces* conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *Journal of general microbiology,* 127, 137-146

Baltz, R.H. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News*, 55, 186-196.

Baltz, R.H. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe,* 2, 125-131.

Baltz, R.H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, *8*, 557-563.

Baltz, R.H. (2010). *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 759-772.

Baltz, R.H. (2011). Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 38, 1747-1760.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez L., Gavaut-Vaillant, N., Jacquard C., MeierKolthoff, J., Klenk, H.P., Clément, C., Oudouch, Y. and van Wezel, GP. (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 80, 1-43.

Becerril, A., Álvarez, S., Braña, A.F., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R.I., Salas, J.A. and Méndez, C. (2018). Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *Plos One*, *13*(5), e0198145.

Behie, S.W., Bonet, B., Zacharia, V.M., McClung, D.J. and Traxler, M.F. (2017). Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products *in situ*. *Frontiers in Microbiology*, *7* (JAN), 1-11.

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. and Hopwood D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature,* 417, 141-147.

Bergey´s Manual of determinative bacteriology (IX edición) (2012). J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath and J.T. Stanley (editores). Lippincott Williams and Wilkings, USA

Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N. and Schoner, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene,* 116, 43-49.

Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M. G., Lu, X., Schwalen, C. J., Kautsar, S. A., Suarez Duran H.G., de Los Santos E.L.C., Kim H.U., Nave M., Dickschat J.S., Mitchell D.A., Shelest E., Breitling R., Takano E., Lee S.Y., Weber T. and Medema M. H. (2017). AntiSMASH 4.0 - improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W36-W41.

Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, *3*, 619–627.

Botas, A., Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Álvarez-Álvarez, R., Yagüe, P., Manteca, A., and Liras, P. (2018). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a pleiotropic transcriptional regulator: Effect on the transcriptome, antibiotic production, and differentiation in liquid cultures. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAR), 1-18.

Braña, A.F., Rodríguez, M., Pahari, P., Rohr, J. García, L.A. and Blanco, G. (2014). Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Archives of Microbiology*, 196, 345–355.

Britschgi, T.B., and Giovannoni, S.J. (1991). Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1707-1713.

Brown, A.S. Robins, K.J., Ackerley, D.F. (2017) A sensitive single-enzyme assay system using the non-ribosomal peptide

synthetase BpsA for measurement of L-glutamine in biological samples. *Scientific Reports,* 7, 41745.

Brumfitt W., Hamilton-Miller J.M. and Whiter G. (1987). Paldimycin: a novel antibiotic highly active against Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 19, 405-6.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Ōiwa, R. and Ōmura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *15*(3), 361–367.

Camery, J.R.; Hong, S.T. and Gould, S.J. (1997). Seongomycin: a new sulfur-containing benzo[b]fluorene derived from genes clustered with those for kanamycin biosynthesis*. Tetrahedron Letters*., 38, 3139–3142.

Campelo, A.B. y Gil, J.A. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology,* 148, 51–59.

Cano-Prieto C., García-Salcedo R., Sánchez-Hidalgo M., Braña A.F., Fiedler H-P, Méndez C., Salas J.A. y Olano C. (2015) Genome mining of *Streptomyces* sp. Tü6176: characterization of the nataxazole biosynthesis pathway. *ChemBioChem*, 16(10): 1461–73.

Ceniceros A., (2017). Bacterial natural products. Prediction, regulation and characterization of biosynthetic gene clusters in Actinobacteria. *PhD thesis at the University of Groningen.*

Challis, G.L. and Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS,* 100 Suppl 2: 14555-14561.

Charlop-Powers Z, Owen J.G., Reddy B.V.B., Ternei M.A., Guimaraes D.O., de Frias U.A., Pupo M.T., Seepe P., Feng Z. and Brady S.F. (2015) Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *eLife*, *2015*(4), 1–10.

Chater K.F. and Wilde L.C. (1976) Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease SalI. *Journal of Bacteriology,* 128:644–650.

Chater K.F. and Wilde L.C. (1980) *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *Journal of General Microbiology,* 116:323–334.

Chater, K.F. (1998) Taking a genetic scalpel to the Streptomyces colony. *Microbiology,* 144: 1465–1478.

Chater, K.F. and Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 651-672.

Chen, G., Wang, G.-Y.-S., Li, X., Watres, B. and Davies, J. (2000). Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *The Journal of Antibiotics*, *53*(10), 1145–1153.

Chen, S., Huang, X., Zhou, X., Bai, L., He, J., Jeong, K.J., Lee, S.Y. and Deng, Z. (2003). Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chemistry and Biology* 10: 1065–1076.

Chen L., Lai Y.M., Yang Y.L. and Zhao X. (2016) Genome mining reveals the biosynthetic potential of the marine-derived strain *Streptomyces marokkonensis* M10. *Synthetic* and *Systems Biotechnology* 1, 56-65.

Chou W.K., Fanizza I., Uchiyama T., Komatsu M., Ikeda H. and Cane D.E. (2010) Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: cloning and characterization of SAV_76, the synthase for a new sesquiterpene, avermitilol. *Journal of the American Chemical Society,* 132, 8850-8851.

Claessen, H. (1890). Ueber einen indigobllauen farbstoff erzeugenden bacillus aus wasser. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig C*., 7, 13-17.

Cohn, F. (2005). The development history of genus *Volvox*. 1875. *Protist* 156: 358-373.

Cox K.L. and Baltz R.H. (1984) Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. *Journal of Bacteriology,* 159:499–504.

Craney, A., Ahmed, S., and Nodwell, J. (2013). Towards a new science of secondary metabolism. *Journal of Antibiotics*, 66: 387– 400.

Cuenca-Estrella M., Moore C.B., Barchiesi F., Bille J., Chryssanthou E., Denning D.W., Donnelly J.P., Dromer F., Dupont B., Rex J.H., Richardson M.D., Sancak B., Verweij P.E., Rodríguez-Tudela J.L.; AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2003) Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clinical Microbiology and Infection.* 9, 467–474.

Currie C.R., Scott J.A., Summerbell R.C. and Malloch D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites*.* *Nature*, 398:701–704.

Davies, J., Spiegelman, G.B., and Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(5), 445–453.

Dejong, C., Chen, G.M., Li, H., Johnston, C.W., Edwards, M.R., Rees, P.N., Skinnider M.A., Webster A.L.H. and Magarvey, N.A. (2016). Polyketide and nonribosomal peptide retro-biosynthesis and global gene cluster matching. *Nature Chemical Biology,* 12(12), 1007–1014.

Duncan K.R., Crüsemann M., Lechner A., Sarkar A., Li J., Ziemert N., Wang M., Bandeira N., Moore B.S. and Dorrestein P.C. (2015) Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. *Chemistry and Biology,* 22(4):460–471

Eckhardt T., Strickler J., Gorniak L., Burnett W.V. and Fare L.R. (1987). Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted beta-galactosidase from *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 169(9):4249–4256

Elazari-Volcani, B. (1939). On pseudomonas indigofera (voges) migula and its pigments. *Archiv für Mikrobiologie*, 10, 343-358.

English, A.L., Boufridi, A., Quinn, R.J., and Kurtböke, D.I. (2016). Evaluation of fermentation conditions triggering increased antibacterial activity from a near-shore marine intertidal environment-associated *Streptomyces* species. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1–11.

Eustáquio A.S., Nam S.J., Penn K., Lechner A., Wilson M.C., Fenical W., Jensen P.R., Moore B.S. (2011). The discovery of salinosporamide K from the marine bacterium "*Salinispora pacifica*" by genome mining gives insight into pathway evolution. *ChemBioChem,* 12, 61-64

Fang Y., Wang S., Liu S., Jiao Y. (2015). Discovery a novel organic solvent tolerant esterase from *Salinispora arenicola* CNP193 through genome mining. *International Journal* of Biological *Macromolecules,* 80, 334-340

Fernández E., Weissbach U., Sánchez-Reillo C., Braña A.F., Méndez C., Rohr J. y 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. *Journal of Bacteriology*, 180(18): 4929–37.

Fernández M. and Sanchez J. (2002). Nuclease activities and cell death processes associated with the development on Surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH7451. *Microbiology* 148: 405–412.

Fiedler H-P, Bruntner C., Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M., Potterat O., Puder C., Mihm G. (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary

metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 37-42

Flett, F., Mersinias, V. and Smith, C.P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomycetes*. *FEMS Microbiology Letters,* 155: 223–229.

Fukumoto, A., Kim, Y.P., Hanaki, H., Shiomi, K., Tomoda, H. and Omura, S. (2008). Cyslabdan, a new potentiator of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Streptomyces* sp. K04-0144 II. Biological activities. Journal of Antibiotics, 61, 7–10.

Gao B. and Gupta R.S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 76(1): 66-112.

Gilpin, M.L.; Fulston, M.; Payne, D.; Cramp, R. and Hood, I. (1995). Isolation and structure determination of two novel phenazines from a *Streptomyces* with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo-β-lactamase. *Journal of Antibiotics*, 48, 1081–1085.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60–63.

Gómez-Escribano, J.P., Song, L., Fox, D.J., Yeo, V., Bibb, M.J. and Challis, G.L. (2012). Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the cpk gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chemical Science*, 3, 2716–2720.

González A., Rodríguez M., Braña A.F., Méndez C., Salas J.A. and Olano C. (2016). New insights into paulomycin biosynthesis pathway in *Streptomyces albus* J1074 and generation of novel derivatives by combinatorial biosynthesis. *Microbial cell factories*, 15(1): 1-16.

González, A. (2016b). Identificación y análisis de la ruta de biosíntesis de paulomicinas y sus interacciones con otras agrupaciones génicas. *Tesis Doctoral en la Universidad de Oviedo*.

Green M.R. and Sambrook J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed. New York, USA: *COLD SPRING HARBOR PRESS*.

Gu, J.Q., Alexander, D. C., Rock, J., Brian, P., Chu, M., and Baltz, R.H. (2011). Structural characterization of a lipopeptide antibiotic A54145E(Asn3Asp9) produced by a genetically engineered strain of *Streptomyces fradiae*. *The Journal of Antibiotics*, *64*(1), 111–116.

Guan, S., Sattler, I., Lin, W., Guo, D. and Grabley, S. (2005). *p*-Aminoacetophenonic Acids Produced by a Mangrove Endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. *Journal of Natural Products*, 68, 1198–1200.

Hadjithomas, M., Chen, I.A., Chu, K., Ratner, A., Palaniappan, K., Szeto, E., Huang, J., Reddy, T.B.K., Cimermancic, P., Fischbach F.A., Ivanova, N.N., Markowitz, V.M., Kyrpides, N.C. and Pati, A. (2015). IMG-ABC: A Knowledge Base To Fuel Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and Novel Secondary Metabolites. *mBio*, *6*(4), 1–10.

Hane, M.W. (1971) Some effects of nalidixic acid on conjugation in *E. coli* K-12. *Journal of Bacteriology,* 105, 46-56.

Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., and Oliver, S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31, 272–277.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry,* 114: 193-197.

Hooper, A.M. and Rickards, R.W. (1998). 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. XI. Biological origins and semisynthesis of thionaphthomycins, and the structures of naphthomycins I and J. *Journal of Antibiotics*, 51, 845–851.

Hopwood, D.A. and Merrick, M.J. (1977). Genetics of antibiotic production. *Bacteriological Reviews,* 41, 595–635.

Hopwood, D.A. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annual* Review of *Genetics,* 40: 1-23.

Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine. *Oxford University Press*. Inc.

Horbal, L. and Luzhetskyy, A. (2017). The Genetic System of Actinobacteria. *In J. Wink, F. Mohammadipanah, and J. Hamedi (Eds.). Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. (pp. 79–121). Cham: Springer International Publishing.

Horbal, L., Siegl, T. and Luzhetskyy, A. (2018). A set of synthetic versatile genetic control elements for the efficient expression of genes in Actinobacteria. *Scientific Reports*, *8*(1), 491.

Horna D.H., Gómez C., Olano C., Palomino-Schätzlein M., Pineda-Lucena A., Carbajo R.J., Braña A.F., Méndez C. and Salas J.A. (2011). Biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin in *Streptomyces lydicus*: tailoring modification of 3-methyl-aspartate. *Journal of Bacteriology*, 193(10): 2647–51.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology,* 21, 526–531.

Ikeda, H., Shin-Ya, K., Nagamitsu, T. and Tomoda, H. (2016). Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification. *Journal* of *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43, 325–342.

Izumikawa, M., Shipley, P.R., Hopke, J.N., O'Hare, T., Xiang, L., Noel, J.P. and Moore, B.S. (2003) Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal* of *Industrial Microbiology* and *Biotechnology.* 30: 510–515.

Jiang, M., Yin, M., Wu, S., Han, X., Ji, K., Wen, M. and Lu, T. (2017). GdmRIII, a TetR family transcriptional regulator, controls Geldanamycin and Elaiophylin biosynthesis in *Streptomyces autolyticus* CGMCC0516. *Scientific Reports*, *7*(1), 4803.

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. y Hopwood D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics, 2nd ed. Norwich, England: *JOHN INNES FOUNDATION*.

Kitani, S., Miyamoto, K.T., Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H. and Nihira, T. (2011). Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(39), 16410–16415.

Knirschova, R., Novakova, R., Mingyar, E., Bekeova, C., Homerova, D. and Kormanec, J. (2015). Utilization of a reporter system based on the blue pigment indigoidine biosynthetic gene bpsA for detection of promoter activity and deletion of genes in *Streptomyces*. *Journal of Microbiological Methods*, *113*, 1–3.

Kost, C., Lakatos, T., Böttcher, I., Arendholz, W.R., Redenbach, M. and Wirth, R. (2007). Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften,* 94, 821–828.

Kuhn *at al*., (1965). Indigoidine and other bacterial pigments related to 3,3'-bipyridyl. Archiv für Mikrobiologie, 51, 71-84.

Kuhn, R., Starr, M. P., Kuhn, D.A., Bauer, H. and Knackmuss, H.J. (1965). Indigoidine and other bacterial pigments related to 3,3'-bipyridyl. *Archiv Für Mikrobiologie*, *51*(1), 71–84.

Langer-Safer, P.R., Levine, M. and Ward, D.C. (1982). Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *PNAS*, 79, 4381–4385.

Lautru S., Deeth R.J., Bailey L.M. and Challis G.L. (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology,* 1, 265-269

Li, P., Li, J., Guo, Z., Tang, W., Han, J., Meng, X., Hao, T., Zhu, Y., Zhang, L. and Chen, Y. (2015). An efficient blue-white screening based gene inactivation system for *Streptomyces. Applied Microbiology* and *Biotechnology*, 99, 1923-1933

Liesack, W. and Stackebrandt, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of Bacteriology,* 174, 5072–5078

Lin X., Hopson R. and Cane D.E. (2006) Genome Mining in *Streptomyces coelicolor*: Molecular Cloning and Characterization of a New Sesquiterpene Synthase. *Journal of the American Chemical Society,* 128, 6022-6023

Locci, R., Baldacci, E. and Petrolini-Baldan, B. (1969). The genus *Streptoverticillium*. A taxonomic study. *Journal of Microbiology,* 17: 1-60.

Lu, F., Hou, Y., Zhang, H., Chu, Y., Xia, H. and Tian, Y. (2017). Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in Streptomyces. *3 Biotech*, *7*(4).

Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Busse H.J., Trujillo M.E., Kämpfer P. and Whitman W.B. (2012a). Road Map of the Phylum *Actinobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 5, parte A. Springer, New York, NY, pp. 1-28

Ludwig W., Euzéby J. and Whitman W.B. (2012b). Taxonomic outline of the Phylum *Actinobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 5, parte A. Springer, New York, NY, pp. 29-31

MacNeil D.J., Gewain K.M., Ruby C.L., Dezeny G., Gibbons P.H. and MacNeil T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene,* 111(1): 61–68.

Malmierca M.G., González-Montes L., Pérez-Victoria I., Sialer C., Braña A.F., García-Salcedo R., Martín J., *Reyes* F., Méndez C., Olano C. and Salas J.A. (2018). Searching for Glycosylated Natural Products in Actinomycetes and Identification of Novel Macrolactams and Angucyclines*. Frontiers in Microbiology,* 9:39.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory*.

Manteca A., Claessen D., López-Iglesias C. and Sánchez J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters,* 274: 118-125.

Manteca A., Álvarez R., Salazar N., Yagüe P. and Sánchez J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology,* 74: 3877-3886.

Manteca A., Sánchez J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2920-2924.

Martín, J.F. and Liras, P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology,* 43, 173–206.

Martín, J.F. and Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology* (Vol. 13).

Mazodier, P., Petter, R., Thompson, C. (1989). Intergeneric conjugation between *E. coli* and *Streptomyces sp*. *Journal of Bacteriology*, 171, 3583-3585.

McLean T.C., Hoskisson P.A., Seipke R.F. (2016). Coordinate regulation of antimycin and candicidin biosynthesis. *mSphere*, 1(6):e00305- 16.

Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, de Bruijn I, Chooi YH, Claesen J, Coates RC, Cruz-Morales P, Duddela S, Düsterhus S, Edwards DJ, Fewer DP, Garg N, Geiger C, Gomez-Escribano JP, Greule A, Hadjithomas M, Haines AS, Helfrich EJ, Hillwig ML, Ishida K, Jones AC, Jones CS, Jungmann K, Kegler C, Kim HU, Kötter P, Krug D, Masschelein J, Melnik AV, Mantovani SM, Monroe EA, Moore M, Moss N, Nützmann HW, Pan G, Pati A, Petras D, Reen FJ, Rosconi F, Rui Z, Tian Z, Tobias NJ, Tsunematsu Y, Wiemann P, Wyckoff E, Yan X, Yim G, Yu F, Xie Y, Aigle B, Apel AK, Balibar CJ, Balskus EP, Barona-Gómez F, Bechthold A, Bode HB, Borriss R, Brady SF, Brakhage AA, Caffrey P, Cheng YQ, Clardy J, Cox RJ, De Mot R, Donadio S, Donia MS, van der Donk WA, Dorrestein PC, Doyle S, Driessen AJ, Ehling-Schulz M, Entian KD, Fischbach MA, Gerwick L, Gerwick WH, Gross H, Gust B, Hertweck C, Höfte M, Jensen SE, Ju J, Katz L, Kaysser L, Klassen JL, Keller NP, Kormanec J, Kuipers OP, Kuzuyama T, Kyrpides NC, Kwon HJ, Lautru S, Lavigne R, Lee CY, Linquan B, Liu X, Liu W, Luzhetskyy A, Mahmud T, Mast Y, Méndez C, Metsä-Ketelä M, Micklefield J, Mitchell DA, Moore BS, Moreira LM, Müller R, Neilan BA, Nett M, Nielsen J, O'Gara F, Oikawa H, Osbourn A, Osburne MS, Ostash B, Payne SM, Pernodet JL, Petricek M, Piel J, Ploux O, Raaijmakers JM, Salas JA, Schmitt EK, Scott B, Seipke RF, Shen B, Sherman DH, Sivonen K, Smanski MJ, Sosio M, Stegmann E, Süssmuth RD, Tahlan K, Thomas CM, Tang Y, Truman AW, Viaud M, Walton JD, Walsh CT, Weber T, van Wezel GP, Wilkinson B, Willey JM, Wohlleben W, Wright GD, Ziemert N, Zhang C, Zotchev SB, Breitling R, Takano E and Glöckner FO. (2015). Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature Chemical Biology,* 11, 625–631.

Méndez C., Braña A.F., Manzanal M.B. and Hardisson C. (1985) Role of substrate mycelium in colony development in Streptomyces. *Canadian Journal of Microbiology,* 31: 446–450.

Méndez, C., Weitnauer G., Bechthold A. and Salas J.A. (2000). Structure alteration of polyketides by recombinant DNA technology in producer organisms prospects for the generation of novel pharmaceutical drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology,* 1: 355-395.

Méndez, C. and Salas, J.A. (2001). Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnology*, 7799(1995), 33–38.

Méndez, C. and Salas, J.A. (2003). On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combintorial biosynthesis to produce novel drugs. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6: 513-526

Menéndez, N., Nur-e-Alam, M., Fischer, C., Braña, A.F., Salas, J.A., Rohr, J., and Méndez, C. (2006). Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 167-177.

Miguélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion equivalent to apoptosis in a multicellular prokaryote. *Journal of Cell Biology,* 145: 515–525.

Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York.

Milshteyn, A., Schneider, J.S., and Brady, S.F. (2014). Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chemistry* and *Biology,* 21, 1211–1223.

Moran, M.A., Rutherford, L.T., and Hodson, R.E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with 16S rRNA probe. *Applied and Environmental Microbiology,* 61: 3695-3700.

Mueller, U.G. and Gerardo, N. (2002). Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 99(24):15247–49.

Mueller, U.G., Dash, D., Rabeling, C., and Rodrigues, A. (2008). Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evolution* 62, 2894–2912.

Müller, M., Auslander, S., Auslander, D., Kemmer, C. and Fussenegger, M. (2012). A novel reporter system for bacterial and mammalian cells based on the non-ribosomal peptide indigoidine. *Metabolic Engineering,* 14:325–335.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1: 263-273.

Myronovskyi M., Tokovenko B., Brötz E., Ruckert C., Kalinowski J. and Luzhetskyy A. (2013). Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. *Applied Microbiology* and *Biotechnology*, 98:795–806.

NCBI (2013). New NCBI Handbook chapters: Eukaryotic and prokaryotic genome annotation pipelines. *NCBI News.*

Nett M., Ikeda H. and Moore B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports,* 26:1362–1384.

Nguyen T.B., Kitani S., Shimma S. and Nihira T. (2018). Butenolides from *Streptomyces albus* J1074 act as external signals to stimulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Applied and environmental microbiology*, *84*(9), 1–11.

Novakova, R., Odnogova, Z., Kutas, P., Feckova, L. and Kormanec, J., 2010. Identification and characterization of an indigoidine-like gene for a blue pigment biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* CCM3239. *Folia Microbiologica,* 55, 119–125.

Okada, B.K., and Seyedsayamdost, M.R. (2017). Antibiotic dialogues: Induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), 19–33.

Olano, C., Wilkinson, B., Sánchez, C., Moss, S.J., Sherindan, R., Math, V., Weston, A.J., Braña, A.F., Martín, C.J., Oliynyk, M., Méndez, C., Leadlay, P.F., and Salas, J.A. (2004). Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: cluster analysis and assignment of functions. *Chemistry* and *Biology,* 11: 87- 97.

Olano C., García I., González A., Rodríguez M., Rozas D., Rubio J., Sánchez-Hidalgo M., Braña A.F., Méndez C. and Salas J.A. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microbial Biotechnology,* 7:242–256.

Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., and Stahl, D.A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology,* 40, 337–365.

Omura, S.; Fujimoto, T.; Otoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H. and Sasaki, Y. (1991) Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *Journal of antibiotics*, 44, 113–116.

Owen J.G., Robins K.J., Parachin N.S. and Ackerley D.F. (2012). A functional screen for recovery of 4'-phosphopantetheinyl transferase and associated natural product biosynthesis genes from metagenome libraries. *Environmental Microbiology,* 14:1198–1209

Pait, I.G.U., Kitani, S., Kurniawan, Y.N., Asa, M., Iwai, T., Ikeda, H., and Nihira, T. (2017). Identification and characterization of IbpA, an indigoidine biosynthetic gene in the γ-butyrolactone signaling system of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *124*(4), 369–375.

Palazzotto, E., Renzone, G., Fontana, P., Botta, L., Scaloni, A., Puglia, A. M., and Gallo, G. (2015). Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(23), 10177–10189.

Peláez A., Ribas-Aparicio R., Gómez A. and Rodicio M. (2001). Structural and functional characterization of the *recR*

gene of *Streptomyces*. *Molecular Genetics and Genomics,* 265:663-672.

Pettit, R.K. (2011). Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology*, *4*(4), 471–478.

Pompeani, A.J., Irgon, J.J., Berger, M.F., Bulyk, M.L., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2008). The Vibrio harveyi master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. *Molecular Microbiology*, *70*(1), 76–88.

Poorinmohammad, N. and Hamedi, J. (2017). Post-genomic Studies and Systems Biology of Actinobacteria: A Brief Overview. *In J. Wink, F. Mohammadipanah, and J. Hamedi (Eds.), Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 377–395). Cham: Springer International Publishing.

Poulsen, M., Oh, D.C., Clardy, J., and Currie, C.R. (2011). Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS ONE*, *6*(2), e16763.

Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D., and Nasser, W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, *184*(3), 654–665.

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A., and van Wezel, G.P. (2008). Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, *9*(7), 670–675.

Rodicio M.R., Chater K.F. (1988). The SalI (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Gene,* 74:39–42

Rodicio M.R., Alvarez M.A., Chater K.F. (1991). Isolation and genetic structure of IS*112*, an insertion sequence responsible for the inactivation of the SalI restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Molecular Genetics and Genomics,* 225:142–147

Romero-Rodríguez A., Robledo-Casados I., Sánchez S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1849:1017–1039

Rozen, S. and Skaletsky, H. (1998). Primer3. *Methods in Molecular Biology*, 132. 365-386.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T.., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* 230: 1350-1354.

Sambrook, J., Fristsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory. New York.*

Sambrook, J. y Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Sarmiento-Vizcaíno, A., Braña, A. F., Pérez-Victoria, I., Martín, J., De Pedro, N., De La Cruz, M., Díaz, C., Vicente, F., Acuña, J.L., Reyes, F., García, L.A. and Blanco, G. (2017). Paulomycin G, a new natural product with cytotoxic activity against tumor cell lines produced by deep-sea sediment derived *Micromonospora matsumotoense* M-412 from the Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. *Marine Drugs*, *15*(9).

Schulz, D., Nachtigall, J., Riedlinger, J., Schneider, K., Poralla, K., Imhoff, J.F., Beil, W., Nicholson, G., Fiedler, H.P. and Süssmuth, R.D. (2009). Piceamycin and its N-acetylcysteine adduct is produced by *Streptomyces* sp. GB 4-2. *Journal of Antibiotics*, 62, 513–518.

Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D.W., Goss, R.J., and Hutchings, M.I. (2011). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE,* 6: e22028.

Seyedsayamdost, M.R. (2014). High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(20), 7266–7271.

Sharma, D., Mandal, S.M., and Manhas, R.K. (2014). Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis sp. nov.* active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *AMB Express*, *4*(1), 1–9.

Song L., Barona-Gómez F., Corre C., Xiang L., Udwary D.W., Austin M.B., Noel J.P., Moore B.S. and Challis G.L. (2006). Type III polyketide synthase β-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Journal of the American Chemical Society,* 128, 14754-14755.

Stadler, M., Bitzer, J., Mayer-Bartschmid, A., Müller, H., Benet-Buchholz, J., Gantner, F., Tichy, H.V., Reinemer, P. and Bacon, K.B. (2007). Cinnabaramides A–G: analogues of lactacystin and salinosporamide from a terrestrial streptomycete. *Journal of Natural Products*, 70, 246–252. [

Sun Y., He X., Liang J., Zhou X. and Deng Z. (2009). Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:303-310.

Sun, Y.Q., Busche, T., Rückert, C., Paulus, C., Rebets, Y., Novakova, R., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Kormanec, J., Sekurova, O.N. and Zotchev, S.B. (2017). Development of a Biosensor Concept to Detect the Production of Cluster-Specific Secondary Metabolites. *ACS Synthetic Biology*, *6*(6), 1026–1033.

Taerum S.J., Cafaro M.J., Little A.E.F., Schultz T.R., Currie C.R. (2007). Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B,* 274: 1971–1978.

Tan, G.Y., Deng, K., Liu, X., Tao, H., Chang, Y., Chen, J., Chen, K., Sheng, Z., Deng, Z. and Liu, T. (2017). Heterologous Biosynthesis of Spinosad: An Omics-Guided Large Polyketide Synthase Gene Cluster Reconstitution in *Streptomyces*. *ACS Synthetic Biology*, *6*(6), 995–1005.

Tanaka, Y., Hosaka, T., and Ochi, K. (2010). Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics*, *63*(8), 477–481.

Thompson, C.J., Fink, D., and Nguyen, L.D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology*, *3*(7), REVIEWS1020.

Tian J., Chen H., Guo Z., Liu N., Li J., Huang Y., Xiang W., Chen Y. (2016). Discovery of pentangular polyphenols hexaricins A–C from marine *Streptosporangium sp.* CGMCC 4.7309 by genome mining. *Applied Microbiology* and *Biotechnology* 100, 4189-4199

Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L. (1990a). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology,* 56, 782–787.

Torsvik, V., Salte, K., Sørheim, R., and Goksøyr, J. (1990b). Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology,* 56, 776–781.

Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S., and McDowall, K.J. (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *58*(1), 131–150.

van der Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., and van Wezel, G.P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 392–416.

Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *Journal of Antibiotics,* 28, 721–726.

Vieira, J., and Messing, J. (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*. 100: 189-194.

Waksman, S.A. and Henrici, A.T. (1943). The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 46, 337-341.

Wang, F., Xu, M., Li, Q., Sattler, I., and Lin, W. (2010). *p*-aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte *Streptomyces* sp. (strain HK10552). *Molecules*, *15*(4), 2782–2790.

Wang, X.K. and Jin, J.L. (2014). Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains. *FEMS Microbiology Letters,* 357, 99–103.

Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345, 63-65.

Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E.M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H.U., and Lee, S.Y. (2015). Metabolic engineering of antibiotic factories: New tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in Biotechnology*, *33*(1), 15–26.

Weller, R., Weller, J.W., and Ward, D.M. (1991). 16S rRNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Applied and Environmental Microbiology,* 57, 1146–1151.

Wohlleben, W., Bera, A., Mast, Y., and Stegmann, E. (2017). Regulation of Secondary Metabolites of Actinobacteria. In J. Wink, F. Mohammadipanah, and J. Hamedi (Eds.), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 181–232). Cham: Springer International Publishing.

Woo, C.M., Gholap, S.L. and Herzon, S.B. (2013). Insights into lomaiviticin biosynthesis. Isolation and structure elucidation of (-)-homoseongomycin. *Journal of Natural Products*, 76, 1238–1241.

Xu, F., Nazari, B., Moon, K., Bushin, L.B., and Seyedsayamdost, M.R. (2017). Discovery of a Cryptic Antifungal Compound from *Streptomyces albus* J1074 Using High-Throughput Elicitor Screens. *Journal of the American Chemical Society*, 139(27), 9203–9212.

Yan, Y., Zhang, L., Ito, T., Qu, X., Asakawa, Y., Awakawa, T., Abe, I. and Liu, W. (2012). Biosynthetic pathway for high structural diversity of a common dilactone core in antimycin production. *Organic Letters*, *14*(16), 4142–4145.

Yagüe P., López-García M.T., Rioseras B., Sánchez J. and Manteca A. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiology Letters,* 342(2): 79-88.

Yao, C.B.F., Schiebel, M., Helmke, E., Anke, H., and Laatsch, H. (2006). Prefluostatin and new urauchimycin derivatives produced by *Streptomycete* isolates. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, *61*(3), 320–325.

Ye, S., Molloy, B., Braña, A.F., Zabala, D., Olano, C., Cortés, J., Morís, F., Salas, J.A. and Méndez, C. (2017). Identification by genome mining of a type I polyketide gene cluster from *Streptomyces argillaceus* involved in the biosynthesis of pyridine and piperidine alkaloids argimycins P. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-18

Yu, F., Zaleta-Rivera, K., Zhu, X., Huffman, J., Millet, J.C., Harris, S.D., Yuen, G., Li, X.C. and Du, L. (2007). Structure and biosynthesis of heat-stable antifungal factor (HSAF), a broad-spectrum antimycotic with a novel mode of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 51, 64-72.

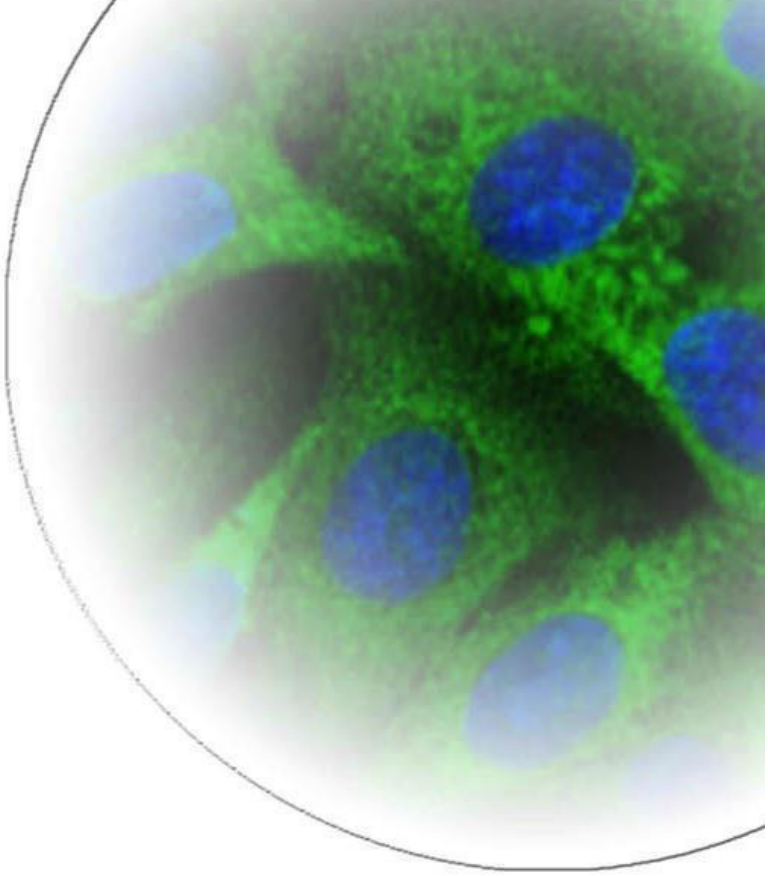
Zaburannyi N., Rabyk M., Ostach B., Federenko V. and Luzhetskyy A. (2014), Insights into naturally minimized *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics* 15, 97.

Zhang, H.Z., Schmidt, H., and Piepersberg, W. (1992). Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, lmrA and lmrB, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology*. 6, 2147–2157.

Zhou, Z., Gu, J., Du, Y.L., Li, Y.Q., and Wang, Y. (2011). The -omics Era- Toward a Systems-Level Understanding of *Streptomyces*. *Current Genomics*, *12*(6), 404–416.

Ziemert, N., Alanjary, M., and Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports*, *33*(8), 988–1005.

Anexos



Fundación MEDINA

Discovering the Future

through Natural Diversity, Technology & Expertise

Resultados de desreplicación

Presupuesto: AT-0093

DRC-029 vs. DRC-030 revisado

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
30-Mar-2015	Jesús Martín	Fernando Reyes

Contenidos

MÉTODO 3
RESUMEN DE RESULTADOS 4
DRC-029 VS. DRC-30 5

MÉTODO

Las muestras recibidas se disolvieron en 100µL de MeOH y se analizaron en un HPLC Agilent 1200 Rapid Resolution conectado a un espectrómetro de masas maXis de Bruker. El volumen de muestra inyectado fue de 2µL. Para la separación se utilizó una columna Zorbax SB-C8 (2.1 x 30 mm, 3.5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: solvente A compuesto de agua:AcN 90:10 , solvente B agua:AcN 10:90, ambos a 13mM de formiato amónico y 0.01% de TFA.
La composición general del gradiente fue:

Tiempo (minutos)	**A**	**B**	**Flujo (mL/min)**
0.0	90	10	0.3
6.0	0	100	0.3
8.0	0	100	0.3
8.1	90	10	0.3
10.0	90	10	0.3

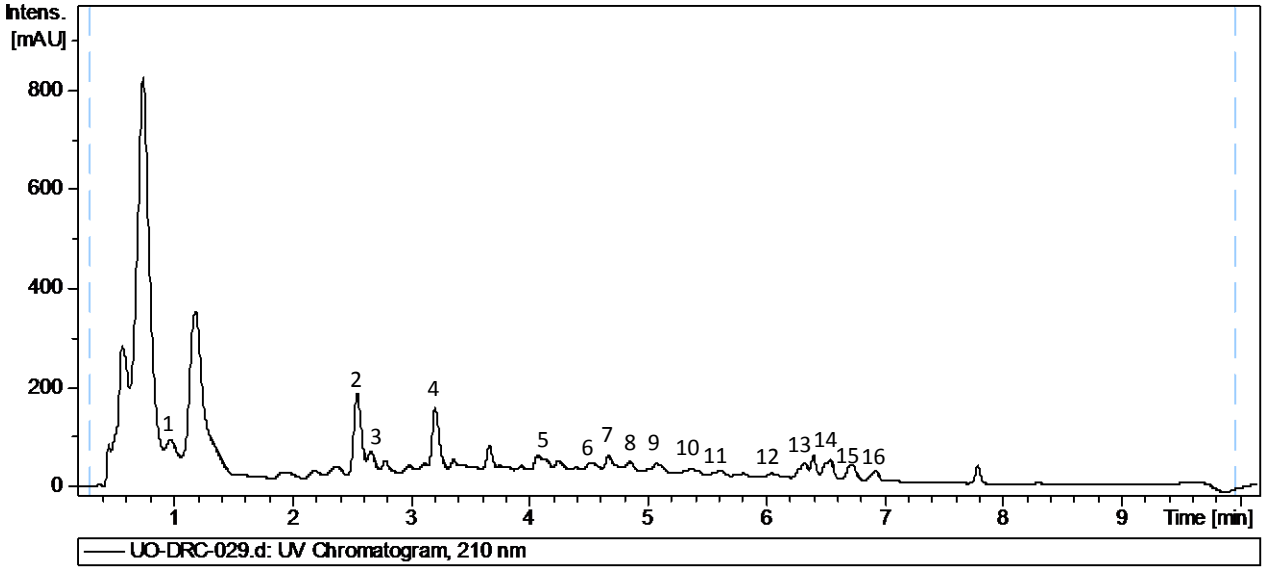
El espectrómetro de masas se ajustó en modo ESI (Ionización por ElectroeSpray) positivo, siendo los parámetros seleccionados: 4kV de voltaje de capilar, 11 l/min a 200ºC para el flujo de gas de secado y 2.8 bares de presión en el nebulizador.
La calibración del equipo antes de la inyección de muestras, se realizó utilizando el cluster de iones generado por el TFA en presencia de iones Na^+. Posteriormente, cada muestra inyectada se recalibró mediante la infusión del calibrante compuesto de TFA-Na antes de la aparición del frente cromatográfico. Cada una de las carreras cromatográficas se procesó utilizando el algoritmo interno de Bruker para la extracción de componentes, y los picos más intensos, tanto por TIC en positivo como por absorbancia a 210nm se consideraron para su interpretación de masas exacta y fórmula molecular.
La combinación del tiempo de retención y de la masa exacta se utilizó como criterio de búsqueda en la base de datos de espectrometría de masas de alta resolución de la Fundación MEDINA. En el supuesto de que se encuentre alguna coincidencia, este dato se reporta con el nombre del compuesto. Para aquellos componentes sin coincidencias en la base de datos mencionada se realizó una búsqueda de la masa exacta/fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales de Chapman & Hall. Si se encuentra una posible coincidencia, considerando la masas exacta/fórmula molecular, el organismo productor y el espectro UV, la molécula se etiquetó como componente sugerido.

RESUMEN DE RESULTADOS

Muestra	Comentarios
DRC-029 vs. DRC-030	La desreplicación de las dos muestras ha resultado en idénticos componentes, siendo estos: • Flavonas provenientes de medios de cultivo con soja • Coproporfirina • Surugamidas • Antimicinas ~~El pico P1 corresponde a un componente que no presenta ionización ni en modo positivo ni negativo, y del que no se puede, por tanto, sugerir fórmula molecular.~~ Considerando el espectro de masas suministrado, al pico P1 se le asocia la fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$, no encontrada en el DPN para procariotas. ~~Los picos 2 y 3 no han podido localizarse en el cromatograma obtenido.~~ Los picos de los que se ha suministrado espectro de masas y de UV corresponden, uno de ellos a **N-N-dimethyladenosine** y el segundo a $C_7H_7NO_2$ (posiblemente **2-aminobenzoic acid**). El pico P4 presenta la fórmula molecular $\mathbf{C_{18}H_{27}NO_5}$, la cual no aparece en el Diccionario de Productos Naturales relacionada con procariotas. El espectro de UV suministrado para el pico P5 aparece varias veces en el cromatograma. Los componentes a los que se ha asociado dicho espectro (surugamidas y antimicinas) no explican el máximo alrededor de 300nm del espectro de UV observado, ni mucho menos la contaminación por polieno que aparece en el rango de 360 a 410nm.

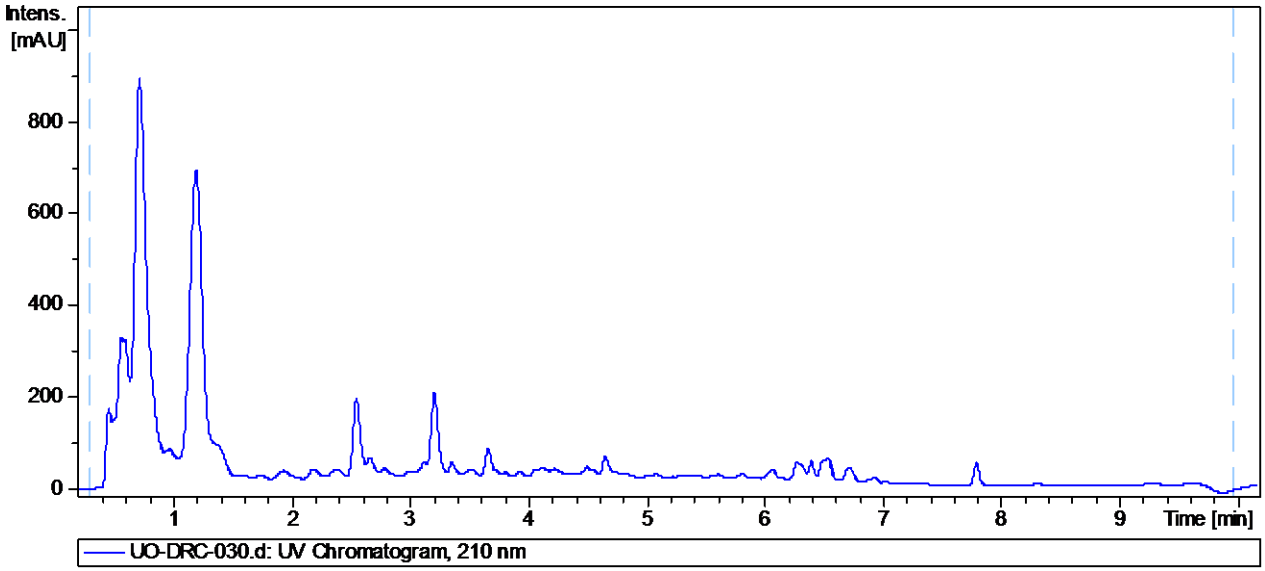
DRC-029 vs. DRC-30

A continuación se muestra el cromatograma de absorbancia a 210nm de la cepa salvaje DRC-029 con las anotaciones correspondientes de los compuestos que se han podido desreplicar por comparación con la base de datos de MEDINA.



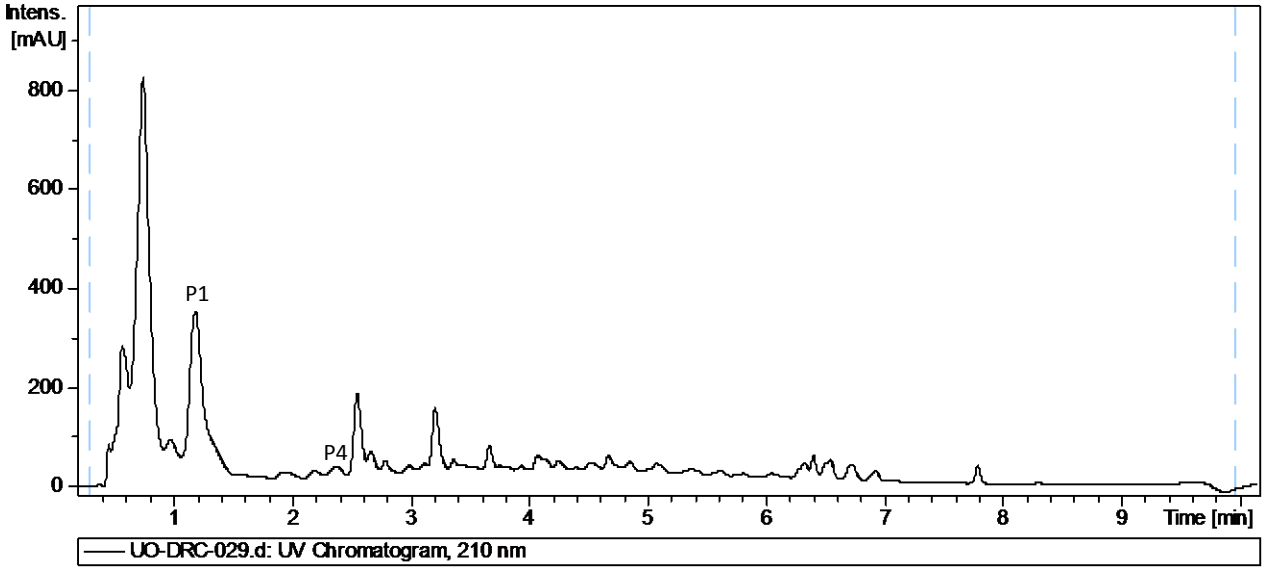
Pico #	Coincidencia en BD
1	Nocardamine
2	Daidzein
3	Glycitein
4	Genistein
5	Coproporphyrin
6	Surugamide E
7	Surugamide A
8	Antimicin $C_{25}H_{34}N_2O_9$
9	Blastmycin
10	Antimicin $C_{27}H_{38}N_2O_9$
11	Antimicin $C_{28}H_{40}N_2O_9$
12	Antimicin $C_{28}H_{40}N_2O_9$
13	Antimicin $C_{27}H_{38}N_2O_9$
14	Antimicin $C_{28}H_{40}N_2O_9$
15	Antimicin $C_{29}H_{42}N_2O_9$
16	Antimicin $C_{30}H_{44}N_2O_9$

El siguiente cromatograma de absorbancia a 210nm corresponde a la muestra DRC-030, en la que se pueden identificar los mismos compuestos anotados en la muestra DRC-029:

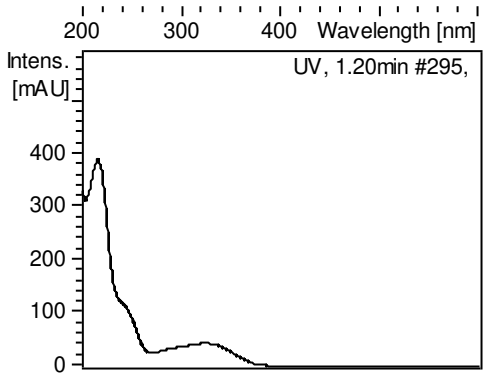


Estudio de picos diferenciales seleccionados en la muestra DRC-029:

En el siguiente cromatograma a 210nm se han anotado los picos seleccionados para su estudio:

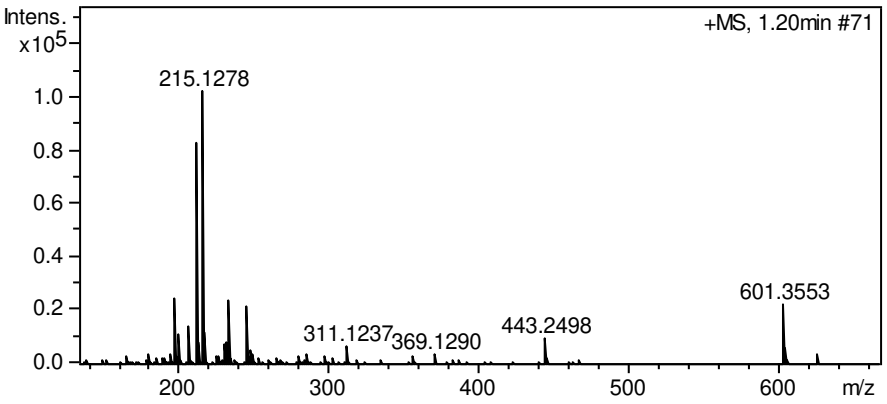


Pico P1



~~Este pico no presenta ionización ni en modo positivo ni en modo negativo, por lo que no se puede sugerir ninguna fórmula molecular.~~

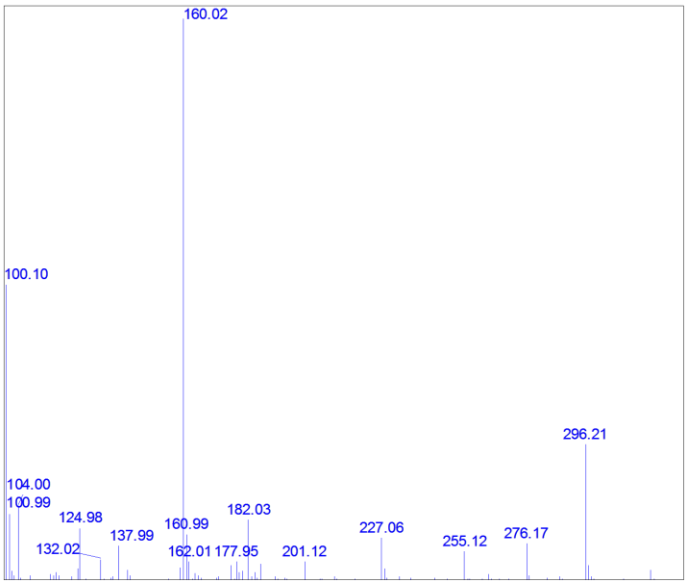
Considerando el espectro de masas suministrado, la fórmula molecular sugerida corresponde a $C_{11}H_{18}O_4$. Esta fórmula molecular no se encuentra en el Diccionario de Productos Naturales asociada a procariotas.
A continuación se muestra el espectro de masas seleccionado y el ion pseudomolecular (m/z=215.1278) utilizado para la interpretación de la fórmula molecular:

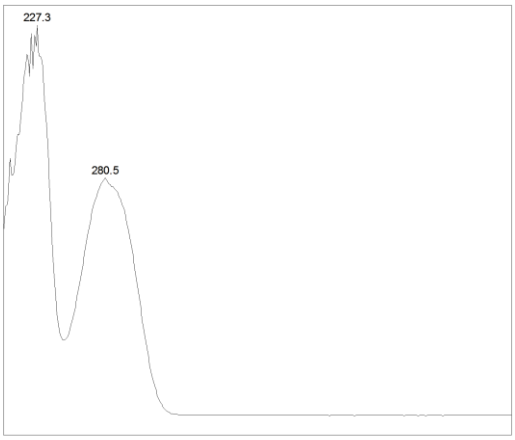


~~Picos P2 y P3~~

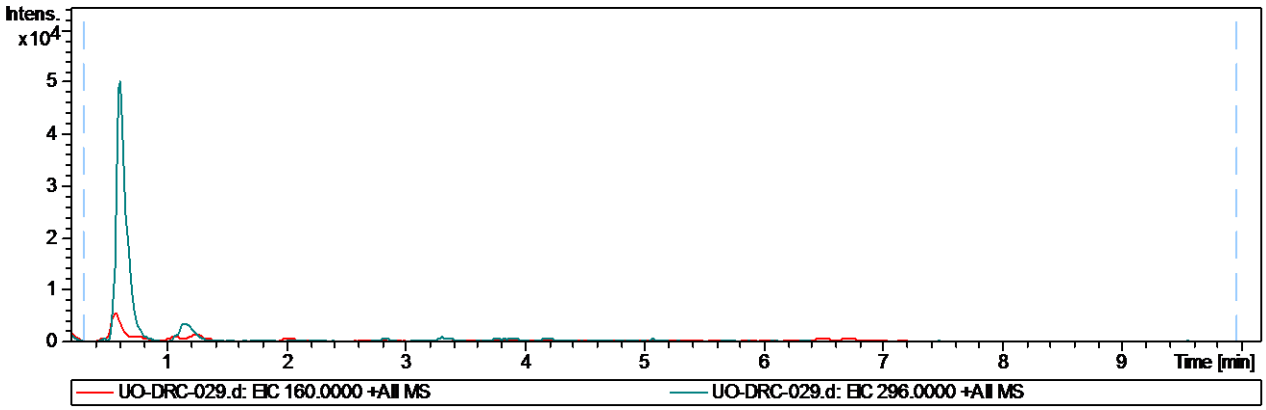
~~En el cromatograma suministrado para realizar el estudio, los picos P2 y P3 se encuentran localizados entre el pico P1 y el pico P4 y ambos presentan máximos de absorción alrededor de 285nm. Por desgracia, con la cromatografía realizada en la Fundación MEDINA no ha sido posible localizar ningún pico con máximo de absorción alrededor de 280nm entre P1 y P4, y por tanto no se ha podido asociar ningún pico ni a P2 ni a P3.~~

Picos seleccionados con los siguientes espectros de masas y de UV:

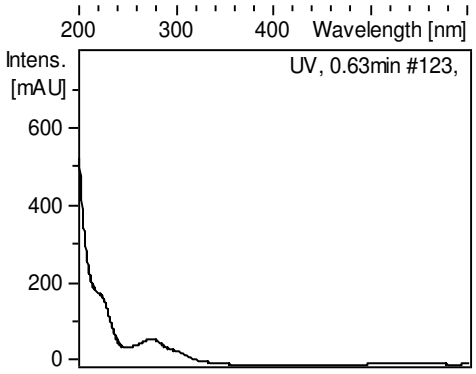


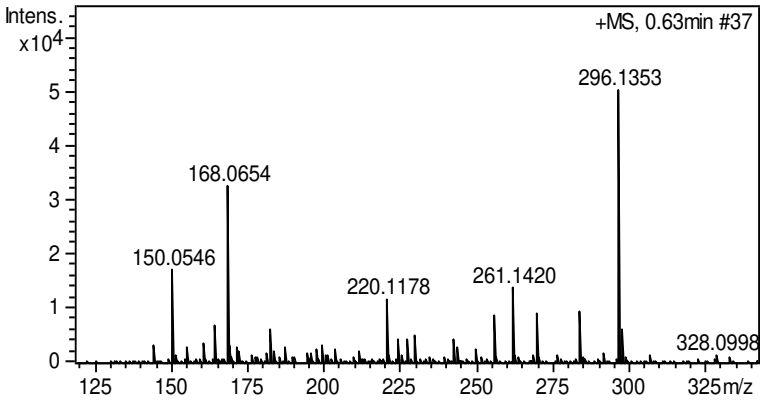


A continuación se muestra el cromatograma con los iones m/z=160 y m/z=296 extraídos. Se aprecia que el componente de interés corresponde al tiempo de retención 0.63 minutos.

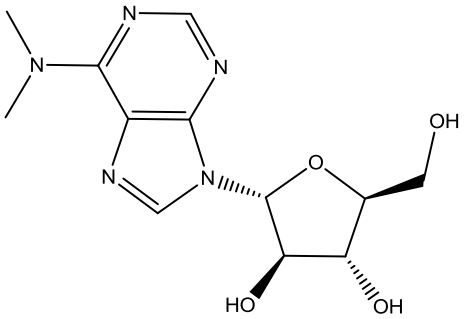


Los espectros de masas y UV obtenidos para este tiempo de retención son los siguientes:



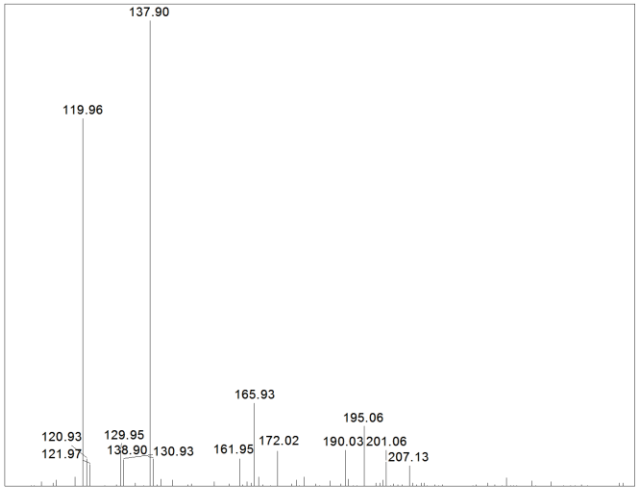


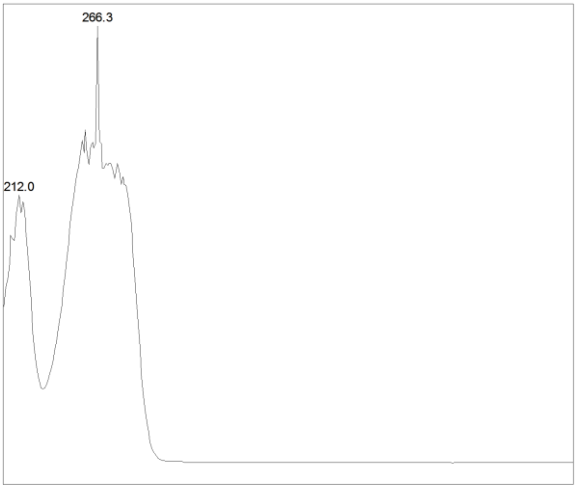
La fórmula molecular sugerida para el ion m/z=296.1353 es $C_{12}H_{18}N_5O_4^+$, que considerando el tiempo de retención obtenido muy probablemente estamos detectando el ion $M+H^+$ de **N,N-Dimethyladenosine**.



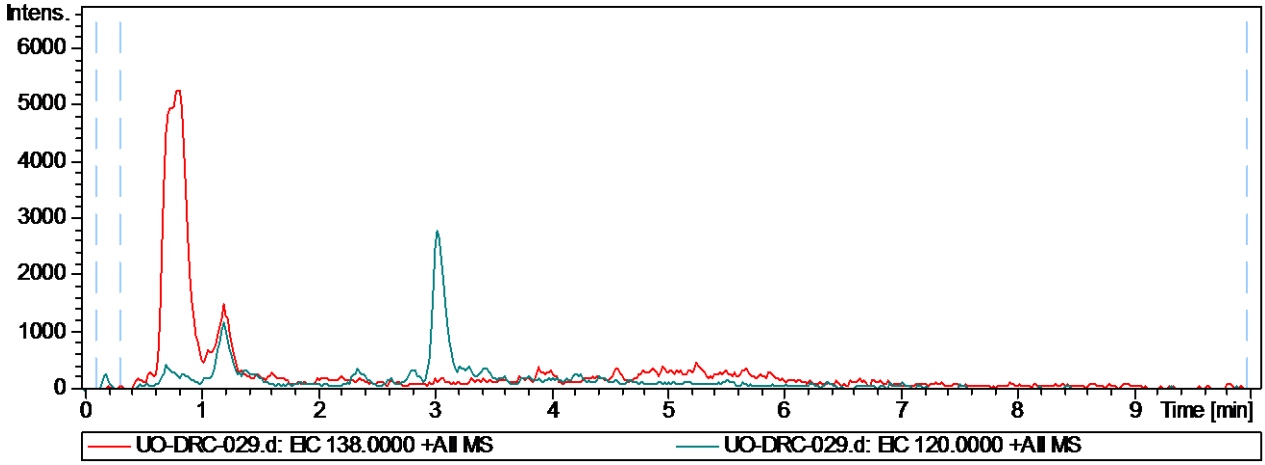
N,N-Dimethyladenosine

Picos seleccionados con los siguientes espectros de masas y de UV:

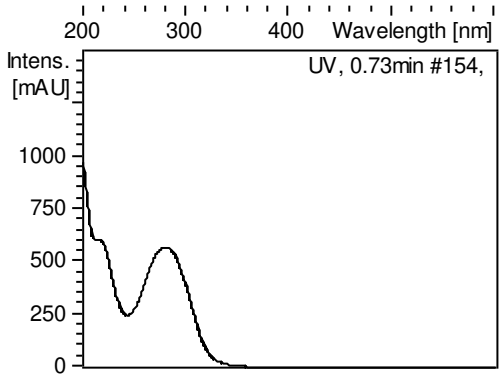


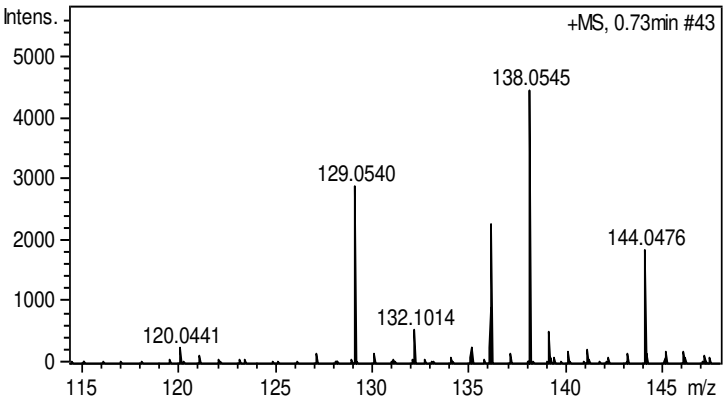


A continuación se muestra el cromatograma con los iones m/z=120 y m/z=138 extraídos. De los posibles máximos que se observan en el cromatograma, el que corresponde a 0.73 minutos es el que mejor correlación presenta con el UV solicitado.



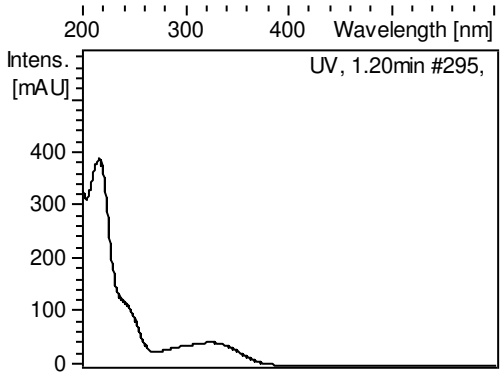
Los espectros de masas y UV obtenidos para este tiempo de retención son los siguientes:

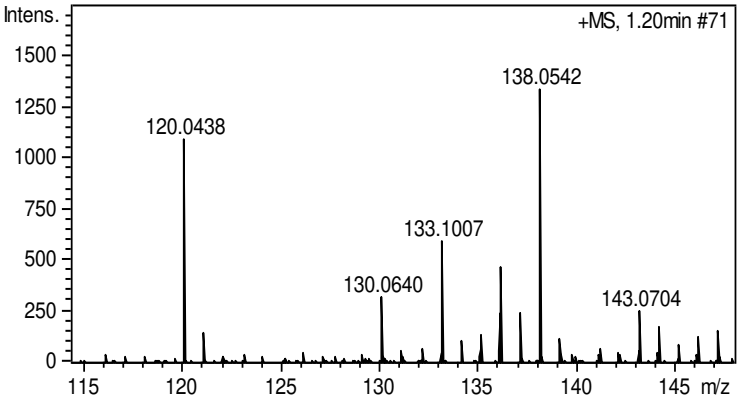




El ion m/z=138.0545 presenta la fórmula molecular $C_7H_8NO_2$+, que puede corresponder al ión $M+H^+$ del **2-aminobenzoic acid**, si bien el espectro UV de este compuesto no coincide con el observado experimentalmente. El ion m/z=120.0441 tiene la fórmula molecular $C_7H_6NO^+$, siendo una pérdida de agua de la anteriormente descrita.

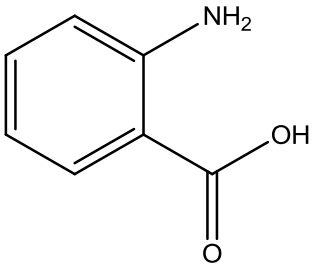
Para el segundo posible pico que contiene los dos iones de interés, el tiempo de retención es 1.20 minutos y se han obtenido los siguientes espectros de masas y de UV:





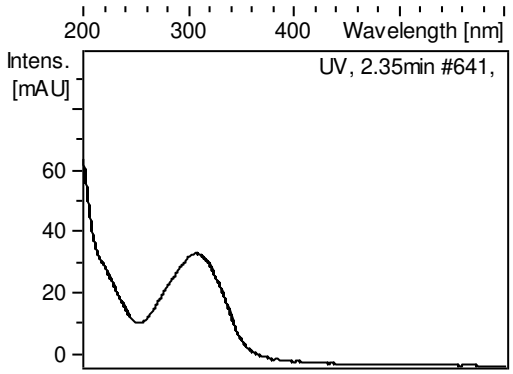
El tiempo de retención coincide con el obtenido anteriormente para el P1, por lo que el espectro buscado puede quedar enmascarado por éste.

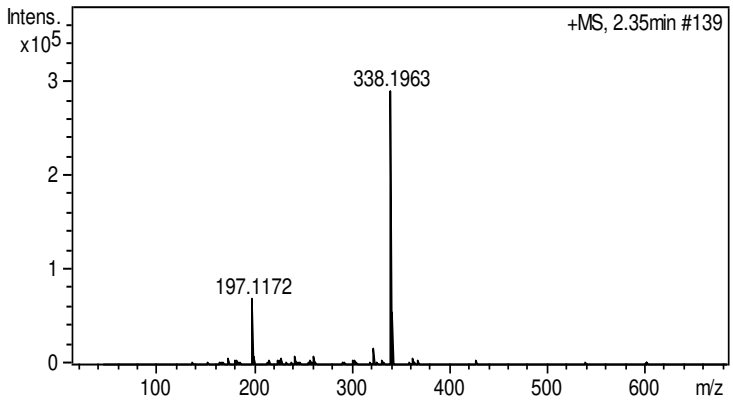
Las fórmulas moleculares obtenidas para los iones m/z=138.0542 y m/z=120.0438 son de nuevo $C_7H_8NO_2^+$ y $C_7H_6NO^+$ y en este caso el espectro de UV observado si coincide con el esperado para el **2-aminobenzoic acid**.



2-aminobenzoic acid

Pico P4

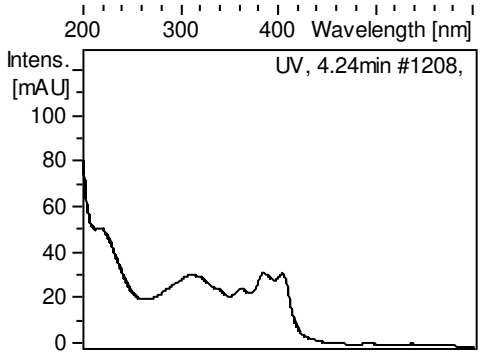


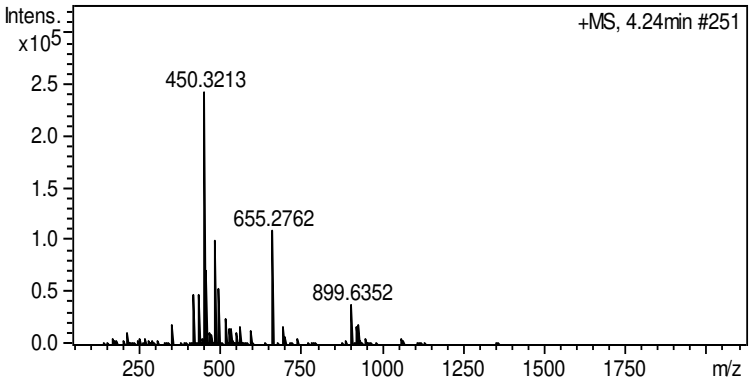


La fórmula molecular calculada para este componente corresponde a **$C_{18}H_{27}NO_5$**, y no se encuentra en el Diccionario de Productos Naturales asociada a procariotas.

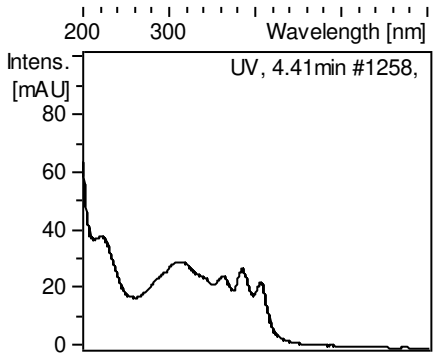
Pico P5

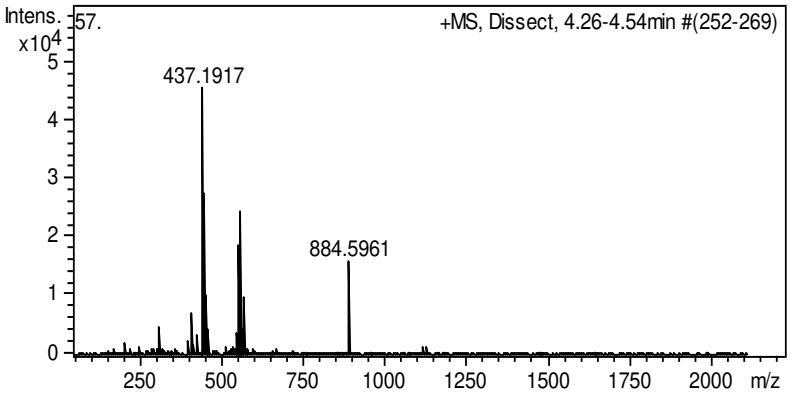
El espectro UV suministrado para el pico P5 presenta una contaminación por polieno y aparece repetidas veces a lo largo de todo el cromatograma. A continuación se muestran los diferentes picos seleccionados:



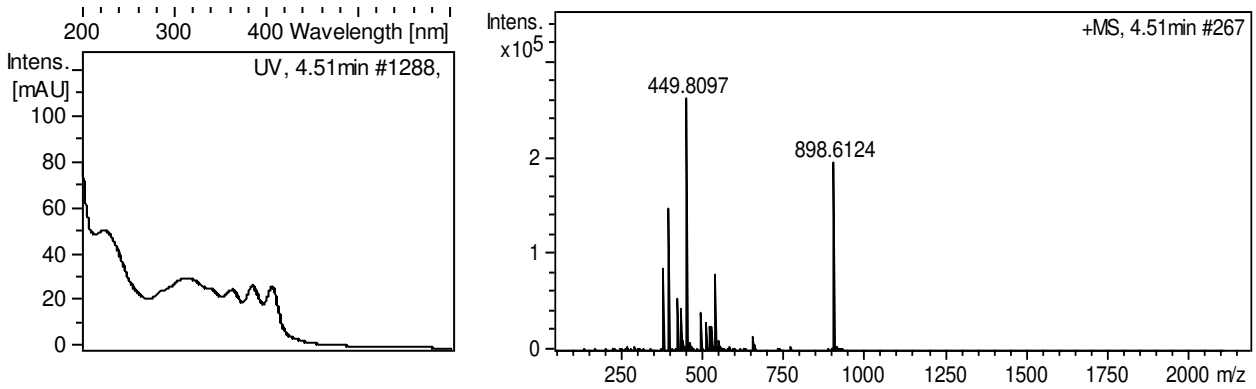


Fórmula molecular sugerida **$C_{26}H_{43}NO_5$**, no encontrada en el DPN para procariotas

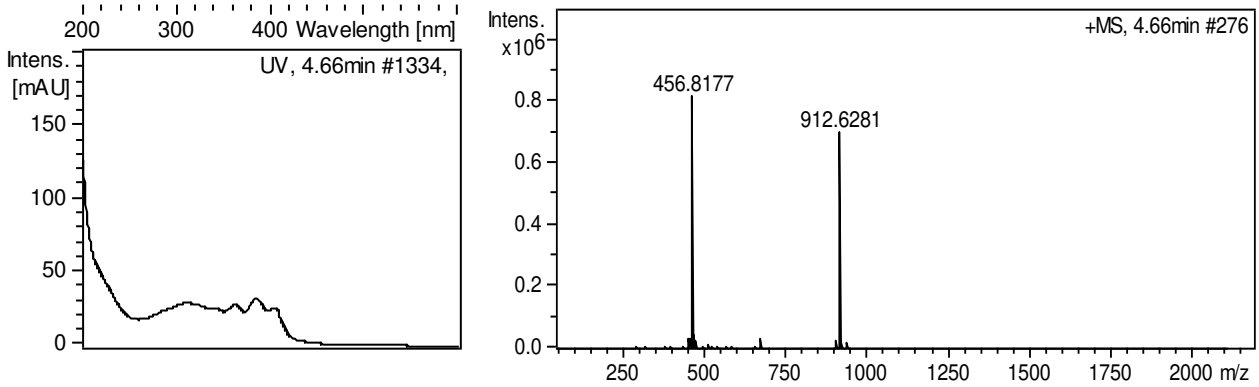




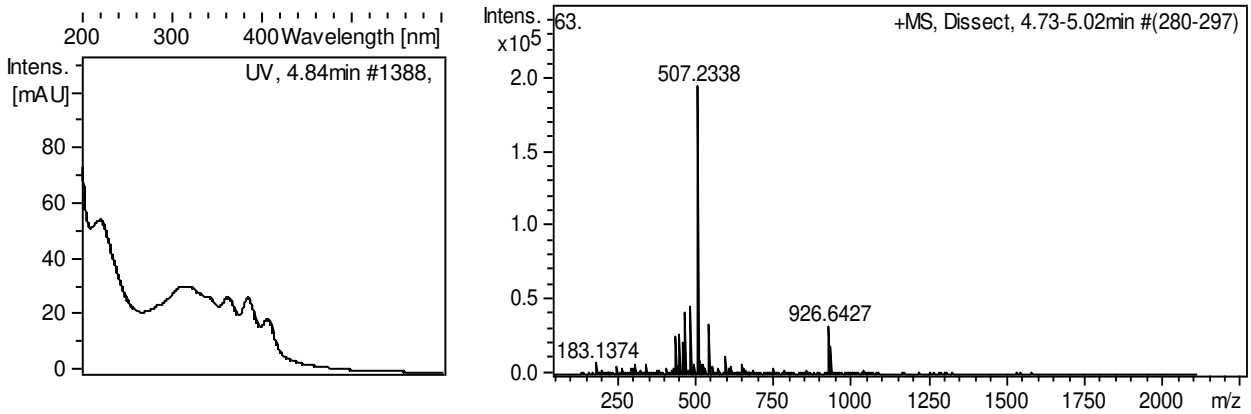
Fórmula molecular sugerida $C_{46}H_{77}N_9O_8$, posiblemente relacionada con el compuesto desreplicado como surugamide E.



Este componente corresponde a **surugamide E** ($C_{47}H_{79}N_9O_8$).

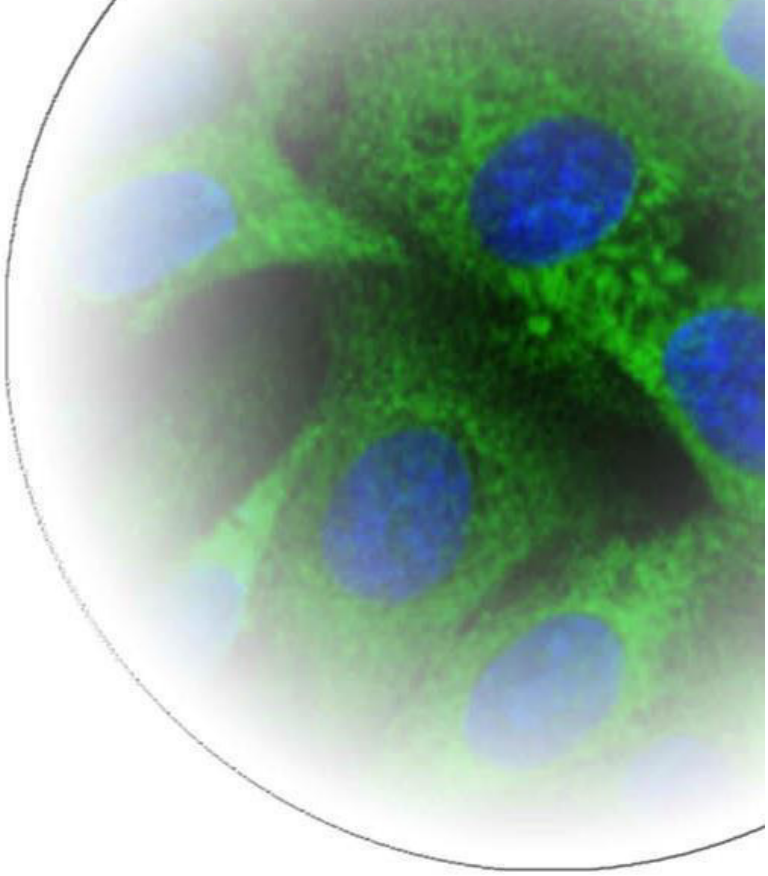


Este componente corresponde a surugamide A ($C_{48}H_{81}N_9O_8$).



En este pico se aprecian dos componentes; $C_{49}H_{83}N_9O_8$ relacionado con surugamide A y $C_{25}H_{34}N_2O_9$ relacionado con antimicina.

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
30-Mar-2015	Jesús Martín	Fernando Reyes



Fundación MEDINA

Discovering the Future

through Natural Diversity, Technology & Expertise

Resultados de desreplicación

Presupuesto: AT-0093

DRC-029 vs. DRC-031

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
1-Abr-2015	Jesús Martín	Fernando Reyes

Contenidos

MÉTODO 3
RESUMEN DE RESULTADOS 4
DRC-029 VS. DRC-31 5

MÉTODO

Las muestras recibidas se disolvieron en 100µL de MeOH y se analizaron en un HPLC Agilent 1200 Rapid Resolution conectado a un espectrómetro de masas maXis de Bruker. El volumen de muestra inyectado fue de 2µL. Para la separación se utilizó una columna Zorbax SB-C8 (2.1 x 30 mm, 3.5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: solvente A compuesto de agua:AcN 90:10 , solvente B agua:AcN 10:90, ambos a 13mM de formiato amónico y 0.01% de TFA.
La composición general del gradiente fue:

Tiempo (minutos)	**A**	**B**	**Flujo (mL/min)**
0.0	90	10	0.3
6.0	0	100	0.3
8.0	0	100	0.3
8.1	90	10	0.3
10.0	90	10	0.3

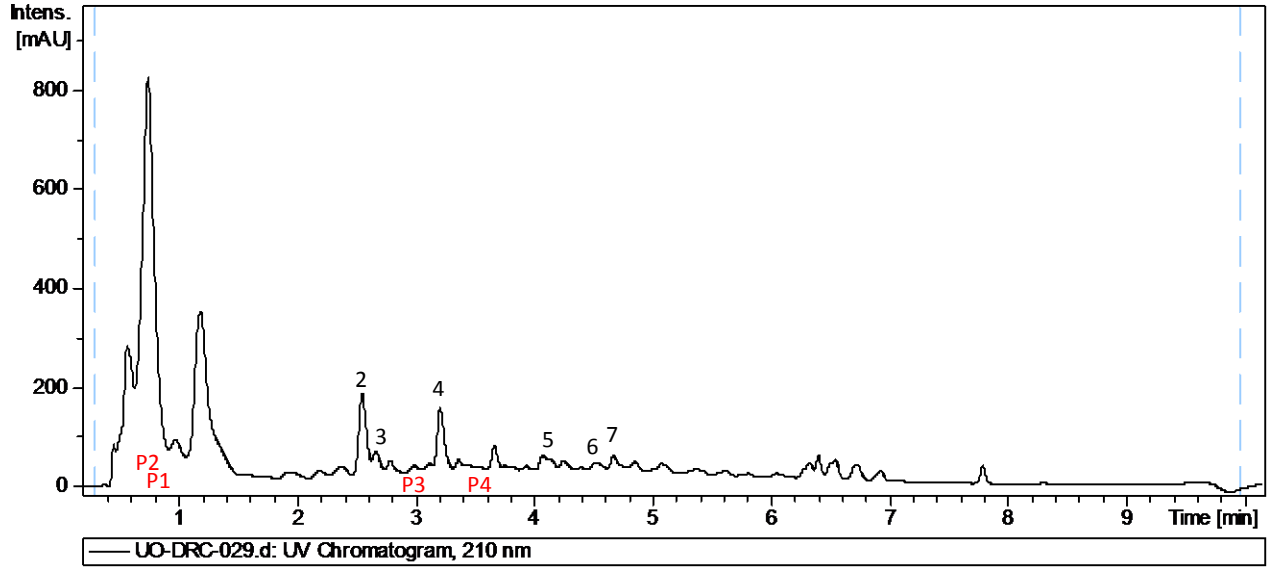
El espectrómetro de masas se ajustó en modo ESI (Ionización por ElectroeSpray) positivo, siendo los parámetros seleccionados: 4kV de voltaje de capilar, 11 l/min a 200ºC para el flujo de gas de secado y 2.8 bares de presión en el nebulizador.
La calibración del equipo antes de la inyección de muestras, se realizó utilizando el cluster de iones generado por el TFA en presencia de iones Na^+. Posteriormente, cada muestra inyectada se recalibró mediante la infusión del calibrante compuesto de TFA-Na antes de la aparición del frente cromatográfico. Cada una de las carreras cromatográficas se procesó utilizando el algoritmo interno de Bruker para la extracción de componentes, y los picos más intensos, tanto por TIC en positivo como por absorbancia a 210nm se consideraron para su interpretación de masas exacta y fórmula molecular.
La combinación del tiempo de retención y de la masa exacta se utilizó como criterio de búsqueda en la base de datos de espectrometría de masas de alta resolución de la Fundación MEDINA. En el supuesto de que se encuentre alguna coincidencia, este dato se reporta con el nombre del compuesto. Para aquellos componentes sin coincidencias en la base de datos mencionada se realizó una búsqueda de la masa exacta/fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales de Chapman & Hall. Si se encuentra una posible coincidencia, considerando la masas exacta/fórmula molecular, el organismo productor y el espectro UV, la molécula se etiquetó como componente sugerido.

RESUMEN DE RESULTADOS

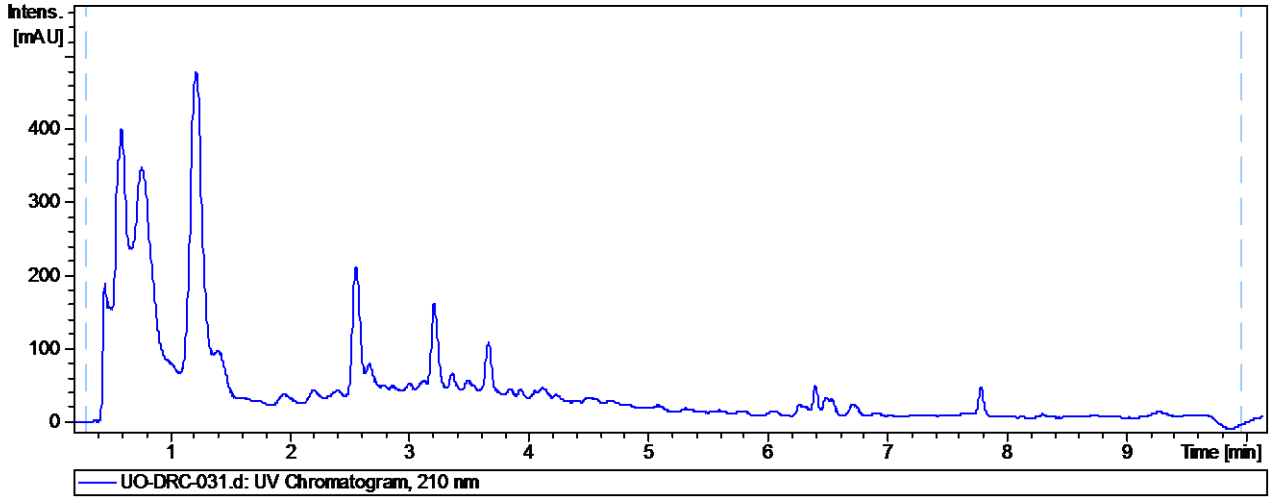
Muestra	Comentarios
DRC-029 vs. DRC-031	• P1 (7.855 minutos): posible presencia de **Christolane C** • P2 (9.449 minutos): posible dicetopiperazina **Cyclo(leucylseryl)** • P3 (19.655 minutos): fórmula molecular sugerida $\mathbf{C_{18}H_{30}NO_6S}$ no encontrada en el Diccionario de Productos Naturales • P4 (21.246 minutos): fórmula molecular sugerida $\mathbf{C_{26}H_{43}NO_6}$ no encontrada en el Diccionario de Productos Naturales • P5 (22.533 minutos): fórmula molecular sugerida $\mathbf{C_{13}H_{22}O_3}$, representada en DPN por furanonas cuyo espectro de UV no se relaciona con el experimental. • P6 (23.825 minutos): no se ha podido localizar en la muestra DRC-029 el espectro de masas solicitado

DRC-029 vs. DRC-31

A continuación se muestra el cromatograma de absorbancia a 210nm de la cepa salvaje DRC-029 con las etiquetas correspondientes a los picos se mejor se ajustan a los solicitados para su estudio.



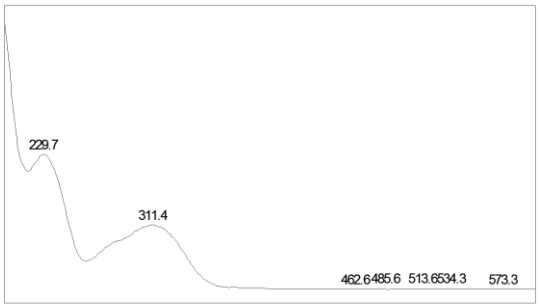
El siguiente cromatograma de absorbancia a 210nm corresponde a la muestra DRC-031:



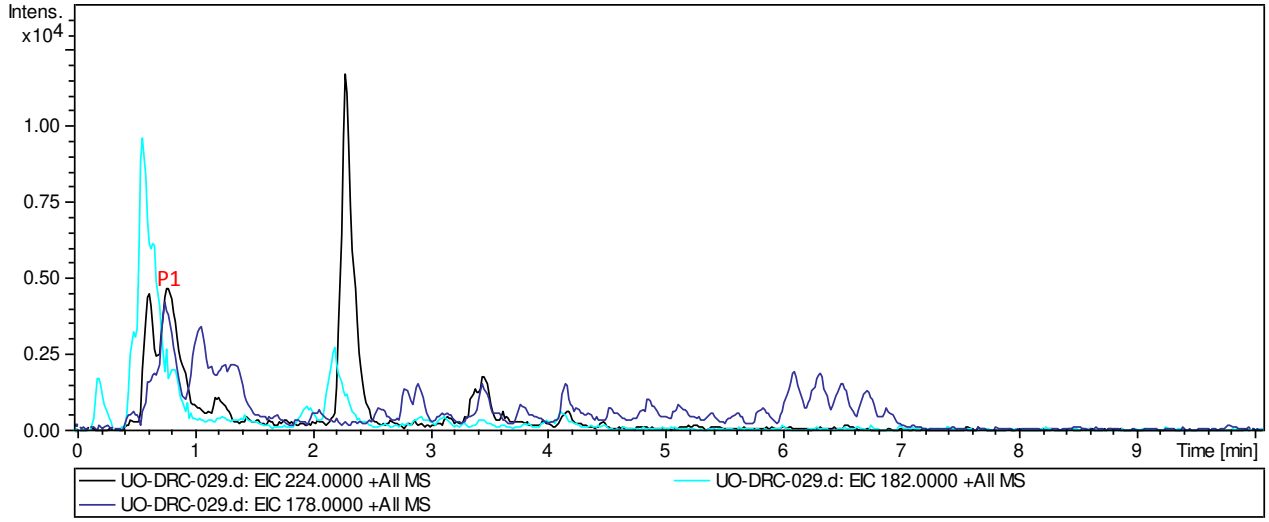
Estudio de picos diferenciales seleccionados en la muestra DRC-029:

Pico P1 (7.855 min)

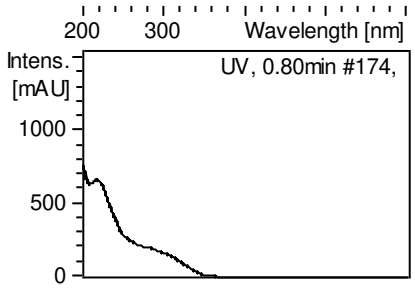
Los espectros solicitados son los siguientes:

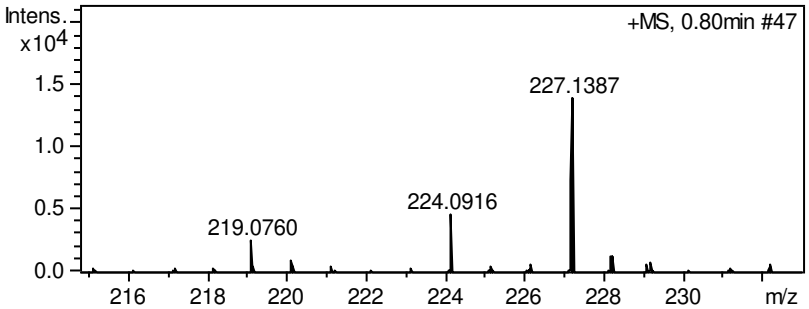


A continuación se muestra el cromatograma con los iones m/z=224, m/z=178 y m/z=182 extraídos.

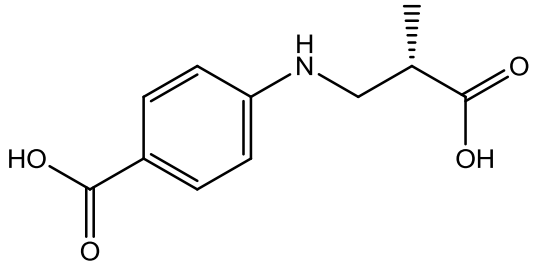


El pico de mayor similitud con el UV seleccionado es el que eluye a 0.80 minutos y presenta los siguientes espectros:



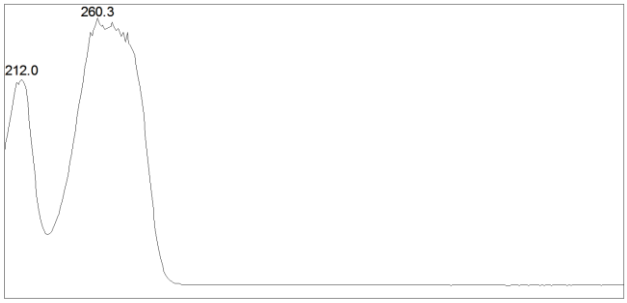


La fórmula molecular calculada para el ion m/z=224.0916 es $C_{11}H_{14}NO_4^+$. Considerando que este ion corresponde al aducto M+H+, la fórmula molecular $C_{11}H_{13}NO_4$ y el UV descrito puede relacionarse con **Christolane C** (4-[(2-Carboxypropyl)amino]benzoic acid)

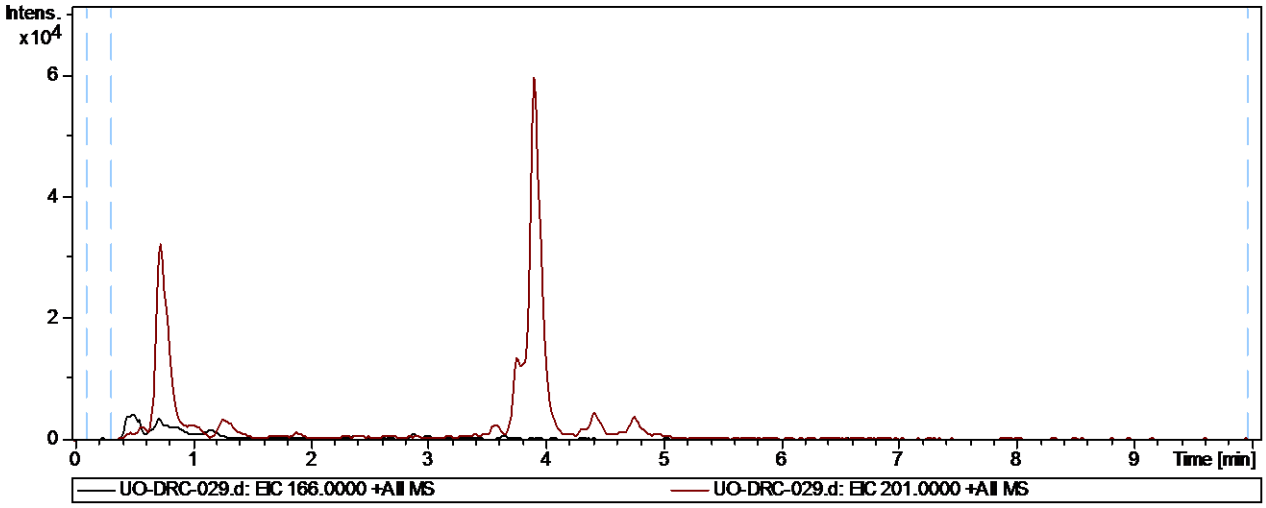


<u>Pico P2 (9.449 min)</u>

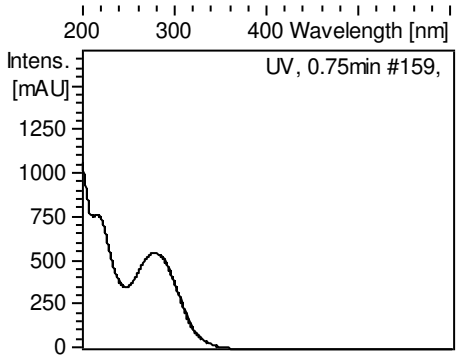
Los espectros solicitados son los siguientes:

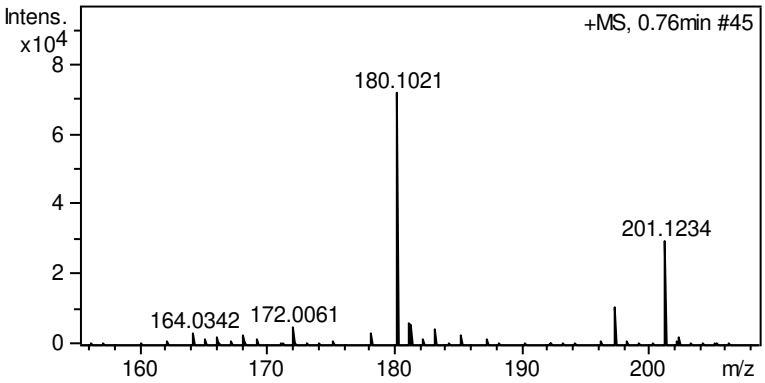


A continuación se muestra el cromatograma con los iones m/z=166 y m/z=201 extraídos.



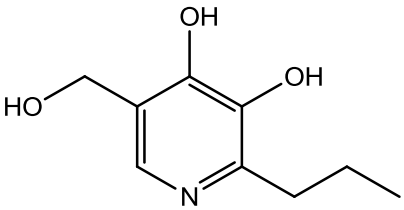
En el cromatograma de extracción de iones obtenido, de los dos máximos que se observan para el ion m/z=201, el que presenta el espectro de UV similar al solicitado corresponde al que eluye a 0.75 minutos:

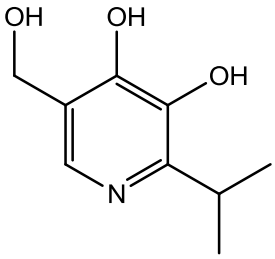




La fórmula molecular calculada para el ion m/z=201.1234 es $C_9H_{17}N_2O_3^+$, y asumiendo que este ion corresponde a M+H+, la fórmula molecular $C_9H_{16}N_2O_3$ no aparece en el DPN asociada a procariotas, si bien se encuentra como la dicetopiperazina **Cyclo(leucylseryl)**.

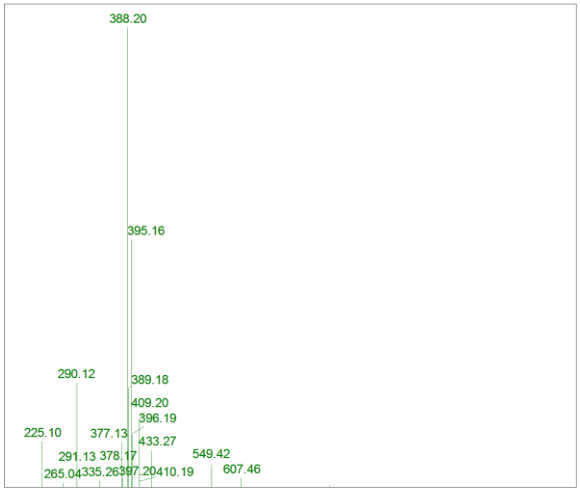
Si asumimos que el ion corresponde a M+NH4+, la fórmula molecular $C_9H_{13}NO_3$ se encuentra en el DPN como piridinas (3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-propylpyridine y 3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-isopropylpyridine)

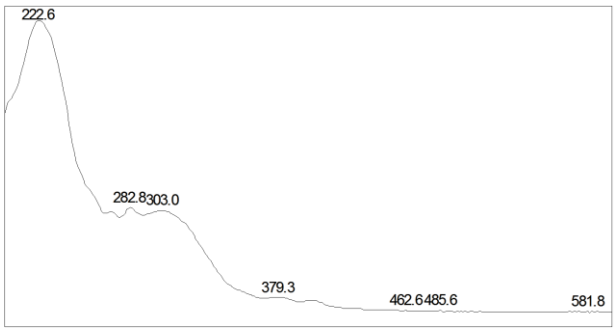




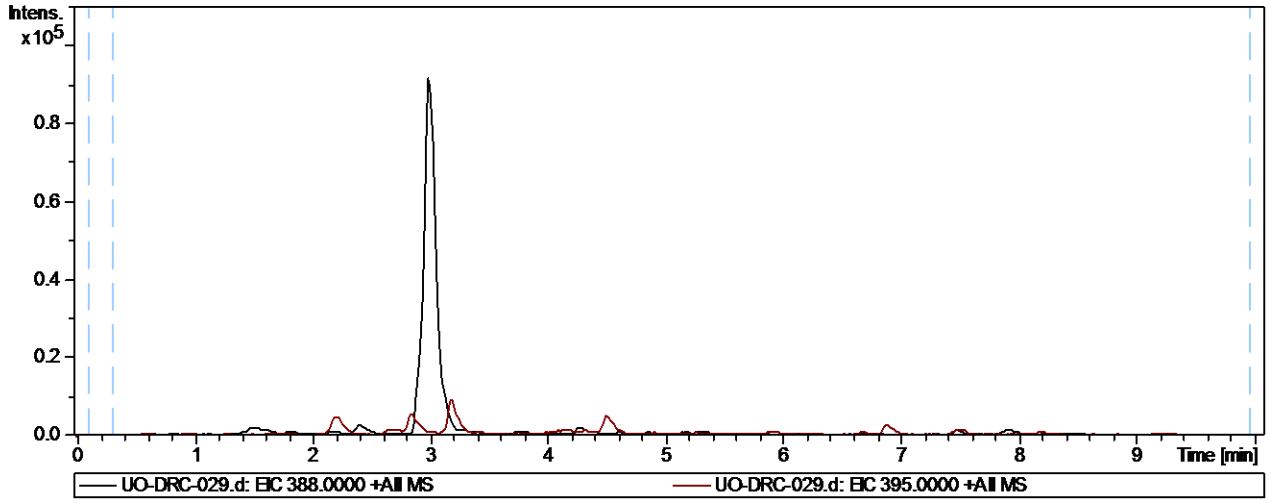
<u>Pico P3 (19.655 min)</u>

Los espectros solicitados son los siguientes:

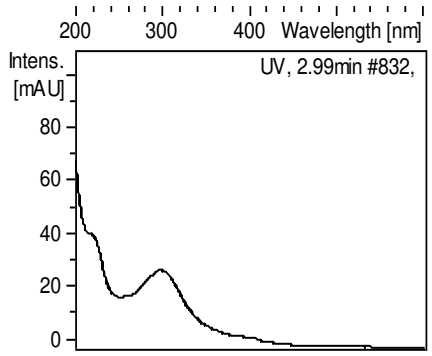


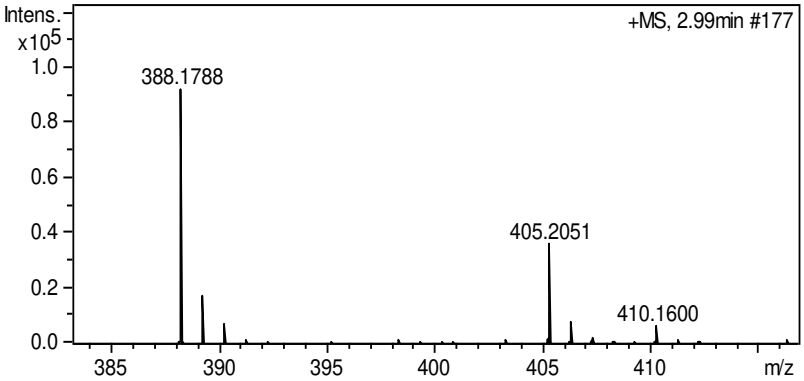


El siguiente cromatograma se obtiene al extraer los iones m/z=388 y m/z=395:



Para el máximo obtenido a 2.99 minutos los espectros de masas y UV son los siguientes:

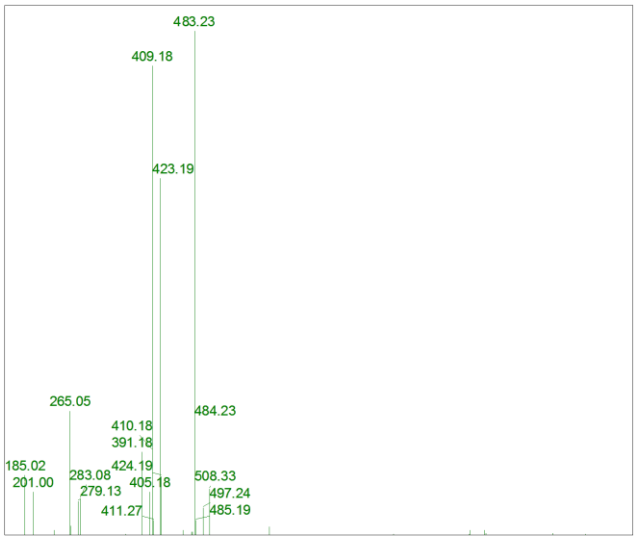


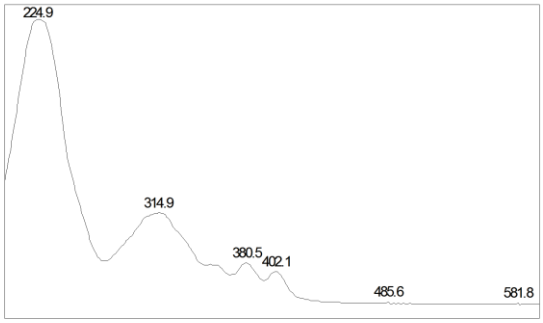


En este componente, el ion m/z=388.1788 se puede asociar al aducto $M+H^+$, ya que se observa el cluster $M+NH4^+$ (405.2051), $M+Na^+$ (405.2051) y el ya mencionado $M+H^+$. La fórmula molecular sugerida para el componente es $\mathbf{C_{18}H_{30}NO_6S}$, fórmula que no aparece descrita en DPN.

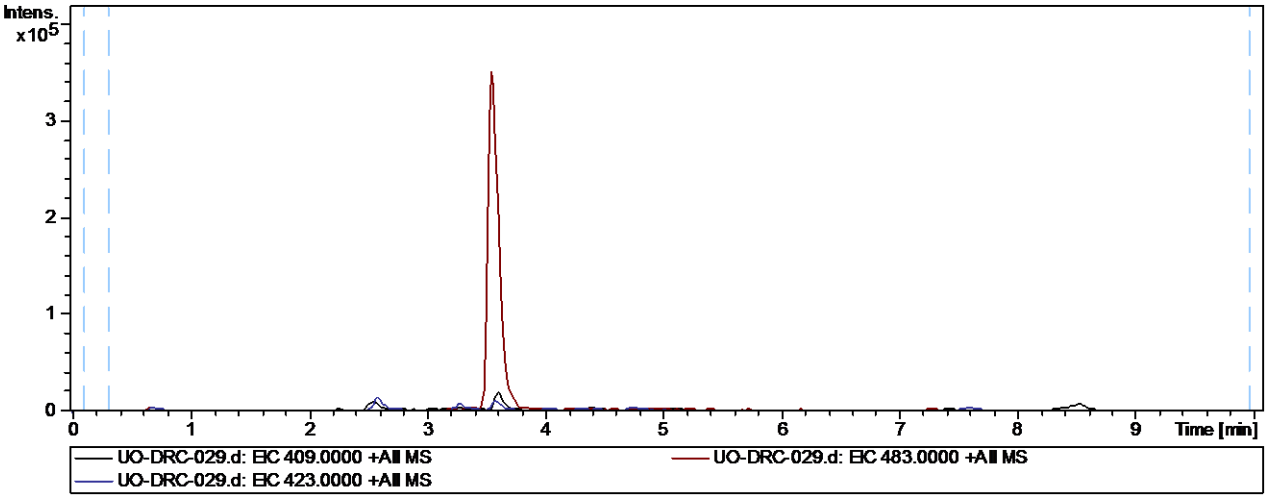
Pico P4 (21.246 min)

Los espectros solicitados son los siguientes:

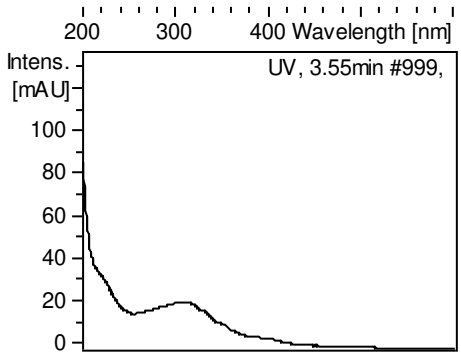


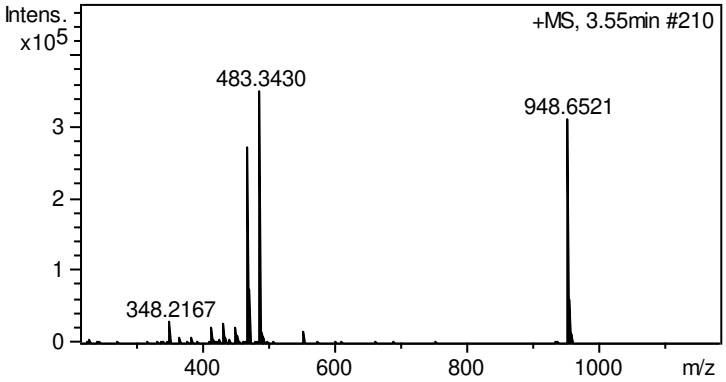


El siguiente cromatograma se obtiene al extraer los iones m/z=483, m/z=409 y m/z=423:



Con los siguientes espectros para el máximo obtenido en el ion m/z=483.

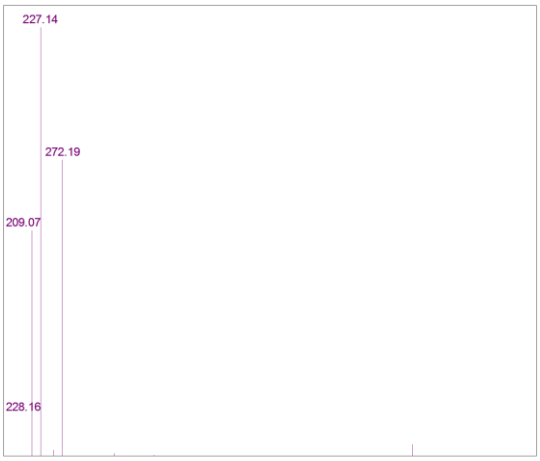


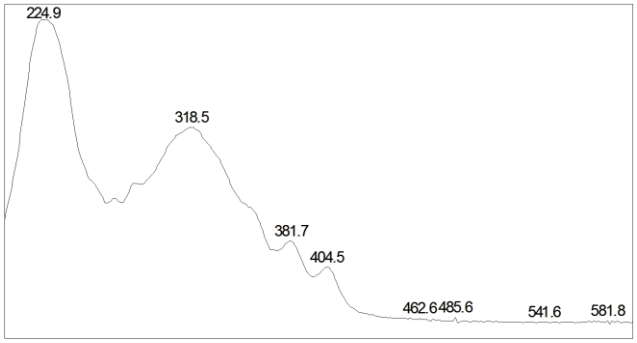


El ion m/z=483.3430 corresponde al aducto $M+NH_4^+$ del cluster obtenido para la fórmula molecular sugerida **$C_{26}H_{43}NO_6$**, que no se encuentra en el DPN producida por procariotas.

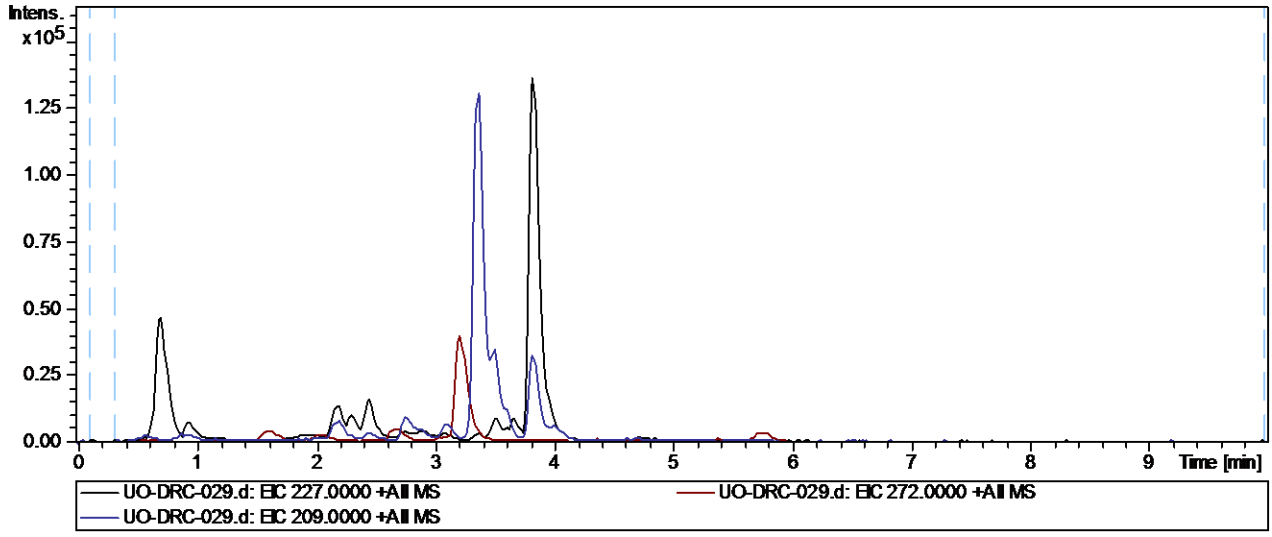
<u>Pico P5 (22.533 min)</u>

Espectros solicitados:

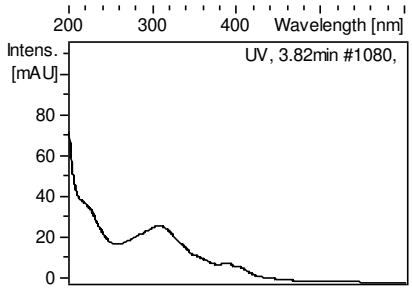


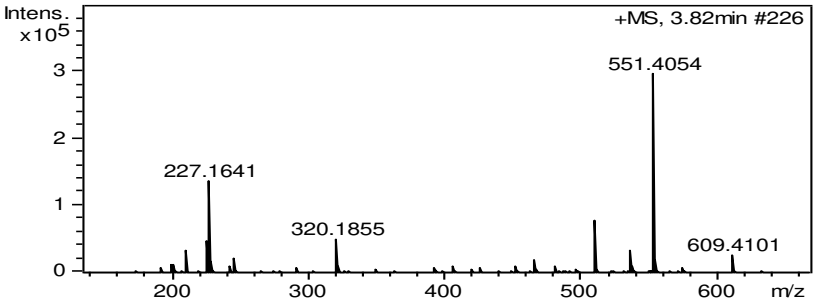


Cromatograma de iones m/z=227, m/z=272 y m/z=209 extraidos:



De los máximos que se observan para los distintos iones extraídos, el corresponde al tiempo de retención 3.82 minutos es el que presenta un espectro de UV similar al solicitado.



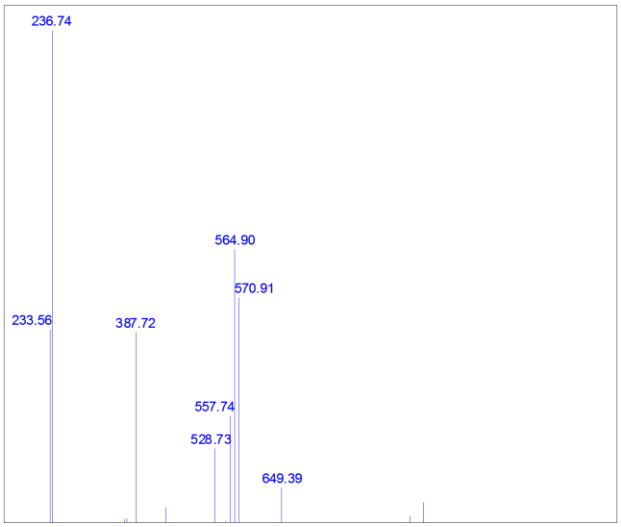


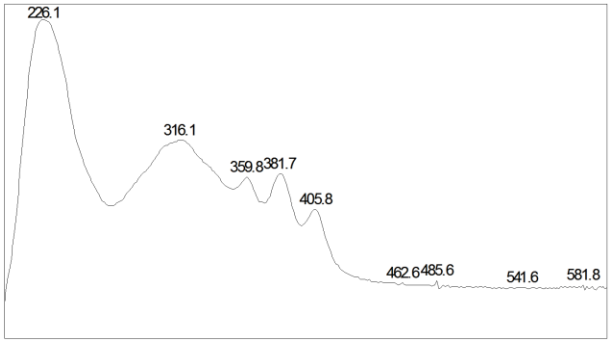
El ion m/z=227.1641 corresponde al aducto M+H+ del componente con fórmula molecular **$C_{13}H_{22}O_3$**.

En el DPN esta fórmula molecular aparece representada por compuestos tipo furanona, si bien, ninguno de ellos tiene descrito un espectro de UV similar al experimental.

Pico P6 (23.825 min)

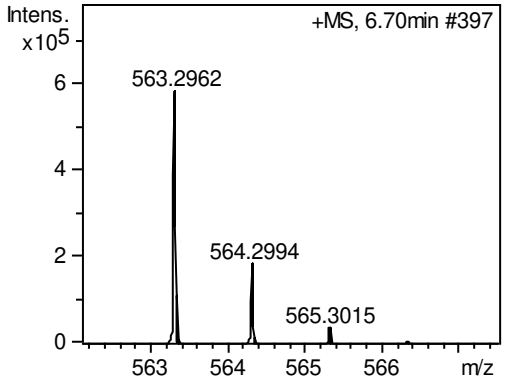
Espectros solicitados:

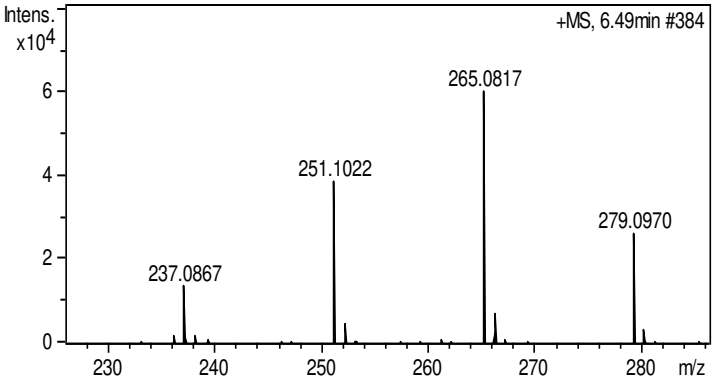




En el cromatograma de los iones m/z=565 y m/z=571 extraídos, los picos que aparecen corresponden a componentes en los que estos iones pertenecen a ^{13}C o ^{14}C.

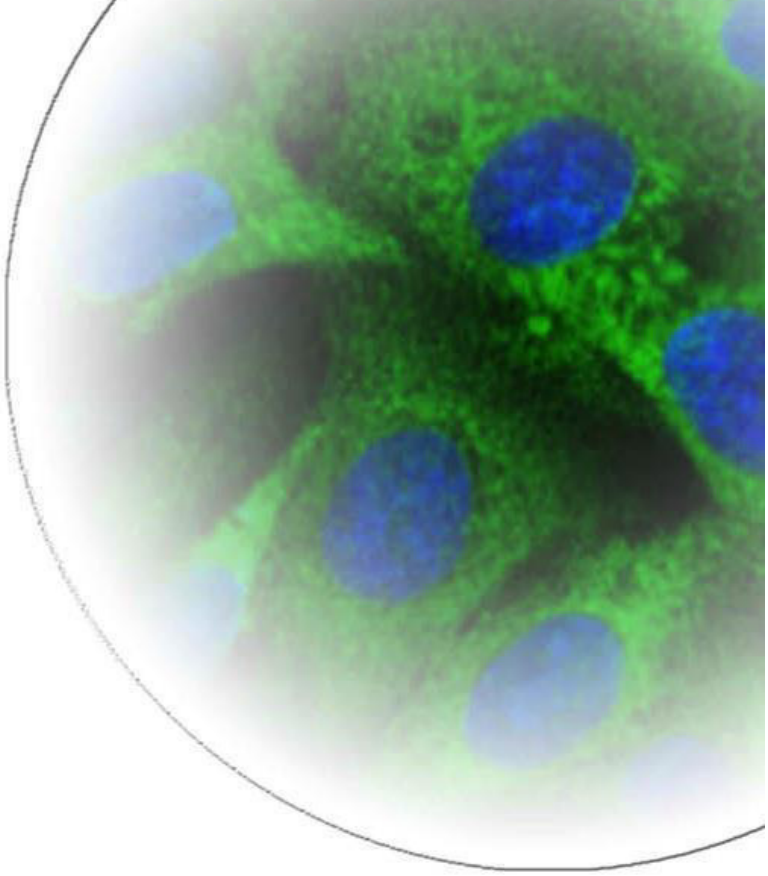
El cromatograma del ion extraido m/z=237, muestra una zona muy ancha en la que aparece el ion m/z=237.0867, cuyo valor está fuera del margen de error observado en los casos anteriores.





En conclusión, no se ha podido localizar el espectro de masas solicitado.

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
1-Abr-2015	Jesús Martín	Fernando Reyes



Fundación MEDINA

Discovering the Future

through Natural Diversity, Technology & Expertise

Resultados de desreplicación

Presupuesto: INV-FEDER-2016/06

DRC-051 vs. DRC-052

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
24-abr-2017	Jesús Martín	Fernando Reyes

Contenidos

Método 3
Resumen de resultados 4
DRC-051 vs. DRC-052 5

MÉTODO

Las muestras recibidas se disolvieron en 100µL de MeOH y se analizaron en un HPLC Agilent 1200 Rapid Resolution conectado a un espectrómetro de masas maXis de Bruker. El volumen de muestra inyectado fue de 2µL. Para la separación se utilizó una columna Waters Atlantis T3 (4.6 x 100 mm, 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: solvente A, compuesto de agua:AcN 90:10; solvente B, agua:AcN 10:90, ambos a 13mM de formiato amónico y 0.01% de TFA.
La composición general del gradiente fue:

Tiempo (minutos)	A	B	Flujo (mL/min)
0.0	100	0	0.5
12.0	0	100	0.5
16.0	0	100	0.5
16.1	100	0	0.5
20.0	100	0	0.5

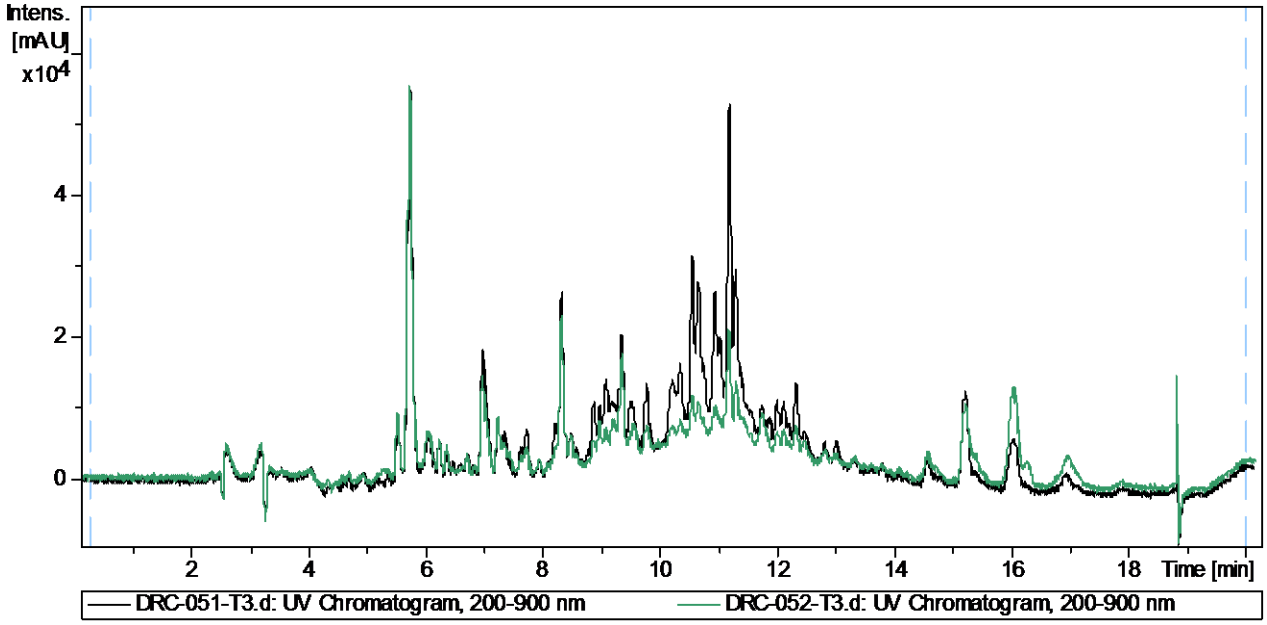
El espectrómetro de masas se ajustó en modo ESI (Ionización por ElectroSpray) positivo, siendo los parámetros seleccionados: 4kV de voltaje de capilar, 11 l/min a 200ºC para el flujo de gas de secado y 2.8 bares de presión en el nebulizador.
La calibración del equipo antes de la inyección de muestras, se realizó utilizando el cluster de iones generado por el TFA en presencia de iones Na^+. Posteriormente, cada muestra inyectada se recalibró mediante la infusión del calibrante compuesto de TFA-Na antes de la aparición del frente cromatográfico. Cada una de las carreras cromatográficas se procesó utilizando el algoritmo interno de Bruker para la extracción de componentes, y los picos más intensos, tanto por TIC en positivo como por absorbancia a 210nm se consideraron para su interpretación de masas exacta y fórmula molecular.
La búsqueda de la masa exacta/fórmula molecular se realizó en el Diccionario de Productos Naturales de Chapman & Hall. En el caso de que se encuentre una posible coincidencia, considerando la masa exacta/fórmula molecular, el organismo productor y el espectro UV, la molécula se etiqueta como componente sugerido.

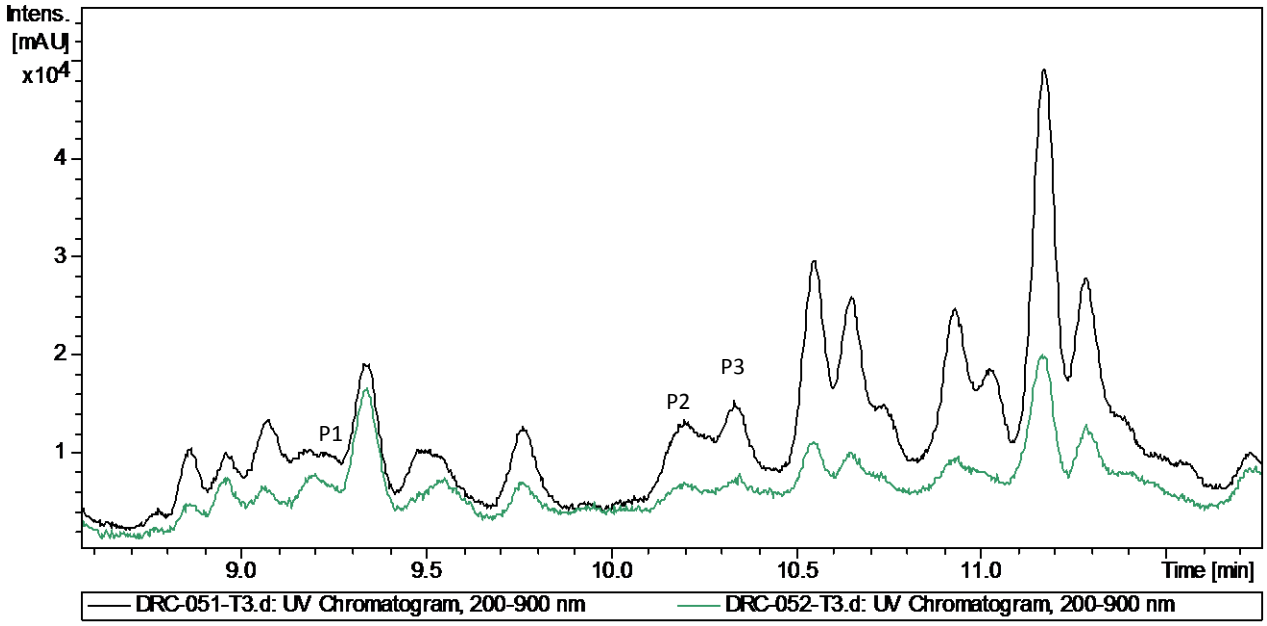
RESUMEN DE RESULTADOS

Muestra	Comentarios
DRC-051 vs. DRC-052	Los componentes diferenciales analizados han sido: • **$C_{23}H_{32}N_2O_9$** – Sin coincidencias en el DPN. Relacionado con antimicinas. • **$C_{26}H_{35}NO_5$** y **$C_{26}H_{37}NO_5$** – Sin coincidencias en el DPN para procariotas. Relacionados con oxopolienos.

DRC-051 vs. DRC-052

A continuación, se muestran los cromatogramas de absorbancia en el rango 200-900nm para las muestras DRC-051 y DRC-052:

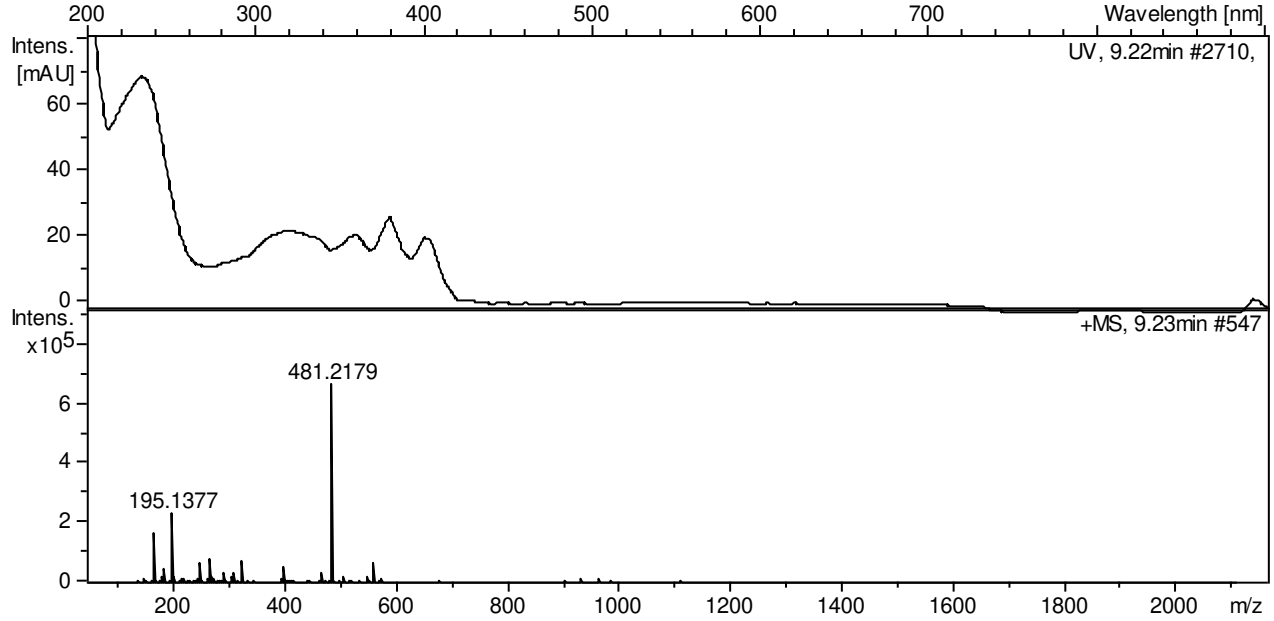




Sobre la traza de la muestra DRC-051 se han etiquetado los picos seleccionados para su estudio.

P1

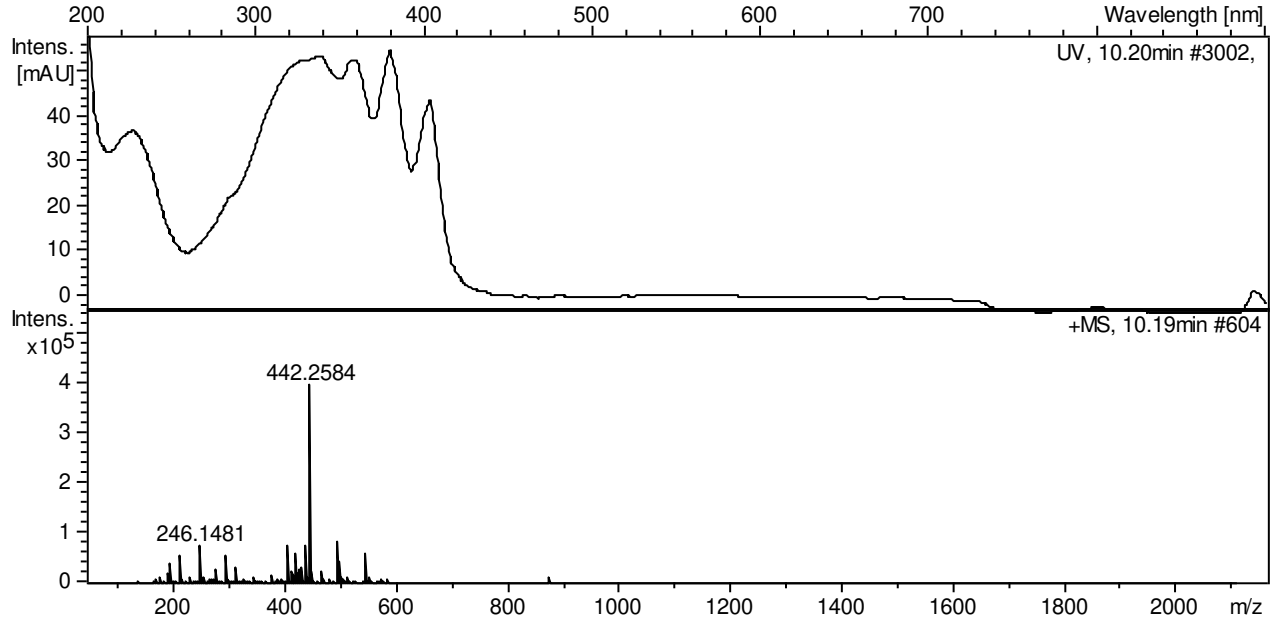
Los espectros del componente asociado al pico P1 son:



Fórmula molecular sugerida: $\mathbf{C_{23}H_{32}N_2O_9}$. Sin coincidencias en el DPN.

El espectro de UV está contaminado por polienos y es por ello que hay que ignorar los máximos a 360, 380 y 400nm. Considerando así el espectro de UV y la fórmula molecular es muy probable que este componente esté relacionado con antimicinas, compuestos que se detectan en gran número en esta muestra.

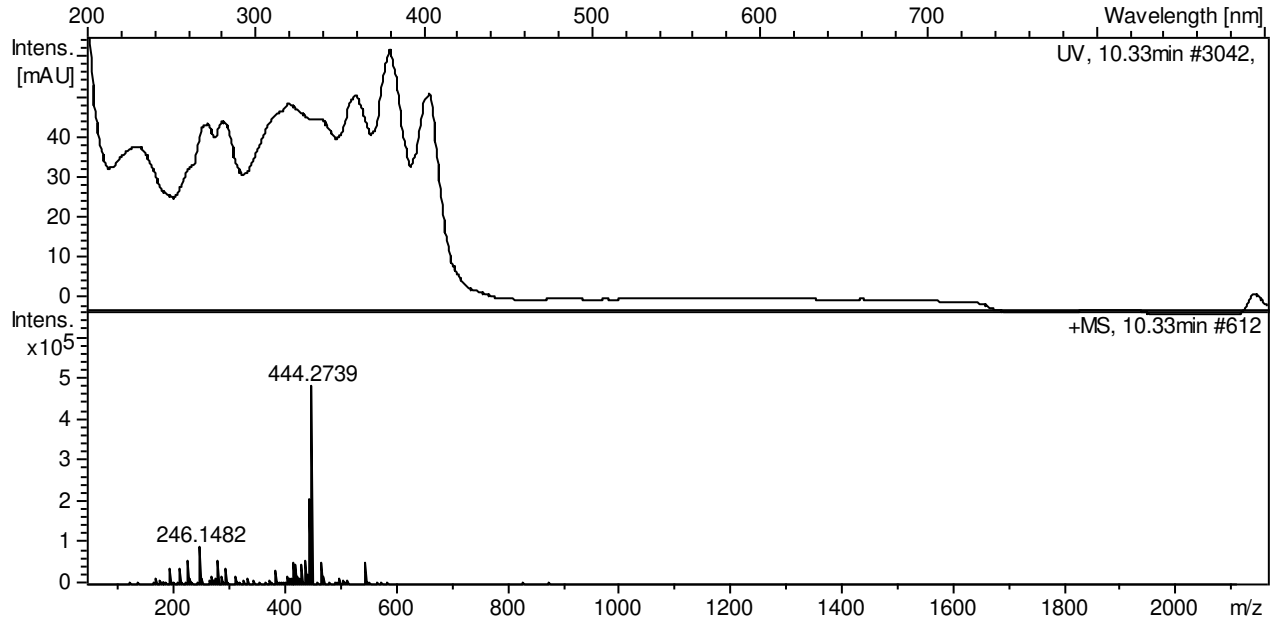
P2



Fórmula molecular sugerida: $\mathbf{C_{26}H_{35}NO_5}$. Sin coincidencias en el DPN para procariotas.

Considerando la fórmula molecular y el espectro de UV (ignorando la contaminación por polienos), es muy probable que este componente sea un oxopolieno.

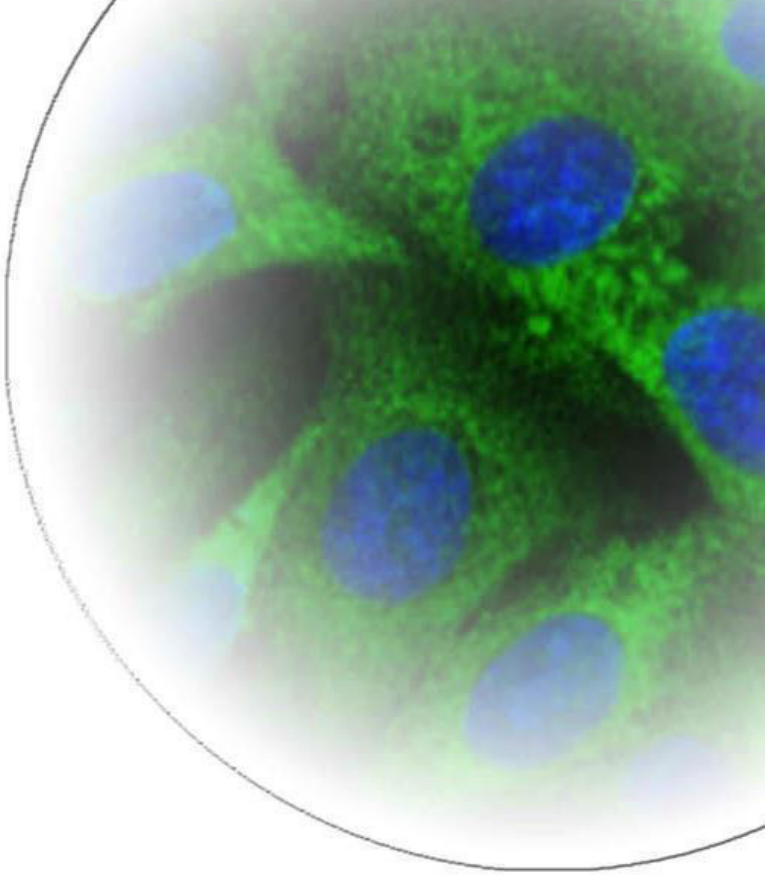
P3



Fórmula molecular sugerida: **$C_{26}H_{37}NO_5$**. Sin coincidencias en el DPN para procariotas.

Componente relacionado con el analizado en el pico P2, pero con el espectro de UV muy contaminado. Posiblemente también sea un oxopolieno.

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
24-abr-2017	Jesús Martín	Fernando Reyes



Fundación MEDINA

Discovering the Future

through Natural Diversity, Technology & Expertise

Resultados de desreplicación

Presupuesto: INV-FEDER-2016/06

DRC-060
DRC-061
DRC-062
DRC-063

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
11-jun-2018	Jesús Martín	Fernando Reyes

Contenidos

Método 3
Resumen de resultados 4
DRC-060 vs DRC-061 6
DRC-060 9
DRC-061 13
DRC-062 vs DRC-063 28
DRC-062 31
DRC-063 37

MÉTODO

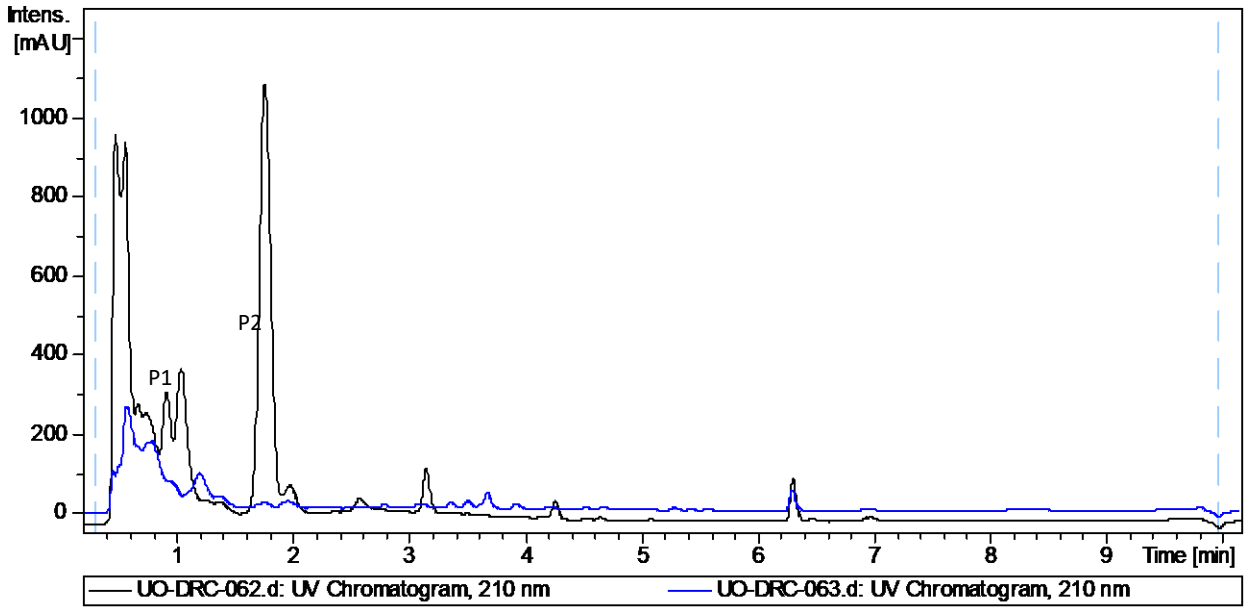
Las muestras recibidas se disolvieron en 100µL de MeOH y se analizaron en un HPLC Agilent 1200 Rapid Resolution conectado a un espectrómetro de masas maXis de Bruker. El volumen de muestra inyectado fue de 2µL. Para la separación se utilizó una columna Zorbax SB-C8 (2.1 x 30 mm, 3.5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: solvente A compuesto de agua:AcN 90:10 , solvente B agua:AcN 10:90, ambos a 13mM de formiato amónico y 0.01% de TFA.
La composición general del gradiente fue:

Tiempo (minutos)	**A**	**B**	**Flujo (mL/min)**
0.0	90	10	0.3
6.0	0	100	0.3
8.0	0	100	0.3
8.1	90	10	0.3
10.0	90	10	0.3

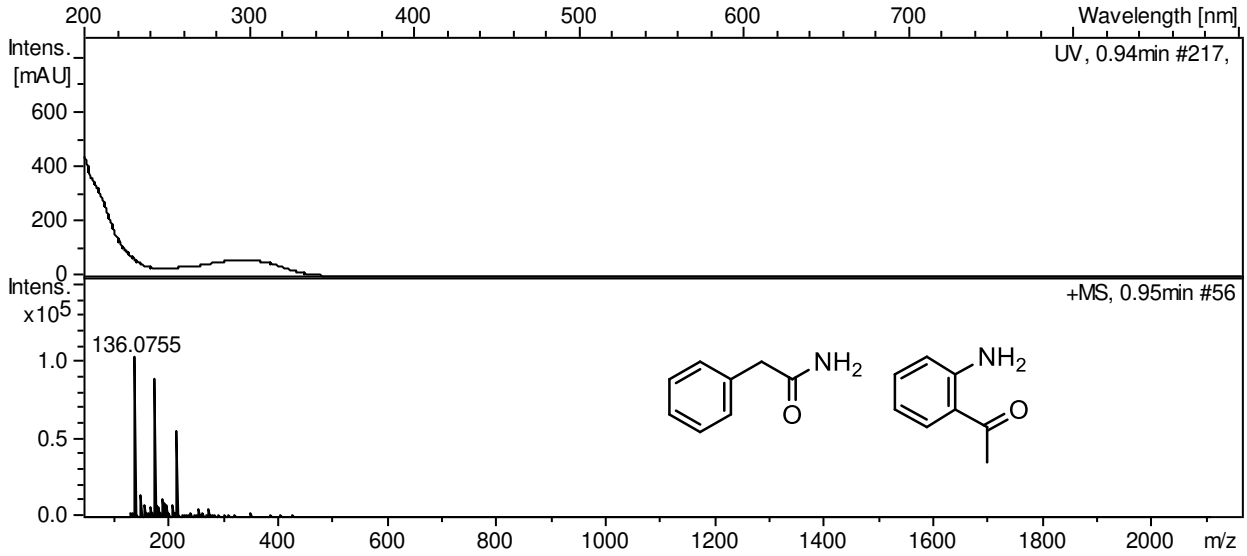
El espectrómetro de masas se ajustó en modo ESI (Ionización por ElectroSpray) positivo, siendo los parámetros seleccionados: 4kV de voltaje de capilar, 11 l/min a 200ºC para el flujo de gas de secado y 2.8 bares de presión en el nebulizador.
La calibración del equipo antes de la inyección de muestras se realizó utilizando el cluster de iones generado por el TFA en presencia de iones Na^+. Posteriormente, cada muestra inyectada se recalibró mediante la infusión del calibrante compuesto de TFA-Na antes de la aparición del frente cromatográfico. Cada una de las carreras cromatográficas se procesó utilizando el algoritmo interno de Bruker para la extracción de componentes, y los picos más intensos, tanto por TIC en positivo como por absorbancia a 210nm se consideraron para su interpretación de masas exacta y fórmula molecular.
La combinación del tiempo de retención y de la masa exacta se utilizó como criterio de búsqueda en la base de datos de espectrometría de masas de alta resolución de la Fundación MEDINA. En el supuesto de que se encuentre alguna coincidencia, este dato se reporta con el nombre del compuesto. Para aquellos componentes sin coincidencias en la base de datos mencionada se realizó una búsqueda de la masa exacta/fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales de Chapman & Hall. Si se encuentra una posible coincidencia, considerando la masa exacta/fórmula molecular, el organismo productor y el espectro UV, la molécula se etiquetó como componente sugerido.

DRC-062 vs DRC-063

A continuación, se muestran los cromatogramas de absorbancia a 210nm de las muestras:



P1

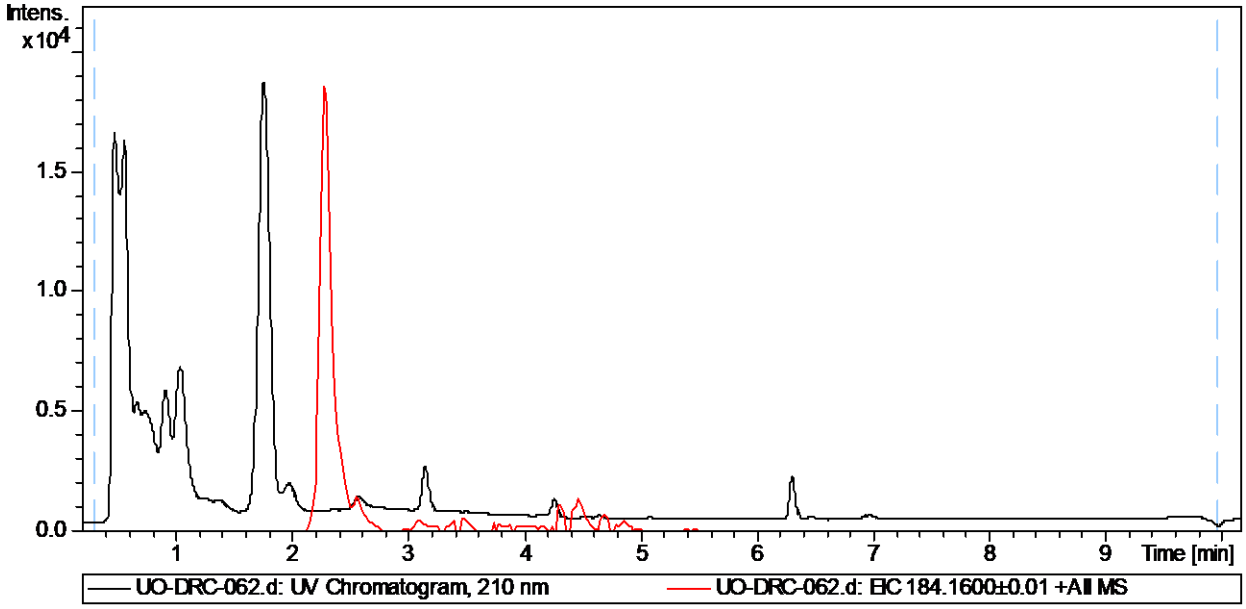


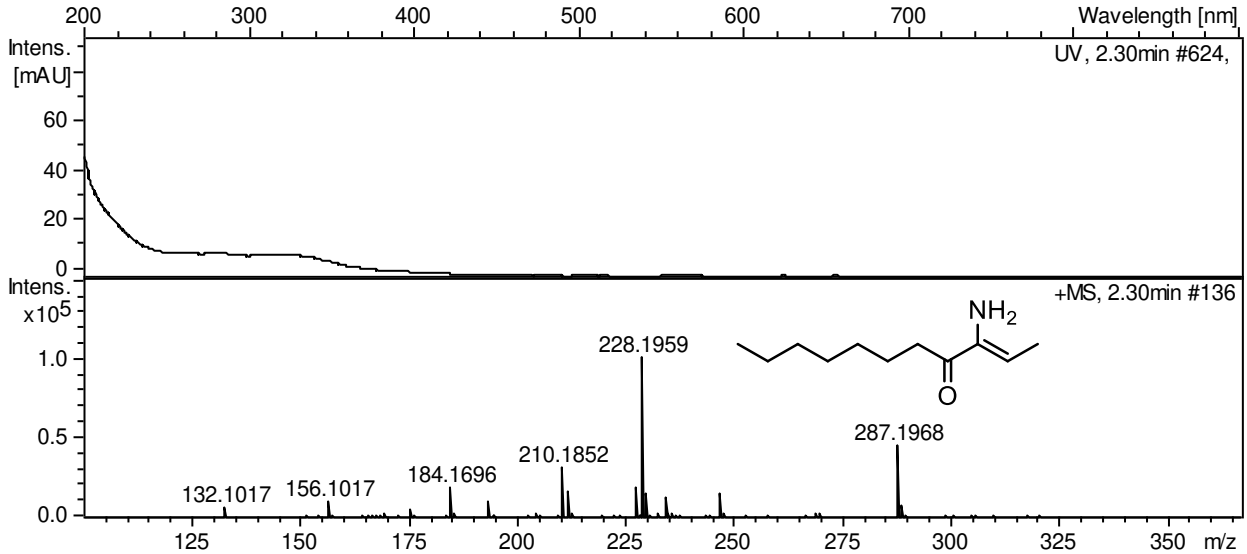
Fórmula molecular sugerida: C_8H_9NO. Coincidencia en el Diccionario de Productos Naturales con **Phenylacetamide** y **2'-Aminoacetophenone**.

P2

El pico P2 solicitado con m/z=184.16, aparece en el cromatograma en una zona sin absorbancia UV, con lo que es posible que el componente no corresponda con el de interés.

A continuación, se muestra el espectro UV y el ion 184.16 extraído en la muestra DRC-062:

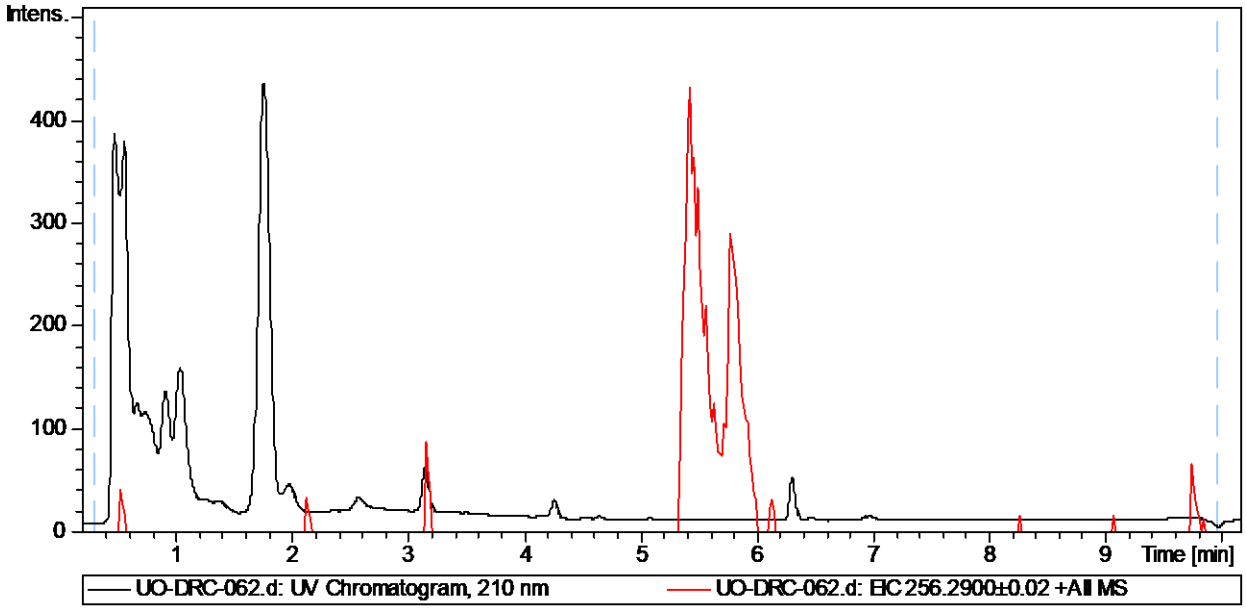




Fórmula molecular sugerida: $C_{11}H_{21}NO$. Coincidencia de fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales únicamente con **3-Amino-2-undecen-4-one** para procariotas.

P3

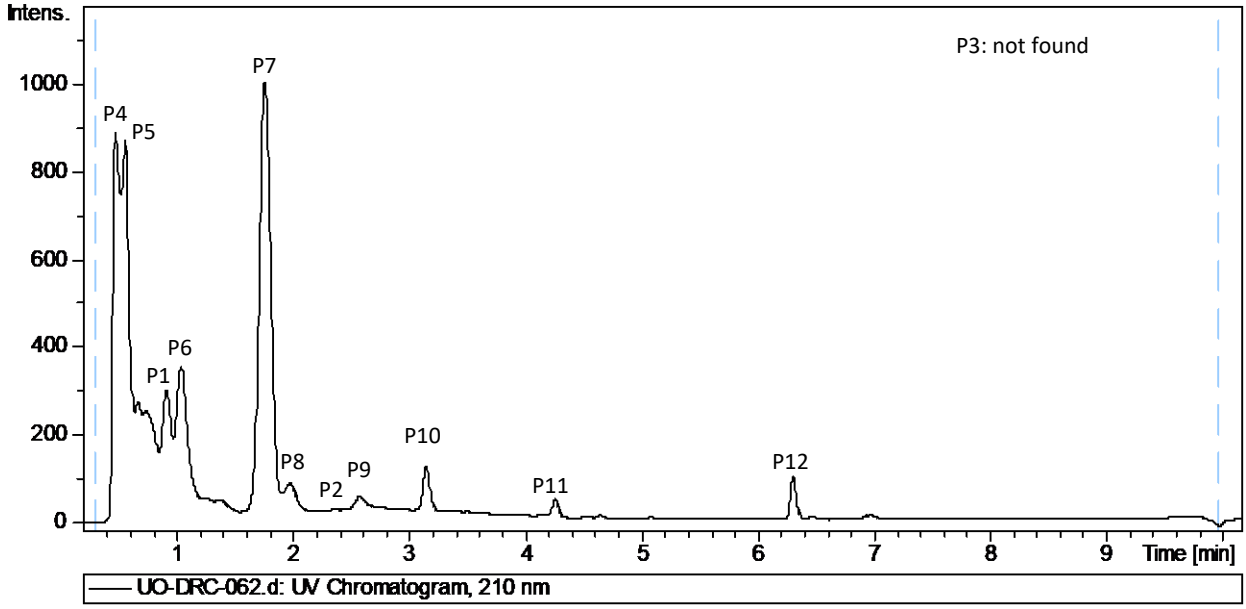
El componente P3 no se localiza en la muestra procesada en MEDINA. En el siguiente cromatograma del ion m/z=256.29 extraído, se aprecia cómo este no maximiza en ningún punto.



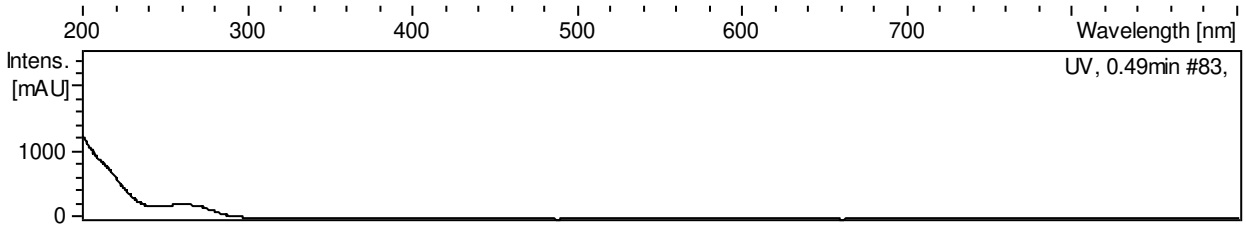
Considerando el cromatograma suministrado, el pico P3 debería corresponder con el pico que eluye a 1.82 minutos, sin embargo, este pico no presenta ionización ESI(+) y puede ser este el motivo por el que no se localiza el ion solicitado.

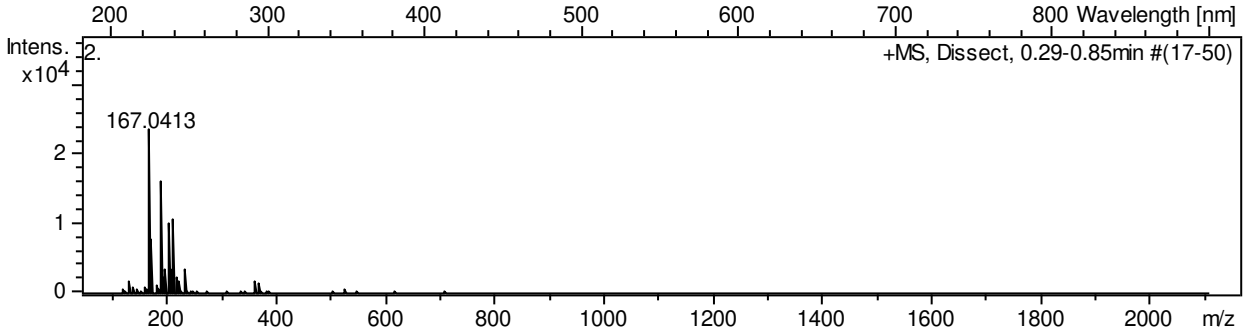
DRC-062

A continuación, se muestra el cromatograma de absorbancia a 210nm de la muestra:



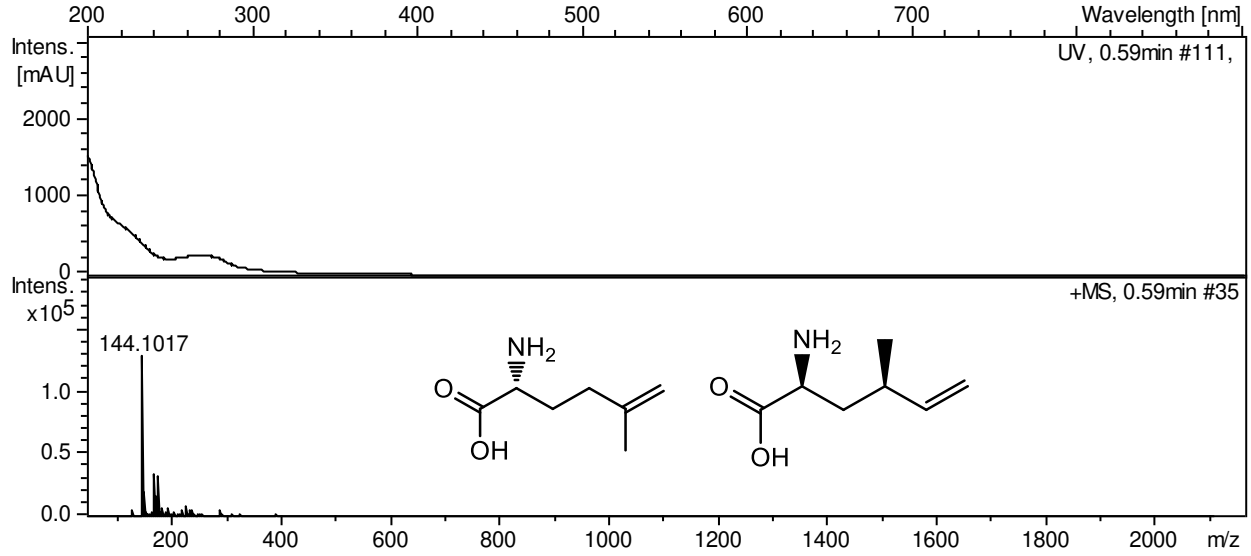
P4





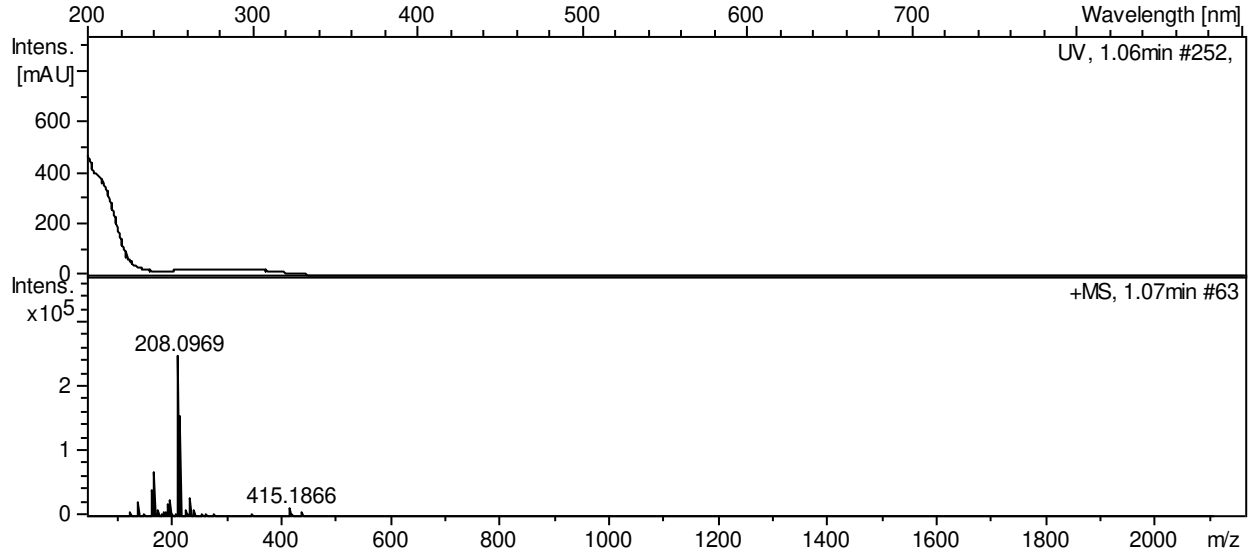
Fórmula molecular sugerida: **$C_4H_8NO_6$**. Sin coincidencias en el DPN.

P5

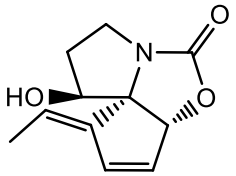
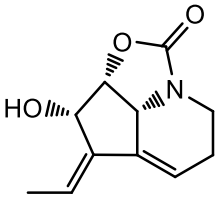
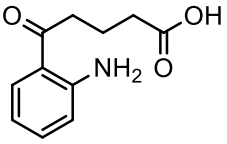
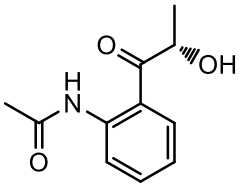
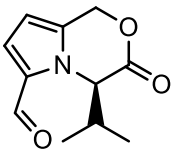


Fórmula molecular sugerida: $C_7H_{13}NO_2$. Coincidencia en el DPN con **2-Amino-5-methyl-5-hexenoic acid** y **2-Amino-4-methyl-5-hexenoic acid**.

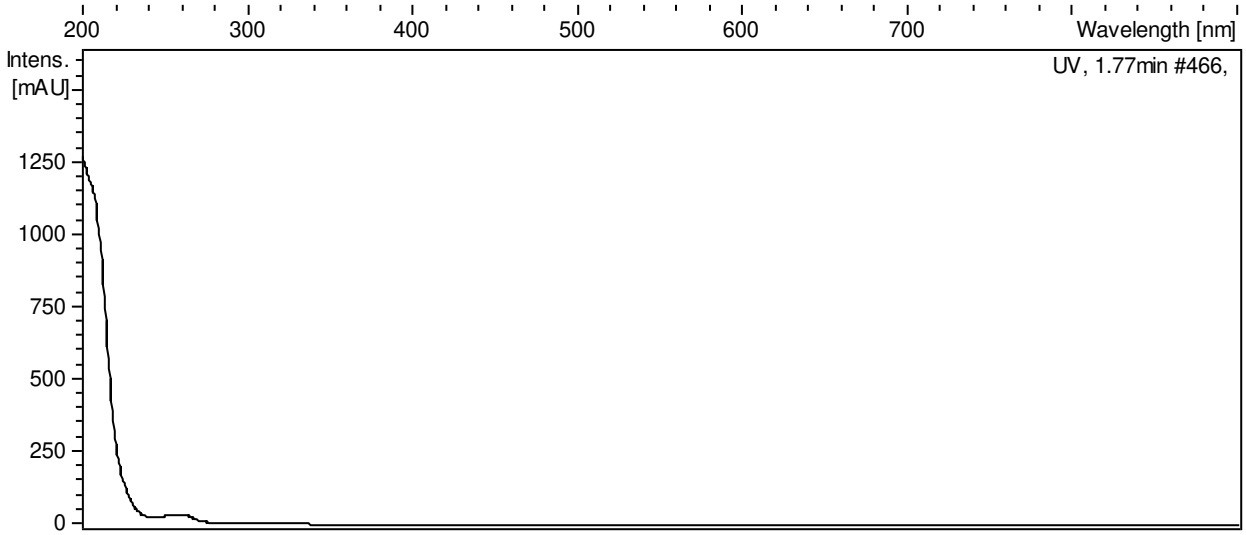
P6



Fórmula molecular sugerida: **$C_{11}H_{13}NO_3$**. Cinco coincidencias en el DPN:

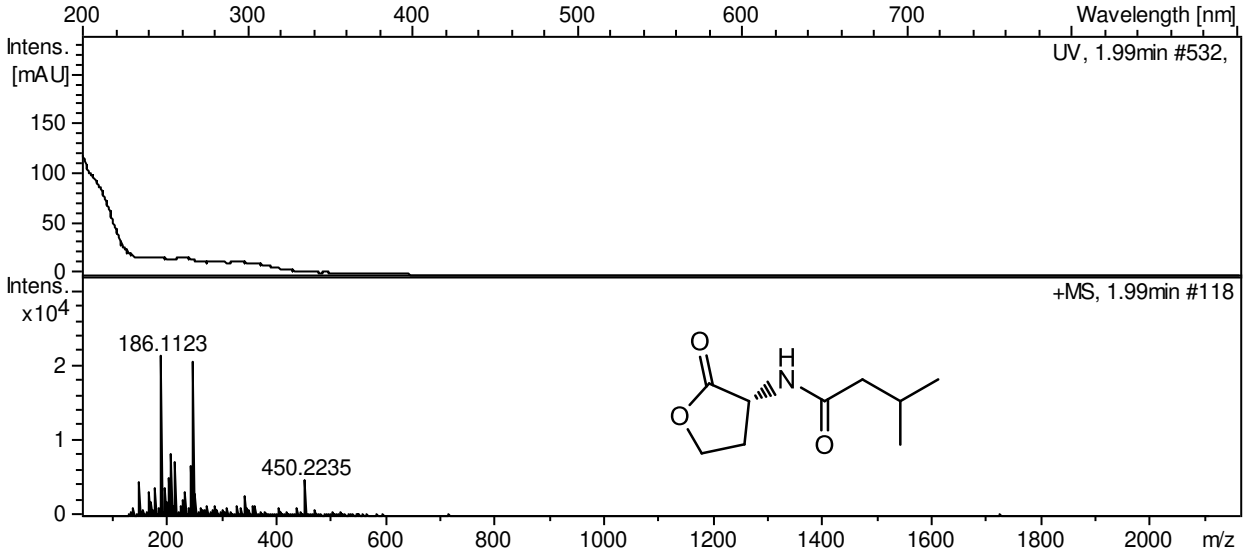
Isostreptazolin 	Streptazolin 
Ovalic acid 	1-(2-Acetamidophenyl)-2-hydroxy-1-propanone 
1,4-Dihydro-4-isopropyl-3-oxo-3H-pyrrolo[2,1-c][1,4]oxazine-6-carboxaldehyde 	

P7



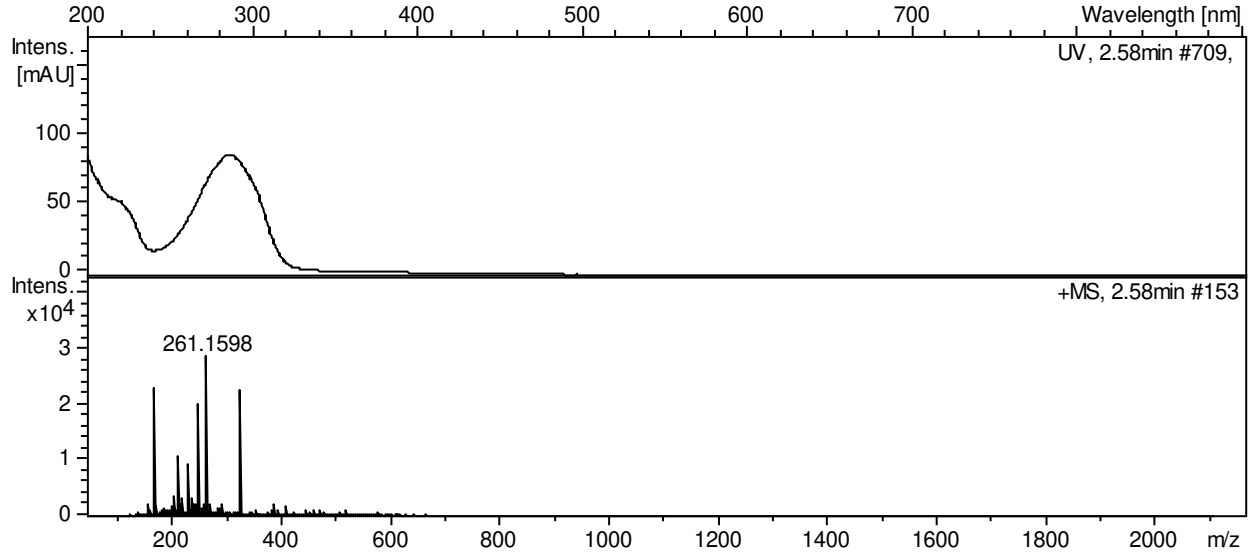
Pico UV sin ionización ESI(+). No es posible determinar la fórmula molecular.

P8



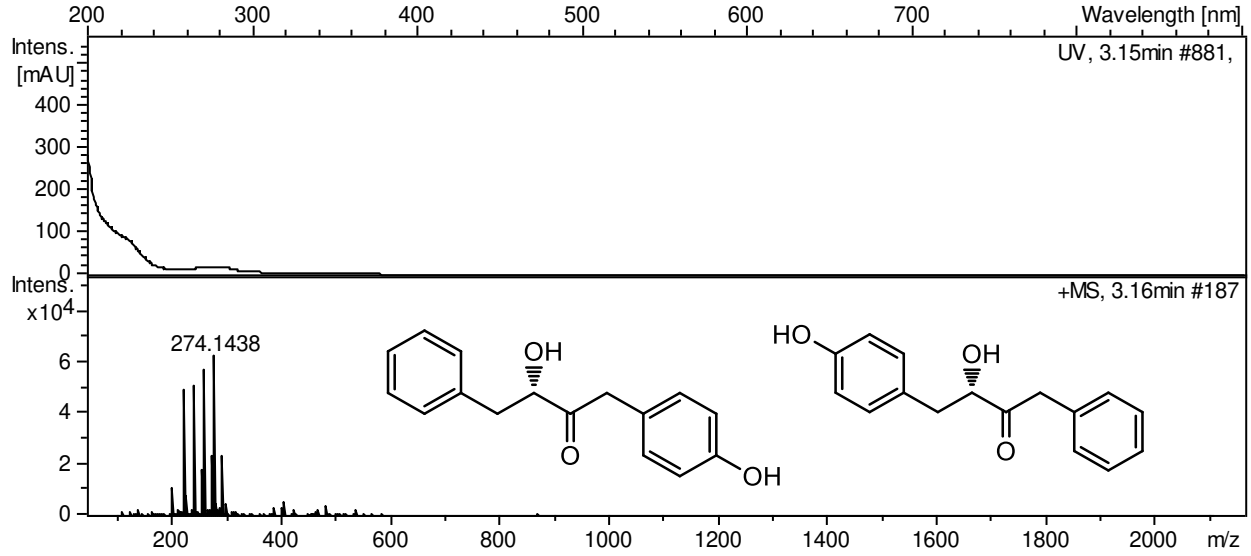
Fórmula molecular sugerida: $C_9H_{15}NO_3$. Coincidencia en el DPN con **N-(3-Methylbutanoyl)**

P9



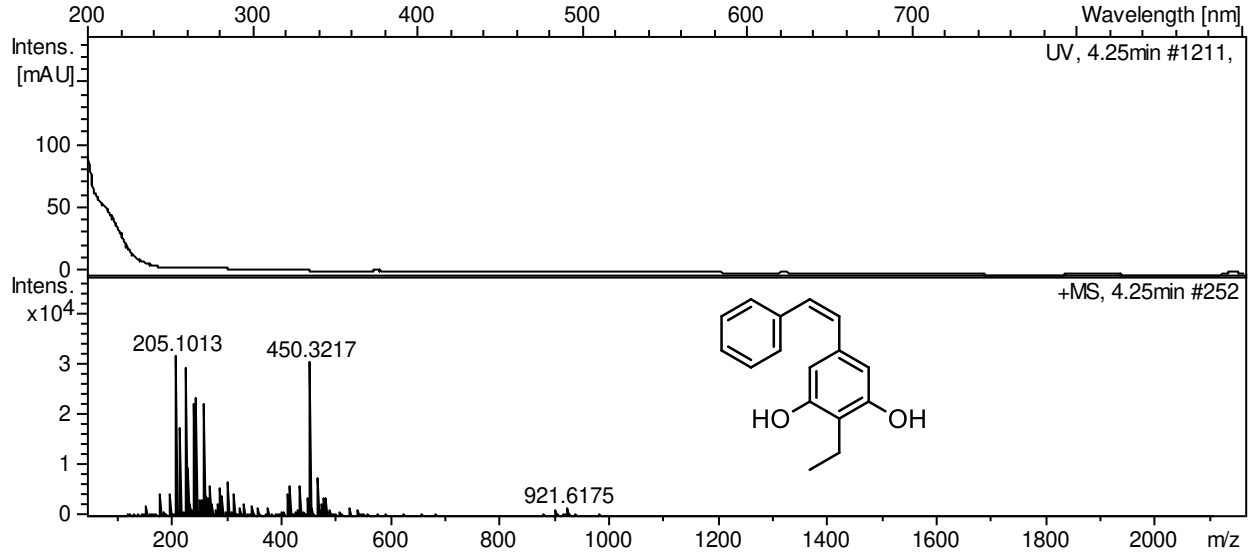
Fórmula molecular sugerida: **$C_{17}H_{24}N_2O_4$**. Sin coincidencias en el DPN para procariotas.

P10



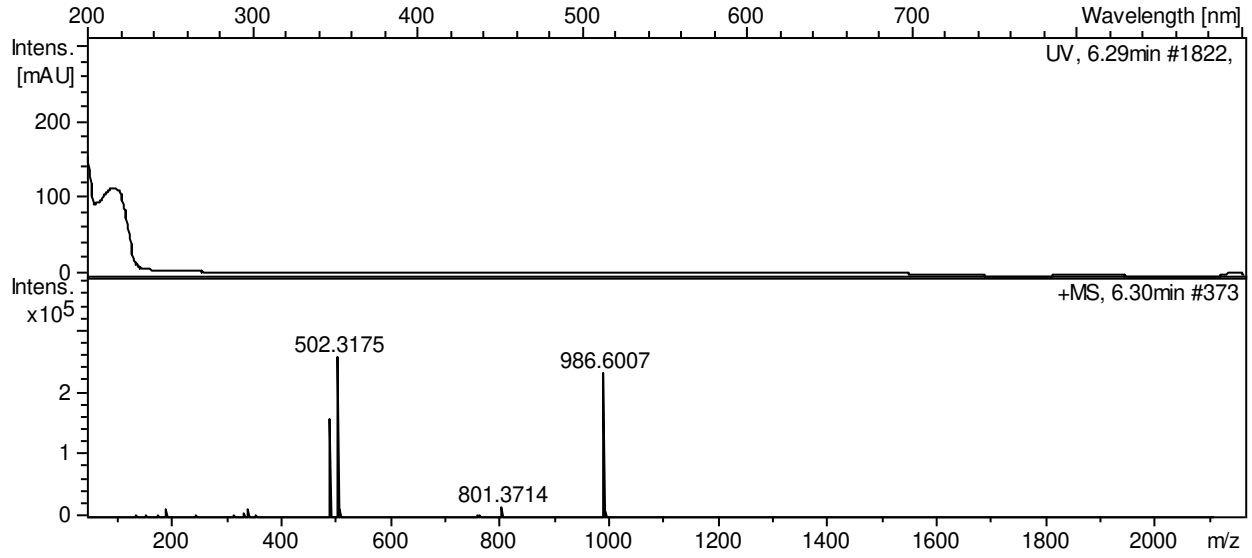
Fórmula molecular sugerida: $C_{16}H_{16}O_3$. Coincidencia en el DPN con **Soraphinol B** y **Kurasoin A**.

P11



Fórmula molecular sugerida: $C_{16}H_{16}O_3$. Coincidencia en el DPN con **1-(4-Ethyl-3,5-dihydroxyphenyl)-2-phenylethylene**.

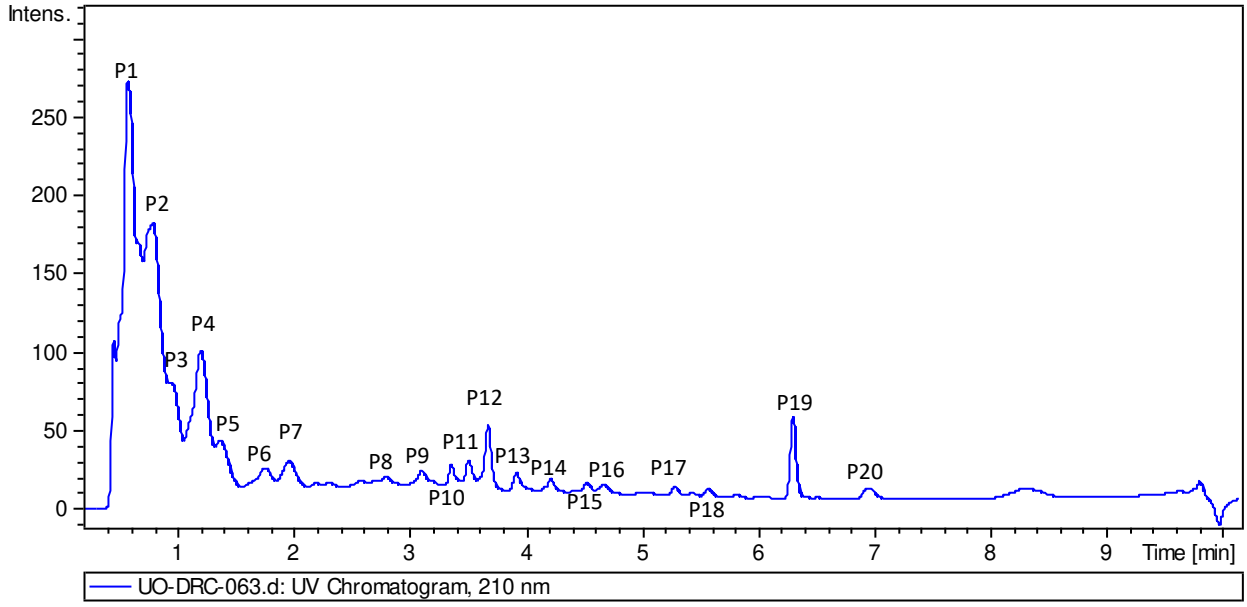
P12



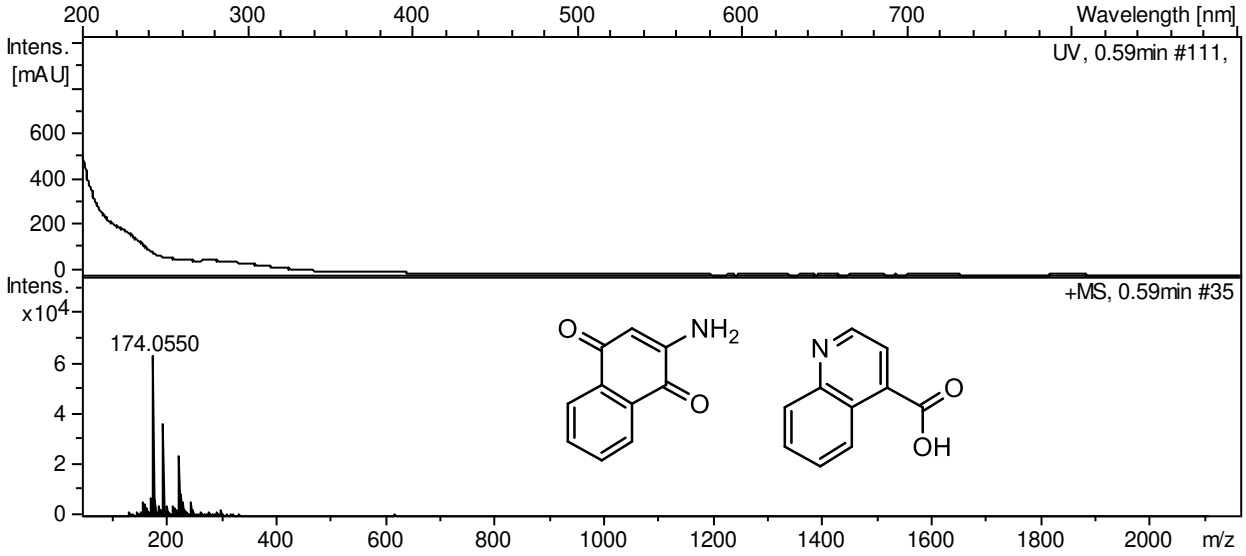
Fórmula molecular sugerida: **$C_{29}H_{40}O_6$**. Sin coincidencias en el DPN para procariotas. Anotado en la base de datos de MEDINA como componente del medio de fermentación.

DRC-063

A continuación, se muestra el cromatograma de absorbancia a 210nm de la muestra:

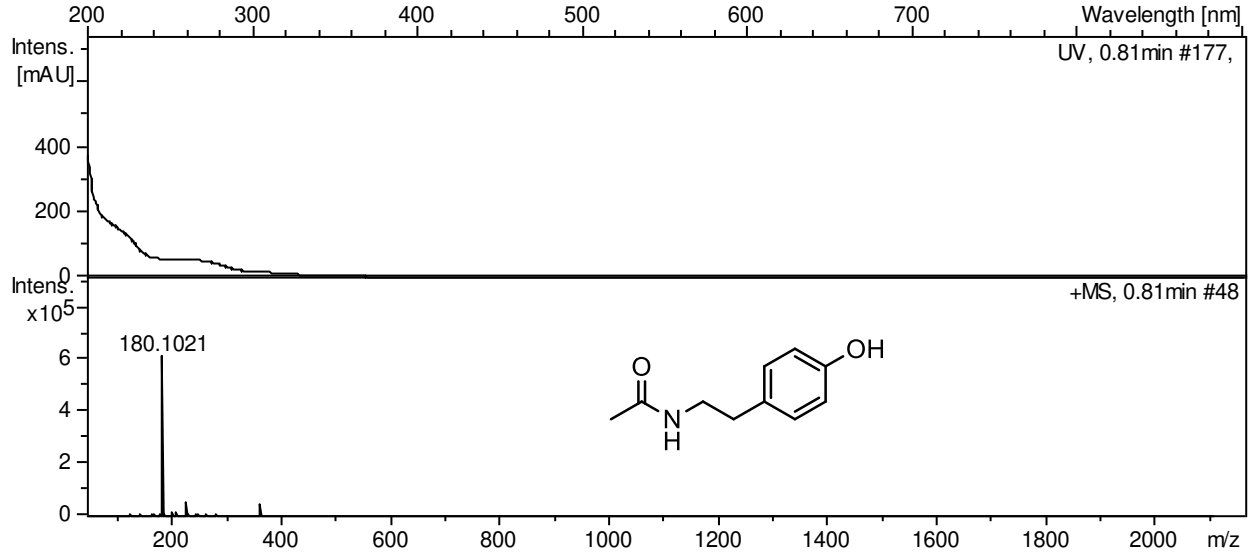


P1



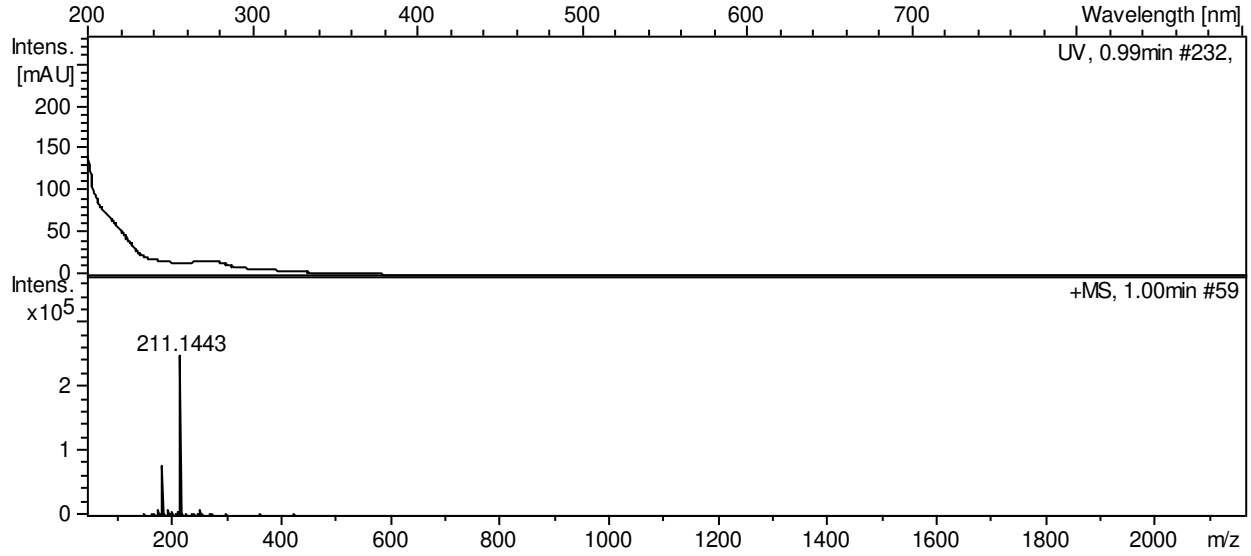
Fórmula molecular sugerida: **$C_{10}H_7NO_2$**. Coincidencias en el DPN con **2-Amino-1,4-naphthoquinone** y **4-Quinolinecarboxylic acid**

P2



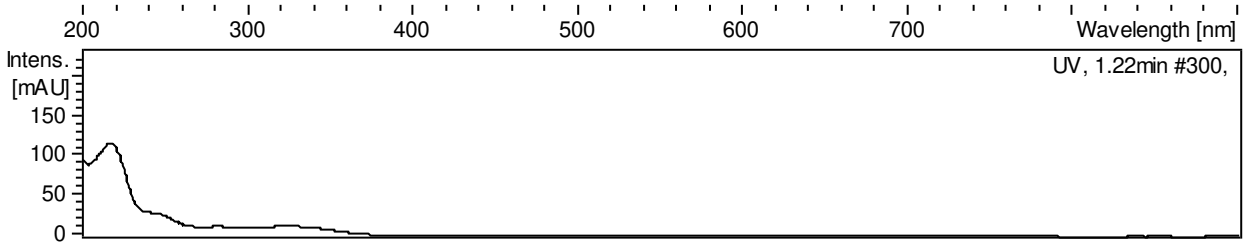
Fórmula molecular sugerida: $C_{10}H_{13}NO_2$. **N-Acetyltyramine.**

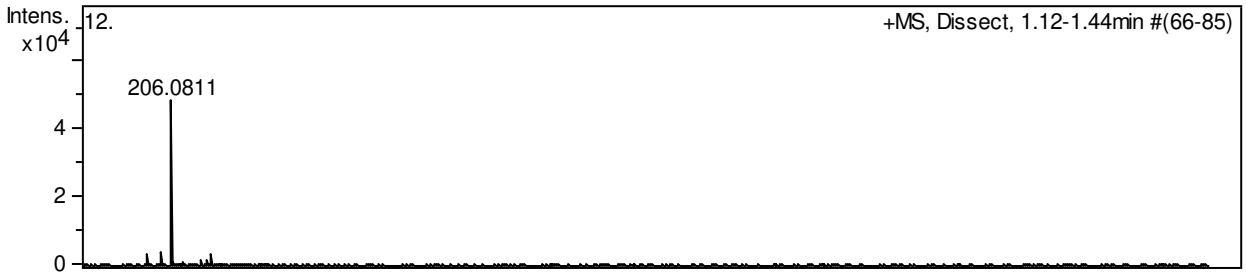
P3



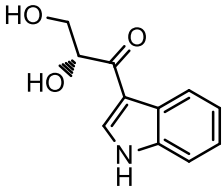
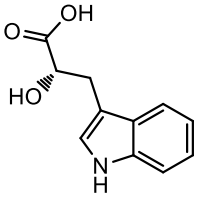
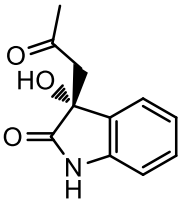
Fórmula molecular sugerida: $C_{11}H_{18}N_2O_2$. **Cyclo(Leu-Pro).**

P4

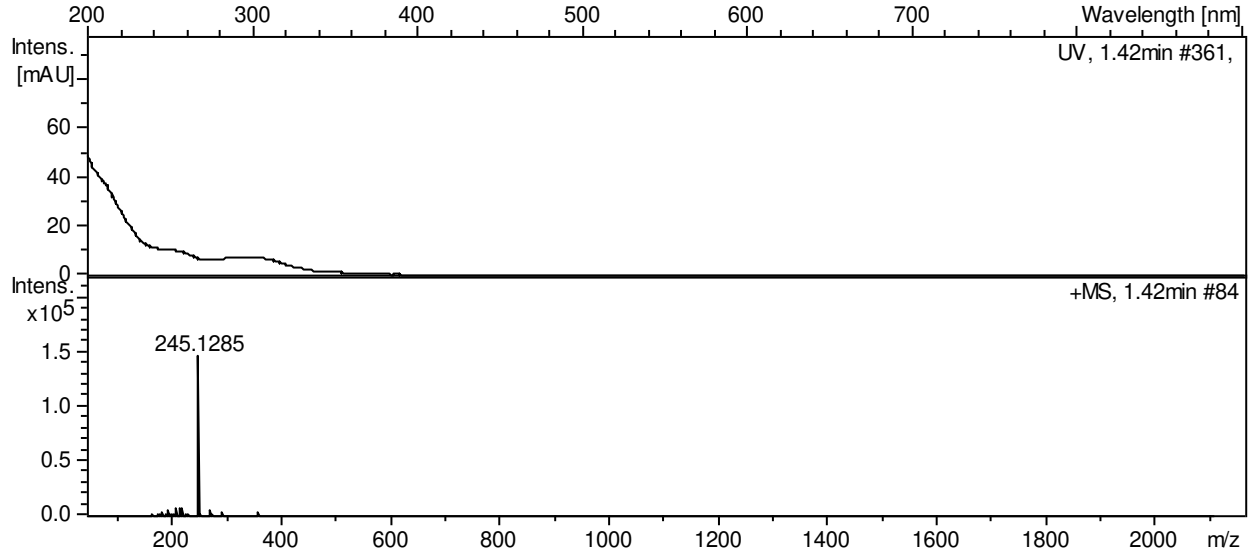




Fórmula molecular sugerida: **$C_{11}H_{11}NO_3$**. Tres coincidencias en el DPN:

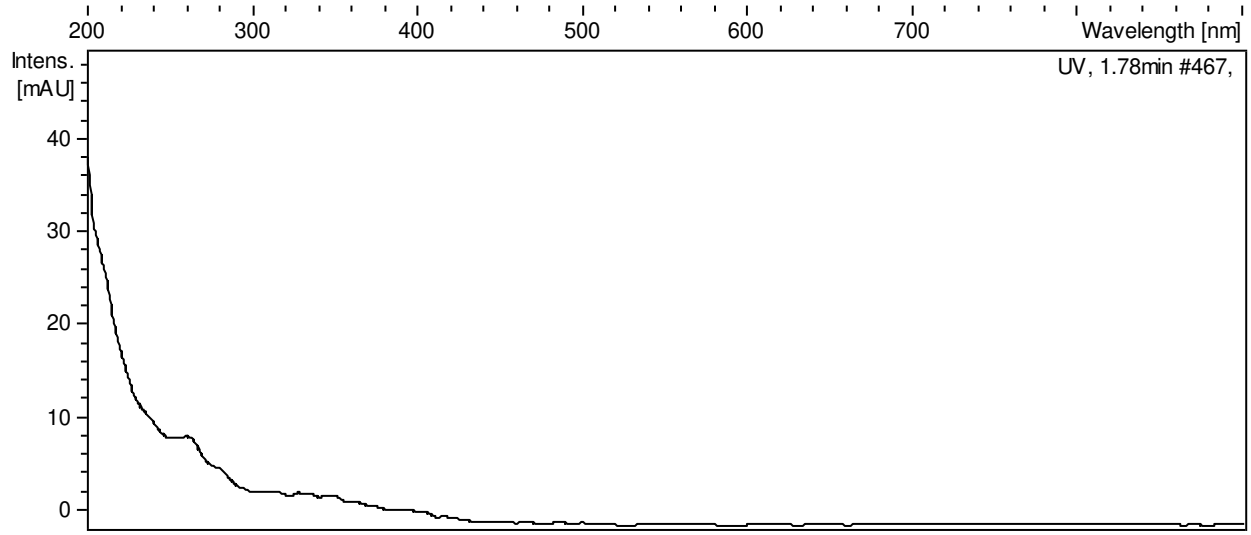
2,3-Dihydroxy-1-(1H-indol-3-yl)-1-propanone	2-Hydroxy-3-(3-indolyl)propanoic acid
	
1,3-Dihydro-3-hydroxy-3-(2-oxopropyl)-2H-indol-2-one	
	

P5



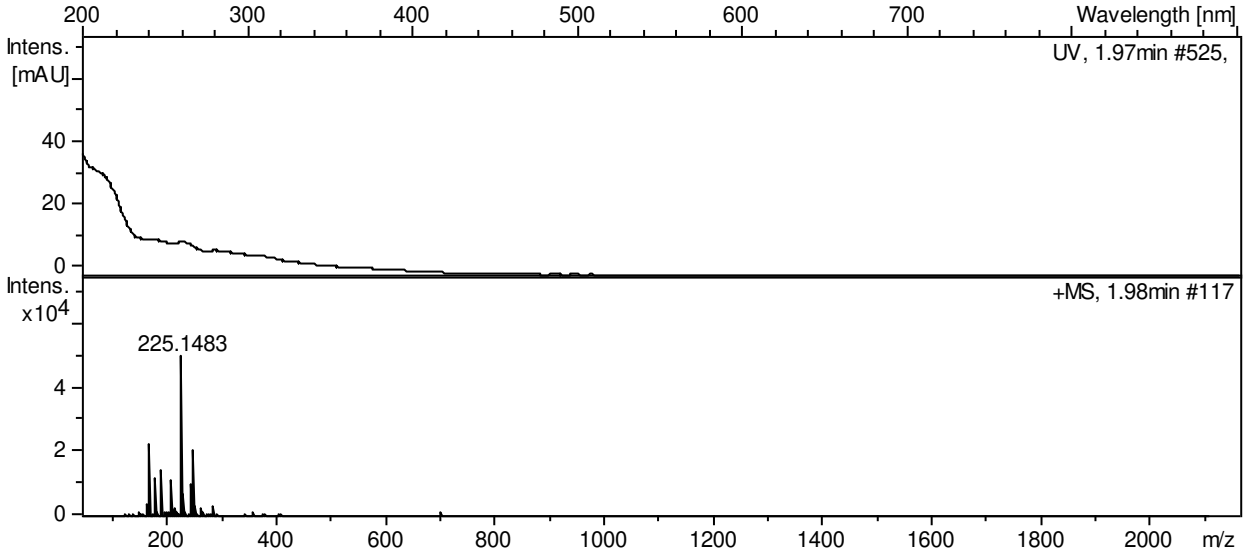
Fórmula molecular sugerida: $C_{11}H_{18}N_2O_2$. **Cyclo(Phe-Pro).**

P6



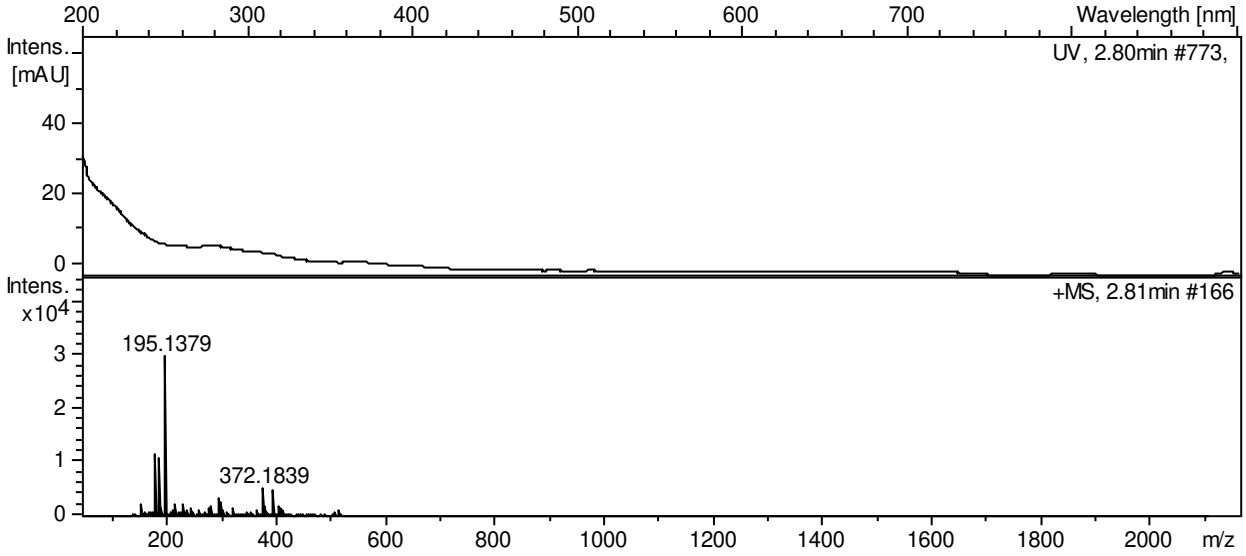
Pico UV sin ionización ESI(+). No es posible determinar la fórmula molecular.

P7

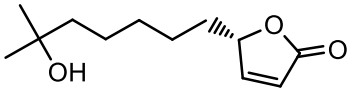
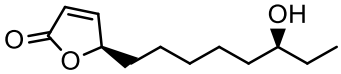
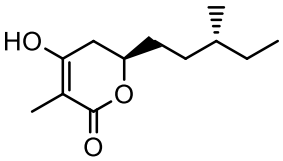
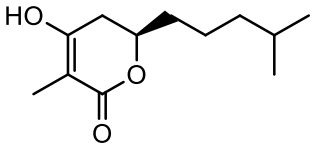


Fórmula molecular sugerida: **$C_{13}H_{22}O_4$**. Seis coincidencias en el DPN (véase P6 de DRC-061).

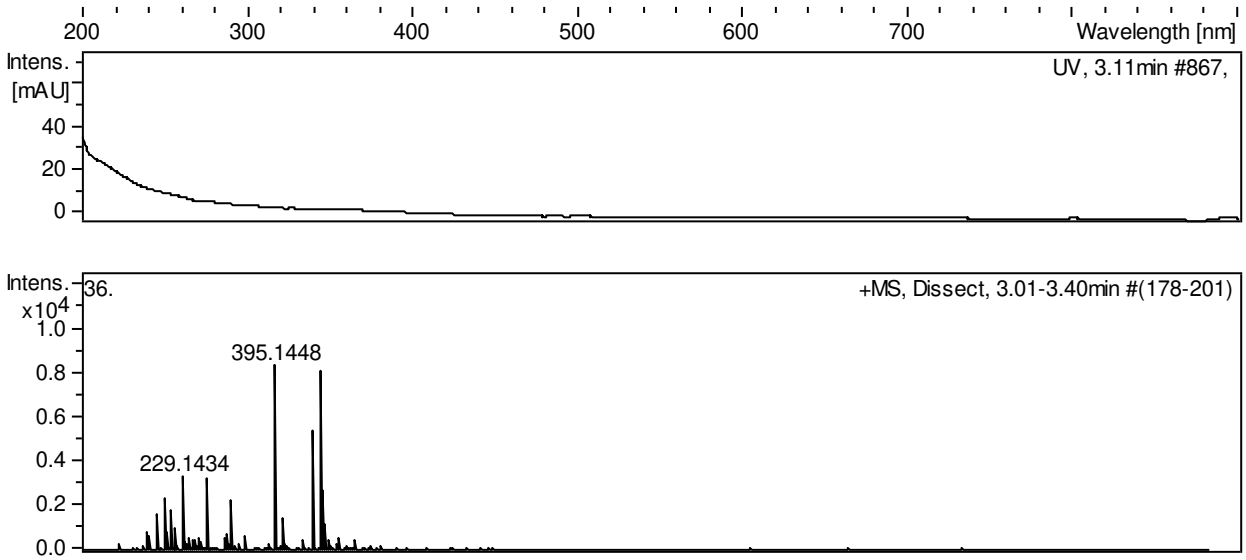
P8



Fórmula molecular sugerida: **$C_{12}H_{20}O_3$**. Cuatro coincidencias en el DPN:

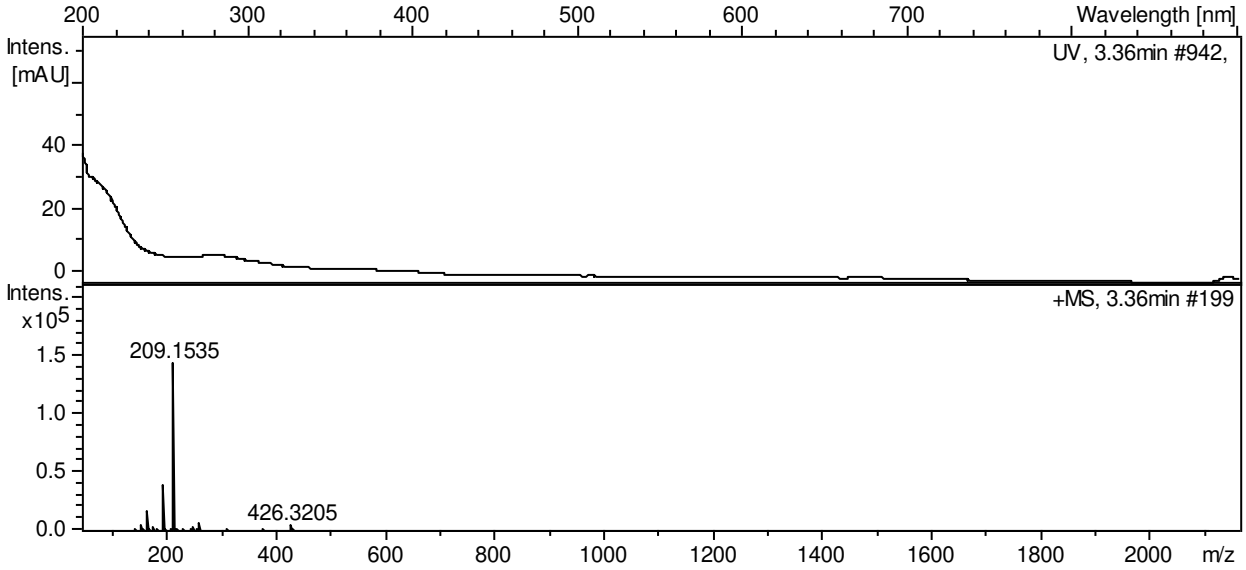
5-(6-Hydroxy-6-methylheptyl)-2(5H)-furanone 	5-(6-Hydroxyoctyl)-2(5H)-furanone 
Alkyldihydropyrone C 	Alkyldihydropyrone D 

P9

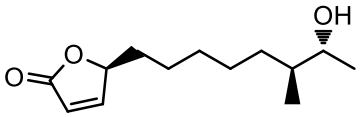
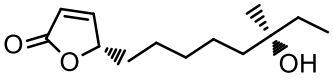
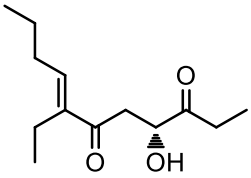
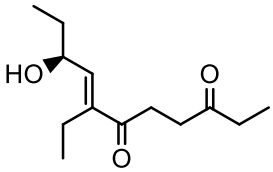
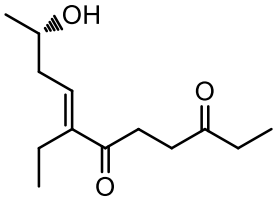
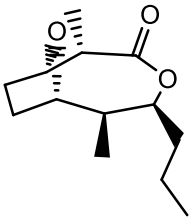
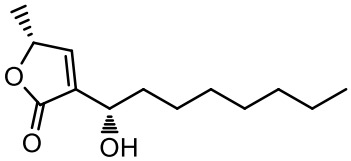


Fórmula molecular sugerida: **$C_{26}H_{41}NO_6$**. Sin coincidencias en el DPN para procariotas.

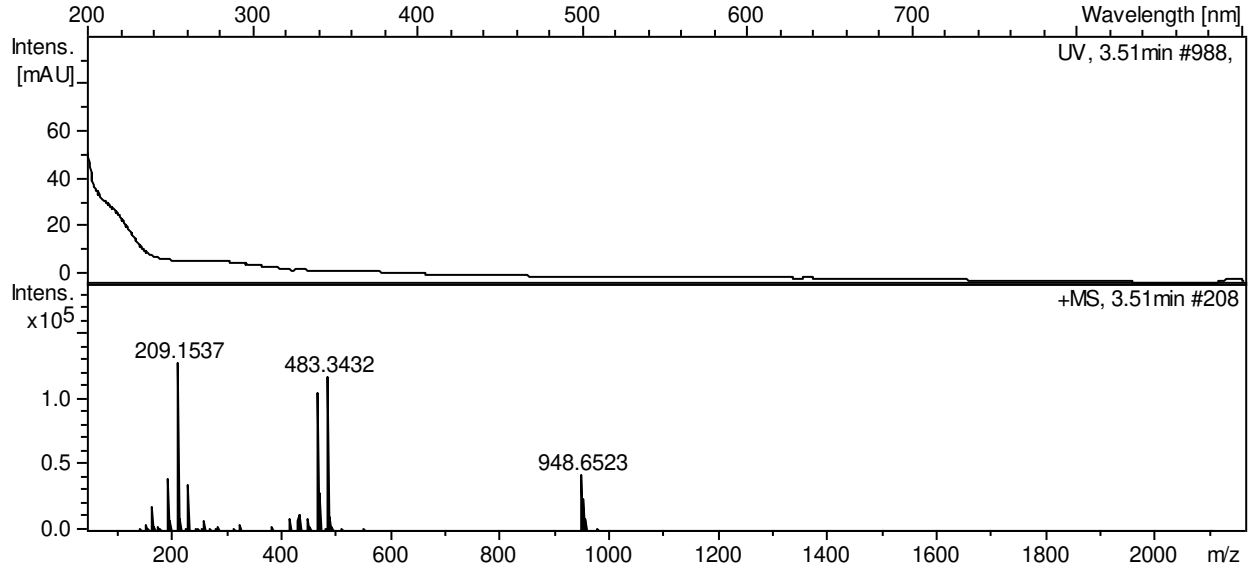
P10



Fórmula molecular sugerida: **$C_{13}H_{22}O_3$**. Siete coincidencias en el DPN:

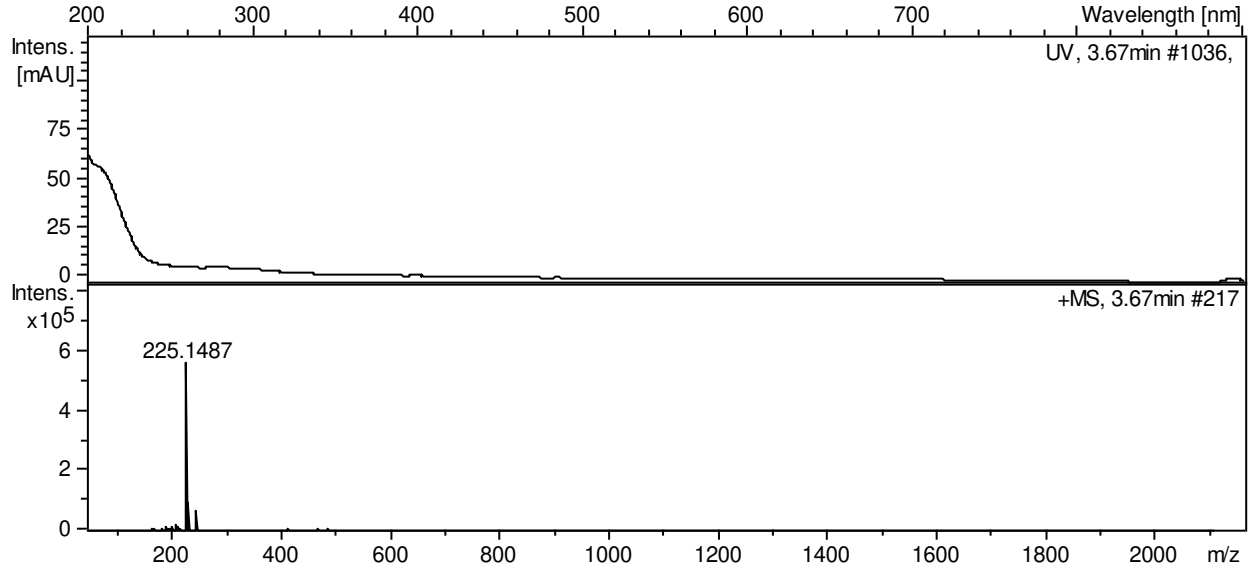
7'-Hydroxy-5-(6-Methyloctyl)-2(5H)-furanone 	MKN 003C 
7-Ethyl-4-hydroxy-7-undecene-3,6-dione 	7-Ethyl-9-hydroxy-7-undecene-3,6-dione 
7-Ethyl-10-hydroxy-7-undecene-3,6-dione 	Trihomononactic acid lactone 
Acaterin 	

P11



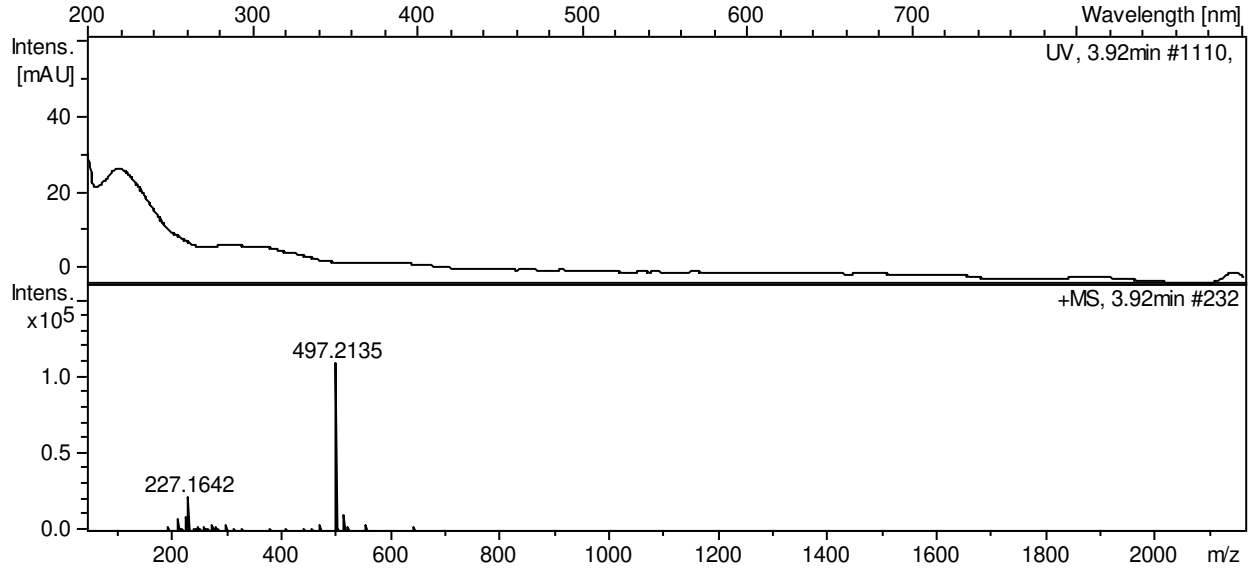
Fórmula molecular sugerida: $\mathbf{C_{26}H_{43}NO_6}$. Sin coincidencias en el DPN para procariotas.

P12



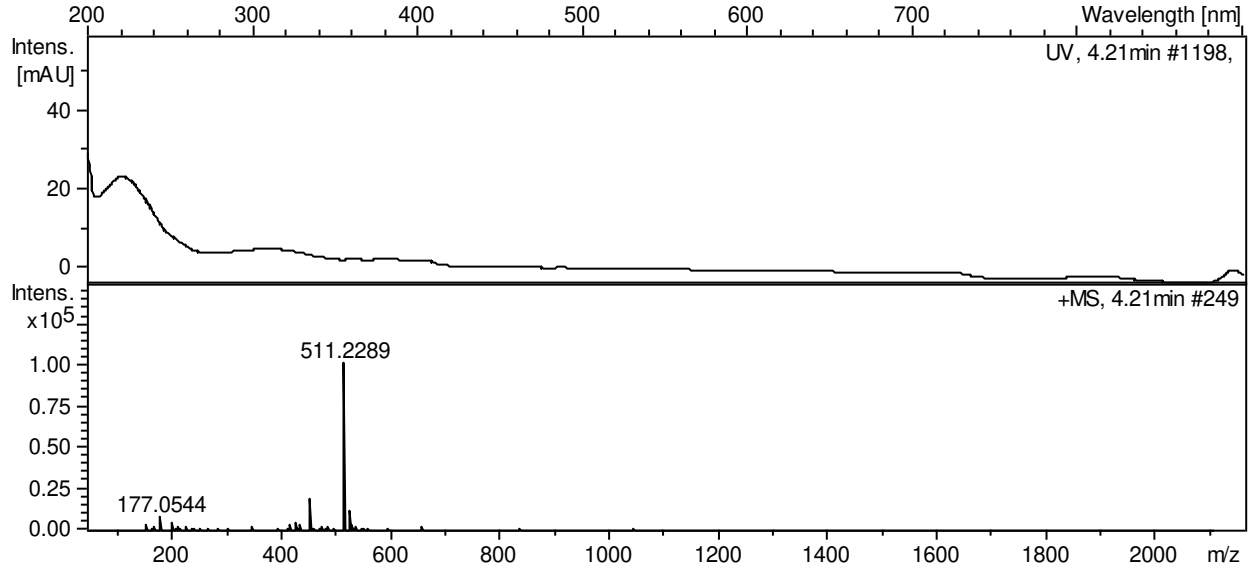
Fórmula molecular sugerida: $\mathbf{C_{13}H_{20}O_3}$. Ocho coincidencias en el DPN (véase P12 de DRC-061).

P13

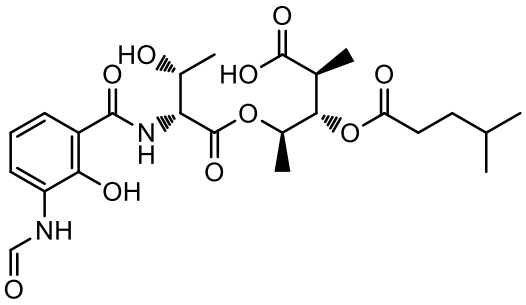


Fórmula molecular sugerida: **$C_{23}H_{32}N_2O_{10}$**. Sin coincidencias en el DPN. Relacionado con antimycins.

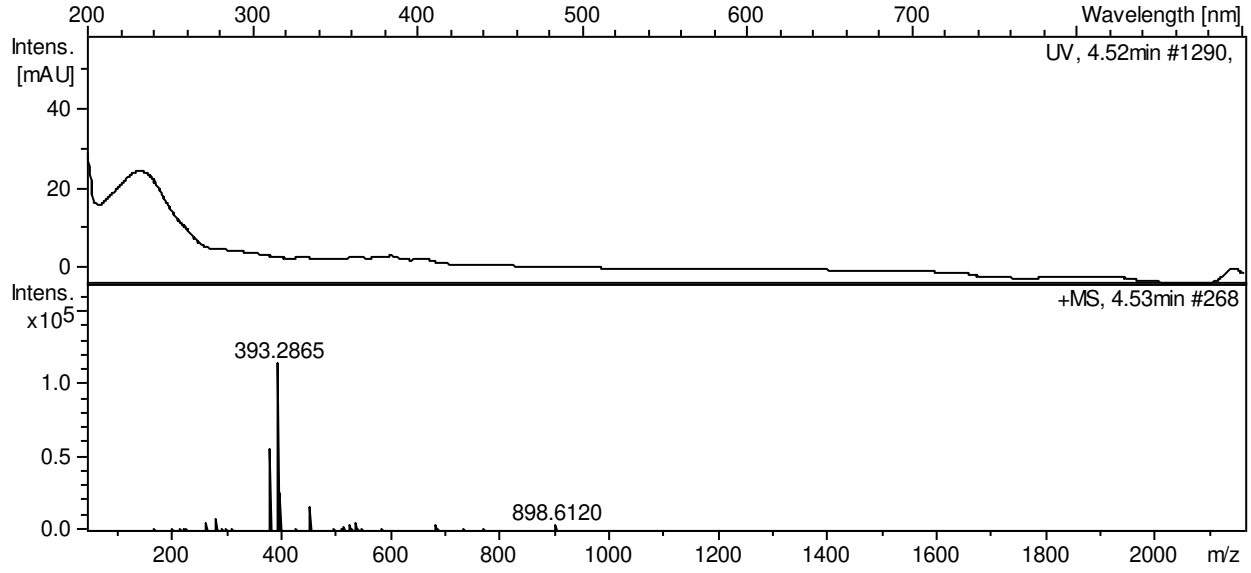
P14



Fórmula molecular sugerida: $C_{24}H_{34}N_2O_{10}$. Coincidencia en el DPN con **Antimycin B_1**.

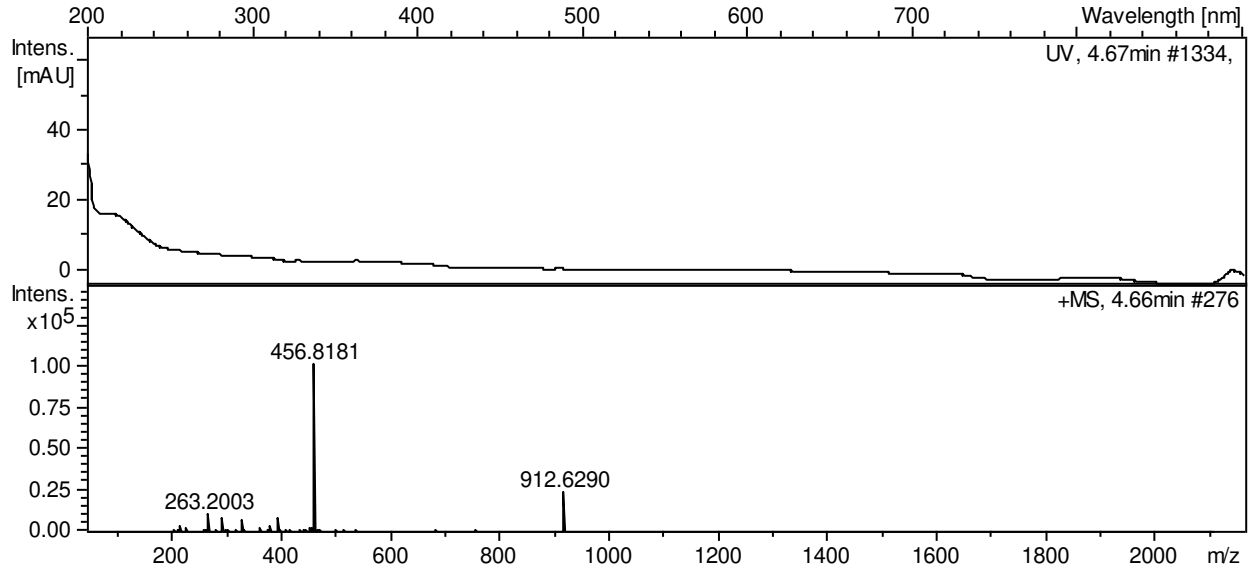


P15



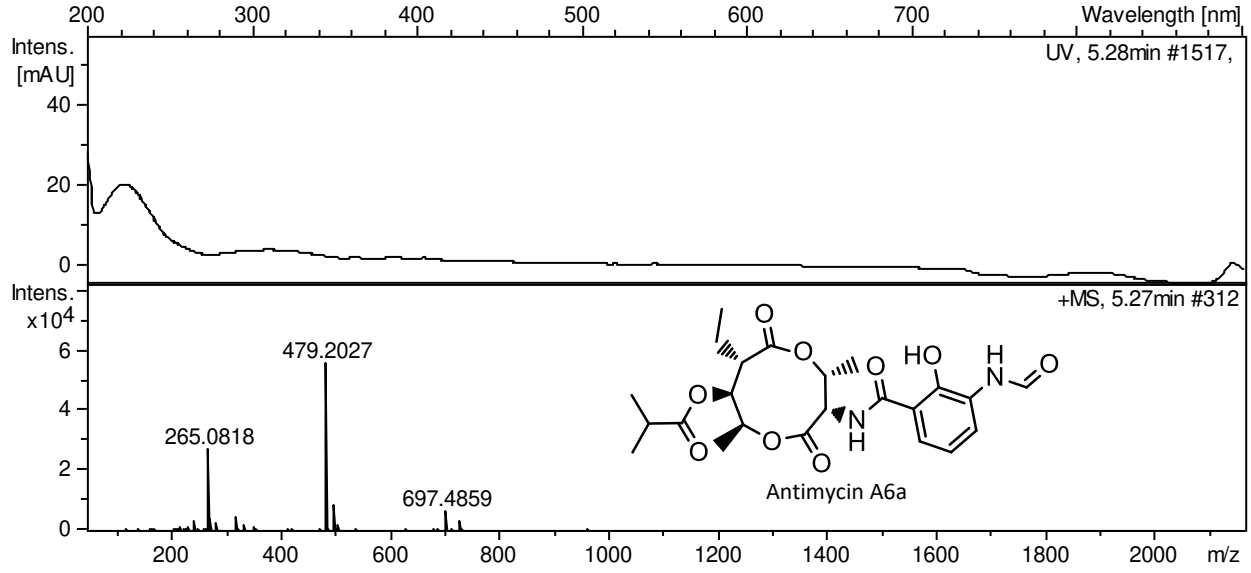
Fórmula molecular sugerida: $C_{48}H_{81}N_9O_8$. Coincidencia en el DPN con **Surugamide B/C/D/E**.

P16



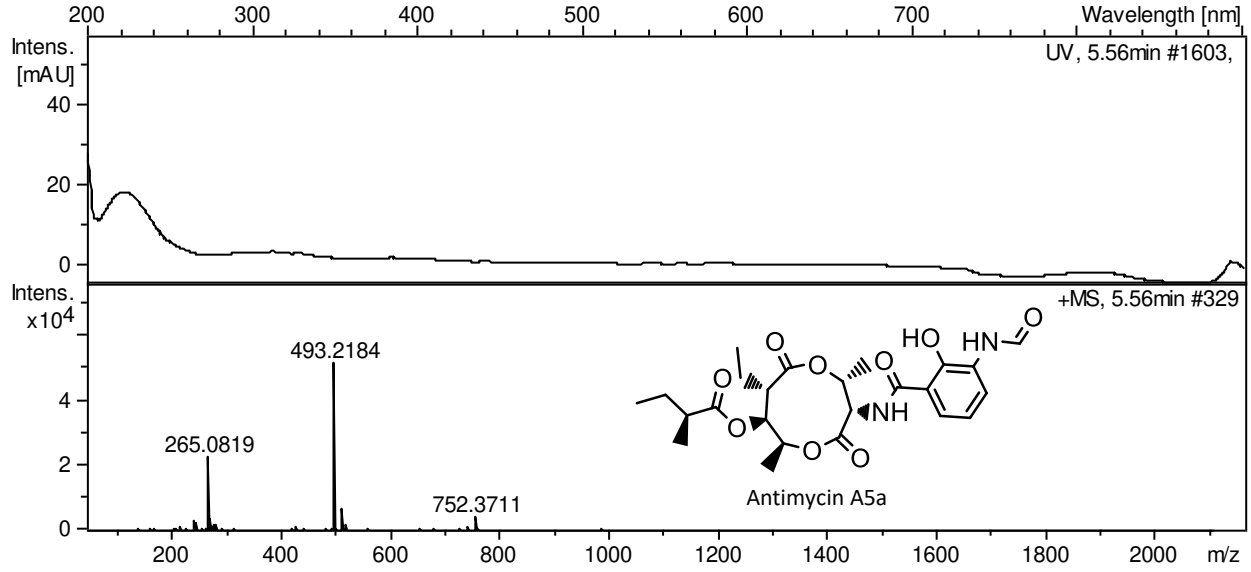
Fórmula molecular sugerida: $C_{48}H_{81}N_9O_8$. Coincidencia en el DPN con **Surugamide A**.

P17



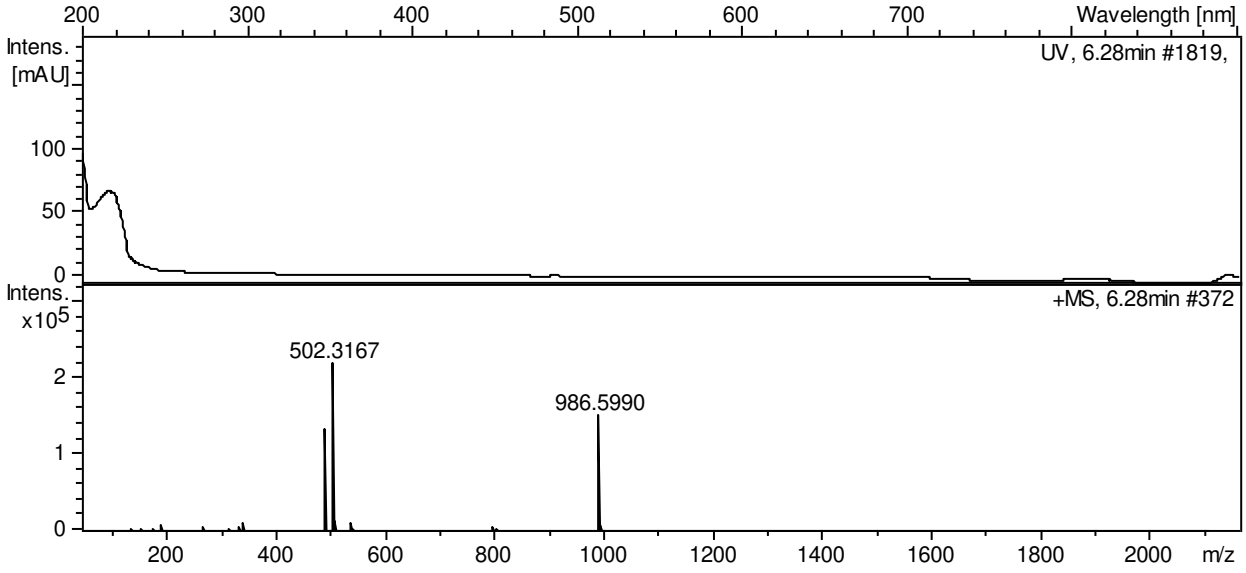
Fórmula molecular sugerida: $C_{23}H_{30}N_2O_9$. Coincidencia en el DPN con **Antimycin A_{6a}/A_{6b}/A_0/A_{18}**.

P18



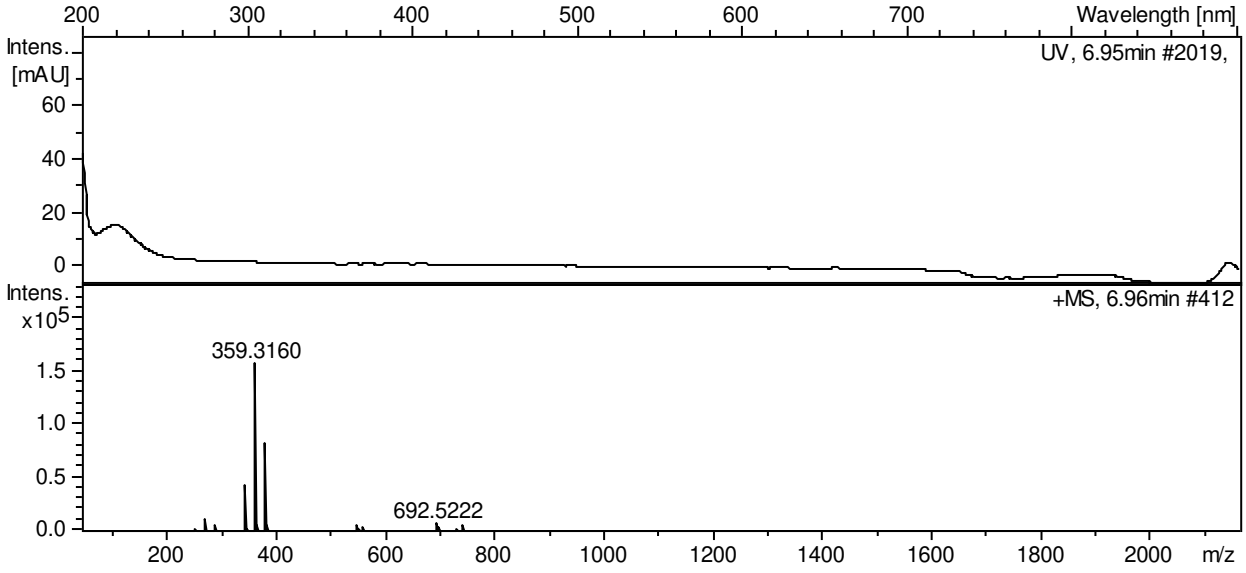
Fórmula molecular sugerida: $C_{23}H_{30}N_2O_9$. Coincidencia en el DPN con **Antimycin A_{5a}/A_{5b}**.

P19



Fórmula molecular sugerida: **$C_{29}H_{40}O_6$**. Sin coincidencias en el DPN para procariotas. Anotado en la base de datos de MEDINA como componente del medio de fermentación.

P20



Fórmula molecular sugerida: $C_{21}H_{42}O_4$. Coincidencia en el DPN con **Glycerol 1-(16-methylheptadecanoate).** Anotado en la base de datos de MEDINA como componente del medio de fermentación.

Fecha:	Preparado por:	Revisado por:
11-jun-2018	Jesús Martín	Fernando Reyes

Publicaciones

molecules

MDPI

Article

Novel Bioactive Paulomycin Derivatives Produced by *Streptomyces albus* J1074

Jorge Fernández-De la Hoz, Carmen Méndez, José A. Salas and Carlos Olano *

Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (I.U.O.P.A), Universidad de Oviedo, C/Julian Claveria s/n, 33006, Oviedo (Asturias), Spain; jorgefhoz@gmail.com (J.F.-D.l.H.); cmendezf@uniovi.es (C.M.); jasalas@uniovi.es (J.A.S.)

* Correspondence: olanocarlos@uniovi.es; Tel.: +34-985-105-288

Received: 25 September 2017; Accepted: 17 October 2017; Published: 18 October 2017

Abstract: Four novel paulomycin derivatives have been isolated from *S. albus* J1074 grown in MFE culture medium. These compounds are structural analogs of antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$ containing a thiazole moiety, probably originated through an intramolecular Michael addition. The novel, thiazole, moiety-containing paulomycins show a lower antibiotic activity than paulomycins A and B against Gram-positive bacteria. However, two of them show an improved activity against Gram-negative bacteria. In addition, the four novel compounds are more stable in culture than paulomycins A and B. Thus, the presence of an *N*-acetyl-L-cysteine moiety linked to the carbon atom of the paulic acid isothiocyanate moiety, via a thioester bond, and the subsequent intramolecular cyclization of the paulic acid to generate a thiazole heterocycle confer to paulomycins a higher structural stability that otherwise will conduce to paulomycin degradation and into inactive paulomenols.

Keywords: antibiotic $273a_2$; paulic acid; paulomenol; structural analogue; thiazole moiety

1. Introduction

Streptomyces albus J1074 is a derivative of *S. albus* G, defective in both the restriction and modification enzymes of the SalI system [1] and widely used as a host for the expression of *Streptomyces* secondary metabolite gene clusters [2,3]. Genome mining, genetic manipulation, and the activation of secondary metabolite gene clusters studies applied to *S. albus* J1074 have revealed its ability to produce, under different conditions and manipulation techniques, several carotenoids [4], hybrid polyketide-non-ribosomal peptides antimycins and 6-*epi*-alteramides [5], type I polyketides candicidins [5], non-ribosomal peptide indigoidine [5], and non ribosomal peptides surugamides [6]. In addition, *S. albus* J1074, as well as the parental strain *S. albus* G, produces glycosylated compounds paulomycin A, B, and E [5,7], and their derivatives paulomenol A and B, generated by the spontaneous loss of the paulic acid moiety [5]. The *S. albus* J1074 paulomycin biosynthesis gene cluster has been characterized, establishing a biosynthesis pathway [8].

Paulomycins A and B, antibiotics containing an isothiocyanate group (paulic acid) and mainly active against Gram-positive bacteria, were initially isolated from *Streptomyces paulus* strain 273 [9,10]. *S. paulus* produces paulomycins as a family of compounds that include paulomycin A, A2, B, C, D, E, and F [11], *O*-demethylpaulomycins A and B, paulomenol A and B, hydrogen sulfide adducts of paulomycin A and B [12], antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$, and paldimycin A and B, derivatives of paulomycin A and paulomycin B containing one or two *N*-acetyl-L-cysteine groups, respectively [13,14]. Antibiotic activity of paldimycins was assessed in vitro against Gram-positive bacteria and found comparable to that of vancomycin [15]. On the other hand, paulomenols A and B lack antibacterial activity, pointing to paulic acid as determinant of the antibiotic properties of paulomycins and paldimycins [12].

Different approaches have been used for the generation of derivatives of known compounds through combinatorial biosynthesis [16,17]. Thus, paulomycin derivatives have been generated carrying modifications in the L-paulomycose moiety [8]. Other methods involve the enhancement of the expression of the gene cluster in order to identify novel natural products [6]. This can be accomplished by several systems, such as the systematic alteration of the culture media composition or cultivation parameters to elevate production titers of compounds and encourage the production of a wider range of natural products from a microorganism. This method is known as OSMAC (One Stain Many Compounds) [18]. In this work, we describe the identification and structural characterization of several natural paulomycin derivatives produced by *S. albus* J1074 using the OSMAC approach.

2. Results

2.1. Identification of Compounds

In our laboratory, production of secondary metabolites by *S. albus* J1074, including paulomycins, has been routinely monitored using R5A as production medium [5,8]. However, purification of different paulomycin derivatives generated by combinatorial biosynthesis approaches was accomplished in MFE medium where the production of some secondary metabolites by *S. albus* J1074 was higher than in R5A [8]. Comparison of *S. albus* J1074 grown in MFE medium during 96 h with *S. albus* B29, mutant strain blocked in early steps of paulomycins biosynthesis [5], led to the identification or four novel compounds (**1**–**4**) probably derived from the paulomycin pathway (Figure 1). These compounds show Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) retention times of 4.29 (**1**), 4.32 (**2**), 4.53 (**3**), and 4.56 (**4**) min, paulomenol-like absorption spectrum with maxima at 238 and 320 nm, and masses of *m/z* 936, 936, 950, and 950 $[M + H]^+$, respectively.

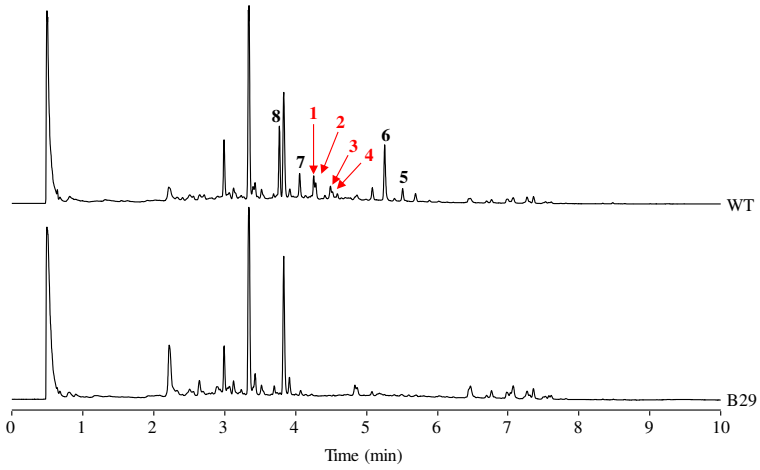


Figure 1. UPLC chromatograms, monitored at 238 nm, of *S. albus* J1074 (wt) and *S. albus* B29 (B29). Extracts were generated from cultures of the strains in MFE liquid medium during 96 h. Labeled peaks correspond to novel paulomycin derivatives (**1**–**4**), paulomycin A (**5**), paulomycin B (**6**), paulomenol A (**7**), and paulomenol B (**8**).

2.2. Structural Characterization of Novel Paulomycins

Peak 1 (Figure 1) was obtained as a brownish amorphous powder. The LC-DAD-HRMS run revealed the presence of two main compounds with retention mobility of 3.55 and 3.90 min, respectively (Figure S1). The main component, compound **1** (eluting at 3.55 min), was assigned a molecular formula of $C_{38}H_{53}N_3O_{20}S_2$ based on the molecular ion peak $[M + H]^+$ observed at 936.2739 (calcd. for $C_{38}H_{54}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 936.2739) (Figure S2). On the other hand, the secondary component, compound **1′** (eluting at 3.90 min), was assigned a molecular formula of $C_{38}H_{51}N_3O_{19}S_2$ based on the molecular ion peak $[M + H]^+$ observed at 918.2636 (calcd. for $C_{38}H_{52}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 918.2631) (Figure S2).

Both compounds are clearly related to each other, the latter being a dehydration product of the former. A search in the Dictionary of Natural Products indicates that the molecular formula of compound **1** might correspond to antibiotic $273a_{2\beta}$, a compound related to paulomycins. The UV (DAD) (Figure S3) shows strong resemblance to that reported for antibiotic $273a_2$ (both α and β) [12,13].

To establish the identity of the main compound **1** (Table 1; Figure 2) a ^{1}H NMR spectrum and a set of 2D NMR spectra (including COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC) were acquired (Figures S4–S7). The proton and HSQC confirmed the relationship with $273a_{2\beta}$, although there were important differences which indicated that compound **1** was novel. Being related to paulomycin it was not surprising that many of the observed signals showed strong resemblance to those displayed by paulomycin F and other paulomycin derivatives previously described [8]. In depth interpretation of the observed correlations allowed establishing the structure of compound **1**. The connectivity of compound **1** is like that of antibiotic $273a_{2\beta}$, but the terminal *N*-acetylcysteine group is connected in this case via a heterocyclic ring (thiazoline) rather than forming a dithiocarbamate. In fact, compound **1** could be considered as an intramolecular Michael addition derivative of antibiotic $273a_{2\beta}$; the sulfur nucleophile in the thioenol form of the dithiocarbamate moiety of antibiotic $273a_{2\beta}$ is attacking the C_β of the α, β unsaturated amino acid moiety and rendering a dihydrothiazol (thiazoline) ring (Figure S8). The chirality of the *N*-acetylcysteine moiety was arbitrarily assigned an *S* configuration assuming it directly derived from standard proteinogenic L-cysteine. The *syn* relative configuration at positions 2″ and 3″ is based on the strong key NOE observed between the protons at these positions. The observed coupling constant for H-2″ (7.5 Hz) also agrees with a *syn* configuration. On the other hand, the expected β anomeric configuration found for the monosaccharide unit in antibiotics $273a_{2\beta}$ [14] is observed for compound **1** based on the coupling constant of the anomeric proton (br d, 3.5 Hz).

Table 1. NMR data (**δ** in ppm) for compound **1** (DMSO-d_6, 500 MHz, 24 °C). Carbon chemical shifts derived from HSQC and HMBC spectra.

Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)	Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)
1	n.d.	-	1′	98.5	4.89 (br d, 3.5)
2	99.9	-	2′	30.7	2.04 (m) 1.77 (td, 12.3, 3.6)
3	159.9	-	3′	75.0	3.43 (m)
4	189.2	-	3′α	57.1	3.24 (s)
5	48.9	3.27 (m) 3.00 (d, 16.2)	4′	73.9	-
6	78.2	-	5′	67.5	4.41 (m)
7	198.7	-	6′	16.4	1.10 (m)
8	77.7	3.64 (d, 10.0)	7′	69.9	5.27 (quart., 6.8)
9	69.2	3.48 (m)	8′	16.5	1.18 (d, 6.7)
10	74.5	4.08 (br t)	9′	176.5	-
11	70.7	4.66 (dd, 10.2, 1.8)	10′	34.3	2.55 (m)
12	71.8	4.01 (dt, 9.9, 3.4)	11′	19.6	1.08 (m)
13	62.9	3.77 (m)	12′	19.8	1.13 (d, 7.0)
14	171.0	-	1″	168.5	-
15	21.2	1.96 (s)	2″	80.3	5.04 (d, 7.5)
			3″	49.8	4.36 (m)
			4″	16.5	1.10 (m)
			5″	167.8	-
			1‴	172.3	-
			2‴	52.6	4.45 (m)
			3‴	34.2	3.62 (m) 3.26 (m)
			4‴	170.3	-
			5‴	23.2	1.85 (s)
	NH_2			-	8.30

The secondary component **1′** (Figure 2) is proposed to be the dehydration product obtained by a water loss at positions 5 and 6, generating the corresponding quinone ring. Additionally, an HSQC

signal observed at 6.91 ppm (^{1}H) and 132.2 ppm (^{13}C) (Figure S5) was a clear diagnostic of the new double bound (between positions 5 and 6) in the secondary product. It was not possible to prepare an NMR table for this secondary compound, although all the positions but those close to the new double bond are expected to resonate at the same frequency as the main compound in this sample.

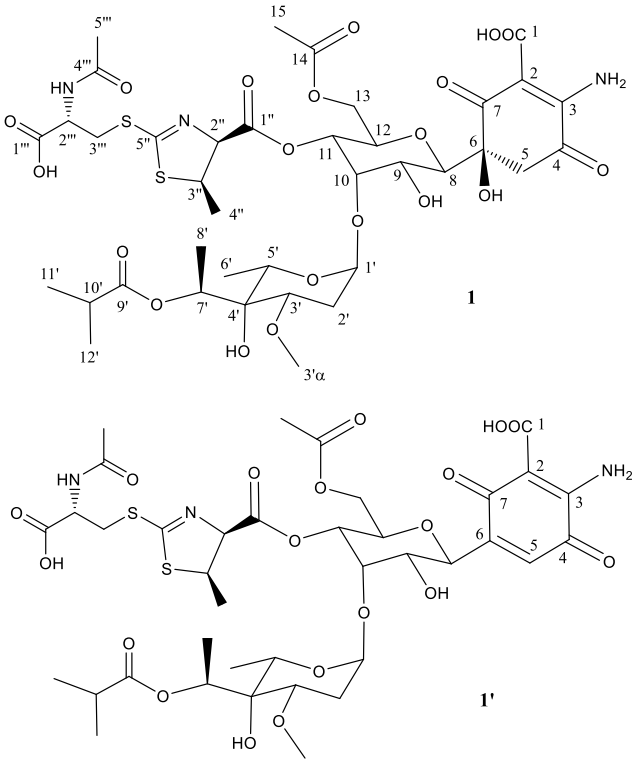


Figure 2. Structure of compound **1** deduced from ^{1}H- and ^{13}C-NMR data and proposed structure of secondary product compound **1′** after abstraction of one molecule of H_2O.

Peak 2 (Figure 1) was obtained as a brownish amorphous powder. The LC-DAD-HRMS run revealed the presence of two main compounds with retention mobility of 3.55 and 3.91 min, respectively (Figure S9). Both components showed identical retention time, DAD, and HRMS spectra (Figures S10 and S11) as the compounds detected in peak 1. Thus, having the same molecular formula, it was very likely that compounds **2** and **2′** might be isomers (probably stereoisomers) of compounds **1** and **1′,** or maybe the actual antibiotic 273a$_{2\beta}$ and its derivative after abstraction of one molecule of H_2O.

To unequivocally establish the identity of the main compound **2** (Table 2; Figure 3), a ^{1}H NMR spectrum and a set of 2D NMR spectra (including COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC) were acquired Figures S12 and S13). The proton and HSQC spectra immediately confirmed the relationship with compounds **1** and **1′**. Most signals were almost isochronous with those found in peak 1, and the only significant chemical shift differences were localized in the signals of the thiazoline heterocycle, suggesting that in this case the antibiotic 273a$_{2\beta}$ is the precursor and the proposed Michael addition has rendered the *anti* diastereomer in this ring. The weakness of NOESY correlation between protons at positions 2″ and 3″ and the observed coupling constant for H-2″ (4.7 Hz) confirmed the anti-relationship of these two protons. In compound **2,** the key HMBC correlations that connect the *N*-acetylcysteine moiety to the thiazoline heterocycle are the same as those already found for peak 1.

Similarly to peak 1, the secondary component **2′** is proposed to be the dehydration product obtained by a water loss at positions 5 and 6, generating the corresponding quinone. A key HSQC signal observed at 6.91 ppm (^{1}H) and 132.2 ppm (^{13}C) (Figure S13) provides a clear diagnostic of the new double bound (between positions 5 and 6) in the secondary product.

Table 2. NMR data (δ in ppm) for compound **2** (DMSO-d_6, 500 MHz, 24 °C). Carbon chemical shifts derived from HSQC and HMBC spectra.

Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)	Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)
1	n.d.	-	1′	98.5	4.86 (br d, 3.7)
2	99.9	-	2′	30.6	2.04 (m) 1.78 (m)
3	159.9	-	3′	75.0	3.44 (m)
4	189.2	-	3′α	57.1	3.24 (s)
5	48.7	3.26 (m) 3.00 (d, 16.2)	4′	73.9	-
6	78.2	-	5′	67.3	4.41 (m)
7	198.7	-	6′	16.3	1.10 (m)
8	77.6	3.62 (d, 9.8)	7′	69.8	5.27 (quart., 6.8)
9	69.1	3.45 (m)	8′	16.4	1.18 (d, 6.7)
10	74.5	4.02(br t)	9′	176.2	-
11	70.4	4.58 (dd, 10.1, 2.0)	10′	34.3	2.55 (m)
12	72.0	3.97 (m)	11′	19.5	1.08 (m)
13	62.8	3.75 (m)	12′	19.6	1.12 (m)
14	170.9	-	1″	169.3	-
15	21.1	1.97 (s)	2″	83.1	4.90 (d, 4.7)
			3″	51.0	4.25 (m)
			4″	22.5	1.38 (m)
			5″	167.9	-
			1‴	172.2	-
			2‴	52.2	4.51 (m)
			3‴	34.3	3.62 (m) 3.23 (m)
			4‴	170.2	-
			5‴	23.1	1.85 (s)

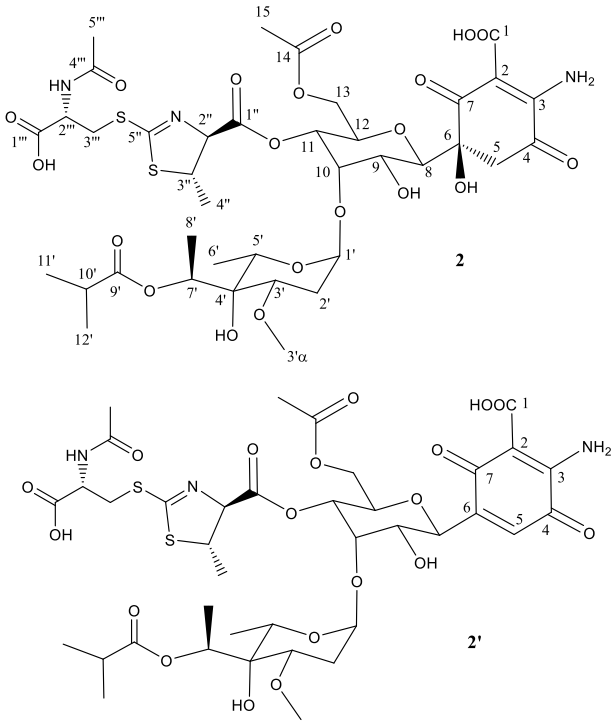


Figure 3. Structure of compound **2** deduced from ^{1}H- and ^{13}C-NMR data and proposed structure of secondary product compound **2′** after elimination of one molecule of H_2O.

Peak 3 (Figure 1) was obtained as a brownish amorphous powder. The LC-DAD-HRMS run revealed the presence of two main compounds with retention mobility of 3.77 and 4.06 min, respectively (Figure S14). The main component **3** (3.77 min) was assigned a molecular formula of $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2$

based on the molecular ion peak $[M + H]^+$ observed at 950.2893 (calcd. for $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 950.2893). On the other hand, the secondary component **3′** (4.07 min) was assigned a molecular formula of $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2$ based on the molecular ion peak $[M + H]^+$ observed at 938.2782 (calcd. for $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 932.2787) (Figure S15). As already mentioned for peaks 1 and 2, both compounds are clearly related to each other, the latter being a dehydration product of the former. A search in the dictionary of natural products indicate that the molecular formula of compound **3** corresponds to antibiotic $273a_{2\alpha}$ and the UV (DAD) (Figure S16) was identical to that observed for peaks 1 and 2, confirming their structural relationship.

To establish the identity of the main compound **3** (Table 3, Figure 4), a ^{1}H NMR spectrum and a set of 2D NMR spectra (including COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC) were acquired (Figures S17 and S18). The proton and HSQC showed immediately the compound did not correspond to $273a_{2\alpha}$ but to a compound identical to **1,** but carrying an extra methylene group which, after analysis of the TOCSY and HMBC spectra, was found to be in the fatty acid. Thus, the structural difference between compounds **3** and **1** is the same as the difference between the antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$. The chemical shifts observed for compound **3** were almost identical to compound **1** except for the fatty acid. The *syn* relative configuration at positions 2″ and 3″ was corroborated by the strong key NOE observed between the protons at these positions and the coupling constant of 7.5 Hz observed for H-2″).

Table 3. NMR data (δ in ppm) for compound **3** (DMSO-d_6, 500 MHz, 24 °C). Carbon chemical shifts derived from HSQC and HMBC spectra.

Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)	Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)
1	n.d.	-	1′	98.4	4.89 (br d, 3.5)
2	n.d.	-	2′	30.7	2.04 (m) 1.79 (td, 12.3, 3.6)
3	159.9	-	3′	75.0	3.43 (m)
4	189.2	-	3′α	57.1	3.24 (s)
5	48.9	3.29 (m) 2.98 (d, 16.2)	4′	73.9	-
6	78.2	-	5′	67.5	4.41 (m)
7	198.7	-	6′	16.5	1.10 (m)
8	77.7	3.64 (d, 10.1)	7′	69.8	5.27 (quart., 6.8)
9	69.2	3.48 (m)	8′	16.4	1.18 (d, 6.7)
10	74.5	4.08 (br t)	9′	175.9	-
11	70.7	4.66 (dd, 10.2, 1.8)	10′	41.5	2.38 (m)
12	71.9	4.00 (dt, 9.9, 3.4)	11′	26.9	1.60 (m) 1.45 (m)
13	62.9	3.77 (m)	12′	12.2	0.88 (t, 7.0)
14	170.8	-	13′	17.5	1.09
15	21.2	1.96 (s)	1″	168.5	-
			2″	80.2	5.04 (d, 7.5)
			3″	49.8	4.36 (m)
			4″	16.5	1.10 (m)
			5″	167.8	-
			1‴	172.2	-
			2‴	52.6	4.46 (m)
			3‴	34.2	3.62 (m) 3.26 (m)
			4‴	170.3	-
			5‴	23.2	1.85 (s)

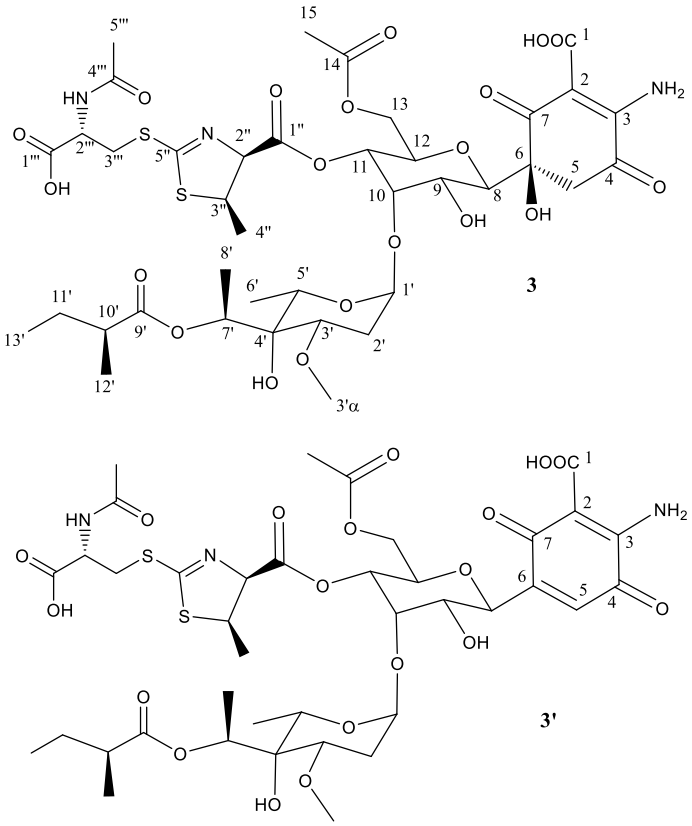


Figure 4. Structure of compound **3** deduced from ^{1}H- and ^{13}C-NMR data and proposed structure of secondary product compound **3′** after abstraction of one molecule of H_2O.

The secondary component **3′** (Figure 4) is proposed to be the dehydration product obtained by a water loss at positions 5 and 6, generating the corresponding quinone ring, as previously mentioned for **1′** and **2′**.

Peak 4 (Figure 1) was obtained as a brownish amorphous powder. The LC-DAD-HRMS run revealed the presence of two main components with retention mobility of 3.81 and 4.09 min, respectively (Figure S19). Both components showed identical DAD and HRMS (Figures S20 and S21) spectra as the components detected in peak 1. Thus, having the same molecular formula, it is likely that in this peak there are two stereoisomers of the compounds present in peak 3, in a similar manner as it occurred for the compounds found in peaks 1 and 2.

To establish the identity of the main compound **4** (Table 4, Figure 5), a ^{1}H NMR spectrum and a set of 2D NMR spectra (including COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC) were acquired (Figures S22 and S23). The chemical shifts observed for peak 4 were almost identical to those of peak 1, except for the fatty acid. This provided direct evidence that the connectivity and configuration of compound **4** is identical to that of compound **3,** except for positions 2″ and 3″ which display an *anti* relationship (the same situation already found for compounds **1** and **2**) further confirmed by the coupling constant measured for H-2″ (4.7 Hz).

The secondary component **4′** (Figure 5) is proposed to be the dehydration product obtained by a water loss at positions 5 and 6, thus generating the corresponding quinone ring for as in compounds **1′**, **2′,** and **3′**.

Table 4. NMR data (δ in ppm) for compound **4** (DMSO-d_6, 500 MHz, 24 °C). Carbon chemical shifts derived from HSQC and HMBC spectra.

Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)	Position	δ(^{13}C)	δ(^{1}H), (Mult, *J* in Hz)
1	n.d.	-	1′	98.4	4.89 (m)
2	100.0	-	2′	30.7	2.05 (m) 1.79 (m)
3	160.0	-	3′	75.0	3.44 (m)
4	189.2	-	3′α	57.1	3.24 (s)
5	48.9	3.27 (m) 2.99 (m)	4′	73.9	-
6	78.3	-	5′	67.4	4.41 (m)
7	198.7	-	6′	16.4	1.10 (m)
8	77.6	3.62 (d, 9.8)	7′	69.8	5.27 (quart., 6.8)
9	69.2	3.46 (m)	8′	16.4	1.18 (d, 6.7)
10	74.6	4.01(br t)	9′	175.9	-
11	70.5	4.58 (dd, 10.1, 2.0)	10′	41.5	2.37 (m)
12	72.0	3.97 (m)	11′	26.9	1.60 (m) 1.44 (m)
13	63.0	3.76 (m)	12′	12.2	0.88 (t, 7.0)
14	171.0	-	13′	17.6	1.10 (d, 6.8)
15	21.2	1.97 (s)	1″	169.4	-
			2″	83.2	4.90 (d, 4.7)
			3″	51.1	4.25 (m)
			4″	22.5	1.37 (m)
			5″	168.0	-
			1‴	172.3	-
			2‴	52.2	4.51 (m)
			3‴	34.3	3.62 (m) 3.29 (m)
			4‴	170.3	-
			5‴	23.1	1.85 (s)

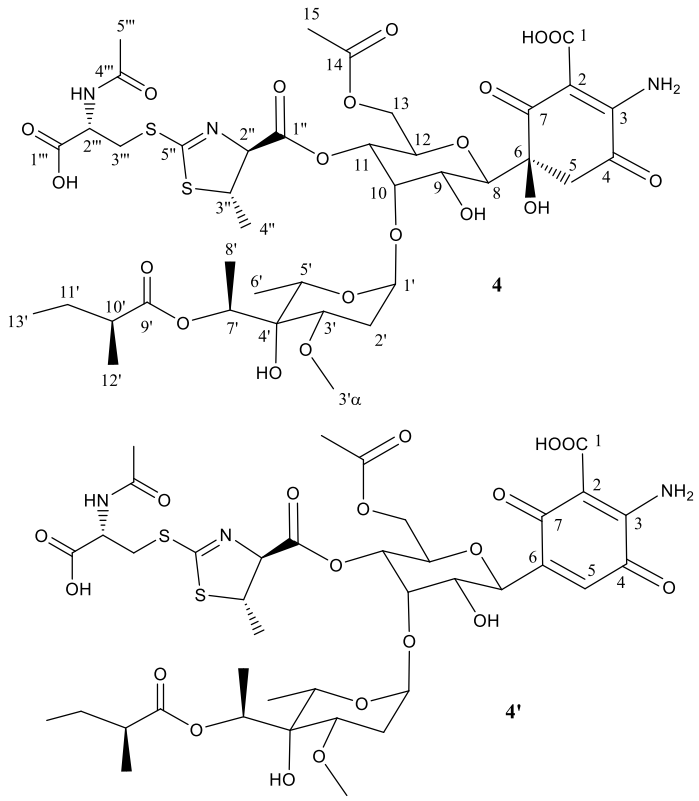


Figure 5. Structure of compound **4** deduced from ^{1}H- and ^{13}C-NMR data and proposed structure of secondary product compound **4′** elimination of one molecule of H_2O.

Repeated attempts to obtain pure samples of compounds **1**, **2**, **3,** and **4** resulted in a new mixture containing the compounds **1′**, **2′**, **3′,** and **4′** that appeared during the analysis process due to elimination of one molecule of H_2O in each case. These results are in concordance with previous reports on the spontaneous dehydration of paulomycin A in solution that is slowly converted into its quinone form, paulomycinone A [19,20]. Dehydration of paulomycins occurs even when leaving the compounds in solution in aqueous media at neutral pH, being therefore difficult to avoid [20]. The dehydration of antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$ and paldimycin A and B to the corresponding quinones has been also reported previously [14], as well as the same modification of paulomycin G obtained from *Micromonospora matsumotoense* M-412 [21]. The quinone derivatives of members of the paulomycin family of antibiotics have been reported to lack antibiotic activity [14].

2.3. Biological Activity of Novel Paulomycins

The antibacterial activity of freshly purified thiazole derivatives of antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$ compounds **1**–**4**, lacking apparently any traces of the dehydrated secondary compounds **1′**–**4′**, was evaluated against Gram-positives *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*; Gram-negatives *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*; and yeast *Candida albicans*, showing the minimal inhibitory concentrations (MIC) depicted in Table 5. All compounds were found active against Gram-positives, in particular **3** and **4** derived from paulomycin A. However, in all cases the levels of activity were lower than parental compounds paulomycin A (**5**) and B (**6**). Surprisingly, the four novel thiazole moiety-containing paulomycins, in particular compound **3**, showed slight activity against Gram-negatives *E. coli* and *K. pneumonia*, and inhibitory activity totally absent in paulomycin A (**5**) or B (**6**) [11,14]. None of the compounds tested showed inhibitory activity against *C. albicans*.

Table 5. Antibiotic activity of compounds **1**–**6** represented as minimal inhibitory concentration (MIC) in μg/mL. Paulomycin A (**5**) and B (**6**) were included as controls.

	MIC (μg/mL)					
Microorganism	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
S. aureus	75	75	37.5	25	<2.34	<2.34
S. epidermidis	50	50	18.75	12.5	<2.34	<2.34
E. coli	150	150	75	100	>200	>200
K. pneumoniae	150	150	100	100	>200	>200
C. albicans	200	>200	200	>200	>200	>200

All the new compounds present in each peak were tested for their cytotoxic activity against human tumor cell lines HT29, A549, MDA-MB-231, AGS, HL-60, CAPAN, and A2780, as well as a mouse nonmalignant cell line NIH/3T3. These compounds showed no cytotoxic activity against any of the cell lines under the selected cutoff level of 10 μM.

2.4. Stability of Novel Paulomycins in Culture

In a previous work we reported that paulomenols A and B, contrary to what had been speculated before [12], were not intermediates in the biosynthesis of paulomycins A and B but instead degradation products by loss of the paulic acid moiety [5]. Since paulomenols lack antibacterial activity while *N*-acetyl-L-cysteine containing antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$, paldimycin A and B [12] and thiazole derivatives of antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$ (compounds **1**–**4**) retain the antibacterial activity, in particular compounds **3** and **4** derived from paulomycin A, we wonder if the incorporation of the *N*-acetyl-L-cysteine moiety could represent a strategy to stabilize the structure-activity of paulomycins. This question was addressed by a feeding experiment using compound **3** and the non-producing deletion mutant *S. albus* B29 [5] as biotransformation host. We fed compound **3** (apparently lacking any trace containing compound **3′**) to this strain after 48 h of growth in R5A. In this medium paulomycins and paulomenols are produced by *S. albus* J1074 but peaks 1–4 are not produced

or produced in such low amounts that they cannot be spotted. After further 48 h, we could not observe conversion of compound **3** into the corresponding paulomycin B or paulomenol B (Figure 6). On the other hand, no significant conversion of compound **3** into **3′** was observed. The same results were obtained using compounds **1** (Figure S24), **2** (Figure S25), and **4** (Figure S26). These experiments demonstrate that compounds **1**–**4** are more stable in culture than the corresponding paulomycins. Furthermore, new feeding experiments with *S. albus* B29 using paulomycin B (**6**) and paulomycin A (**5**) as substrates confirmed the degradation of them into inactive paulomenol B (**8**) and A (**7**), as previously reported [5], but also their partial bioconversion into active compound **2** (Figure S27) and compound **3** (Figure S28), respectively.

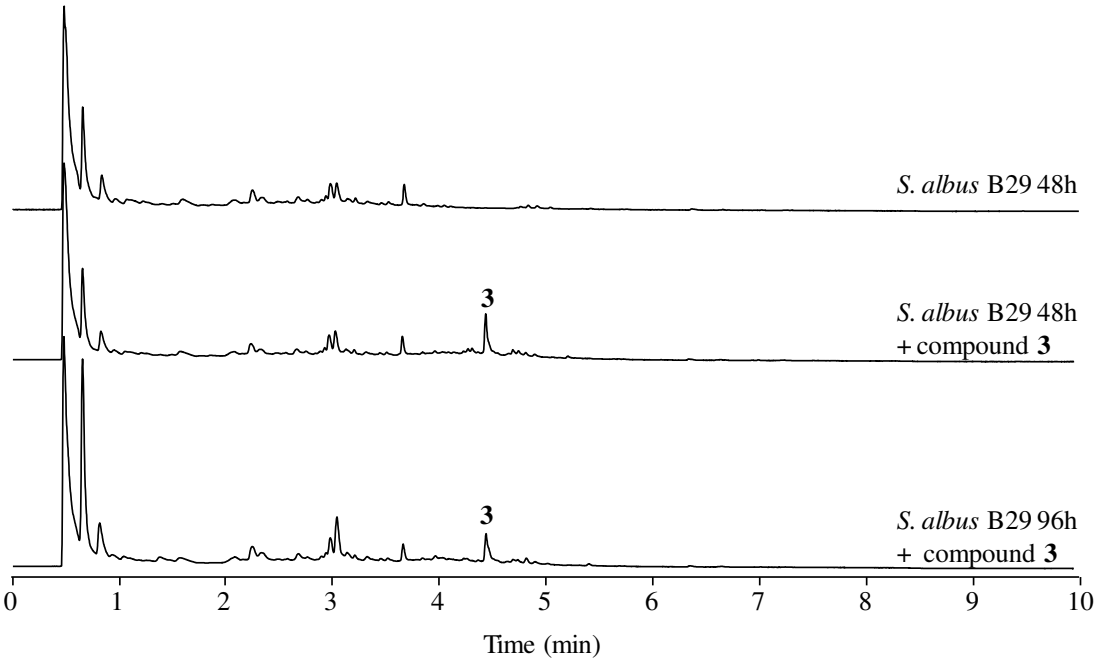


Figure 6. UPLC chromatograms, monitored at 238 nm, of mutant *S. albus* B29 grown in R5A liquid medium and fed with 50 μg mL^{-1} of compound **3**.

3. Discussion

The presence of *N*-acetyl-L-cysteine moieties as structural elements of secondary metabolite compounds produced by actinomycetes has been reported not only in the case of paulomycin A and B derivatives antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$, and paldimycin A and B [13,14], but also in other compounds with different biosynthetic origins such as lactacystin [22], phenazine antibiotic SB 212305 [23], seongomycin [24], naphthomycins I and J [25], cinnabaramides F and G [26], piceamycin *N*-acetyl-L-cysteine adduct [27], coelimycin P1 [28], homoseongomcin [29], cyslabdan [30], and argimycins PI and PII [31]. In some of these examples, such as SB 212305 and piceamycin, the presence of the *N*-acetyl-L-cysteine moiety has been associated with a loss of biological activity, antibiotics (in the case of SB 212305 [23]), and antibiotics and cytotoxic (in the case of piceamycin *N*-acetyl-L-cysteine adduct [27]). However, the presence of the *N*-acetyl-L-cysteine moiety has no effect on the cytotoxic activity of lactacystin [22] and cinnabaramides F and G [26], or on potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the case of cyslabdan [32]. The incorporation of the *N*-acetyl-L-cysteine moiety during the biosynthesis of cyslabdan has been shown to occur by the excretion of a labdane-type epoxide intermediate using a mycothiol MSH-mediated xenobiotic detoxification [30]. A similar mechanism has been proposed for the biosynthesis of seongomycin, naphthomycin J, lactacystin, and homoseongomycin [29,30].

In the case of paulomycin A and B derivatives: antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$, paldimycin A and B, and thiazole derivatives of antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$ (compounds **1**–**4**), the incorporation of *N*-acetyl-L-cysteine moieties via a thioester bond, and the subsequent intramolecular cyclization of the paulic acid to generate a thiazole heterocycle in compounds **1**–**4**, appears as a stabilization mechanism (probably by MSH-mediated detoxification) conducing to more stable structures in culture that retain antibiotic activity (improved against Gram-negatives), in opposition to the instability of paulomycins that degrade into inactive paulomenols [5] (Figure 7).

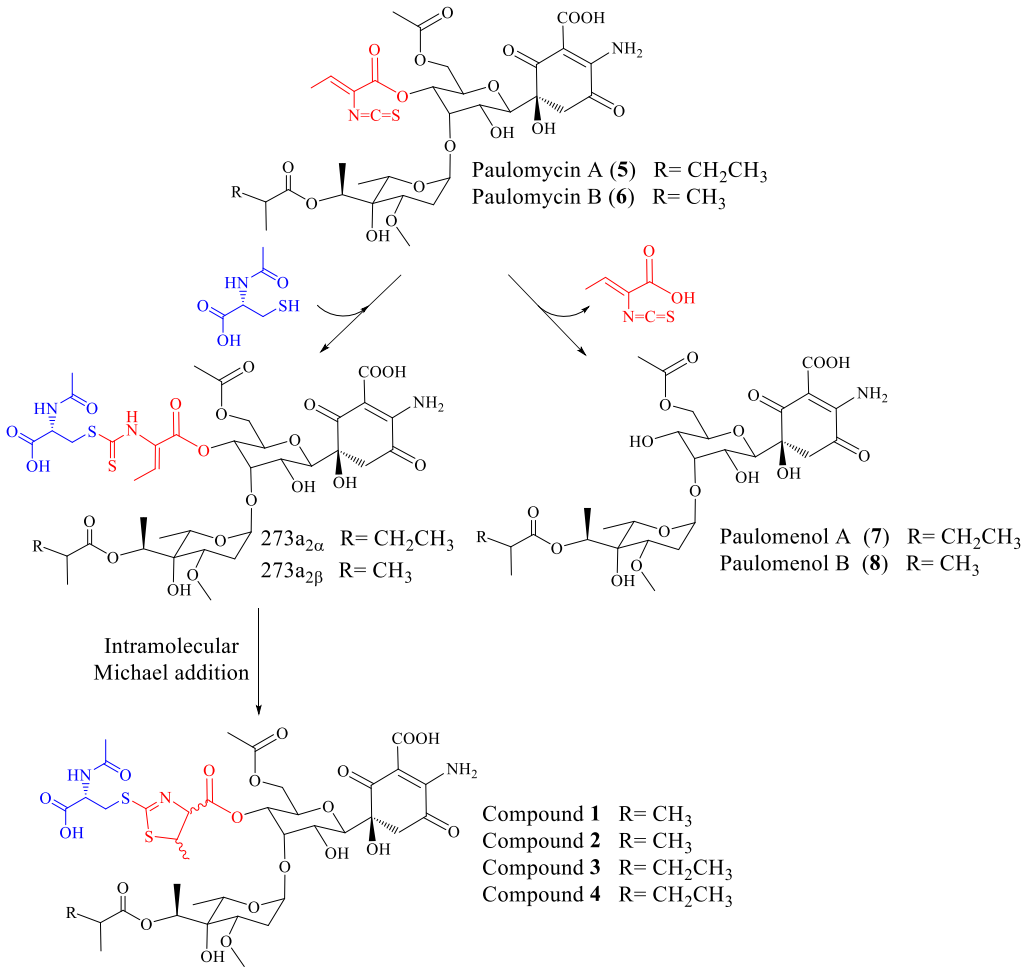


Figure 7. Fate of paulomycins in culture conditions leading to their degradation into paulomenols or to their conversion into antibiotics $273a_2$ and thiazole derivatives compounds **1**–**4** in *S. albus* J1074.

4. Materials and Methods

4.1. Microorganisms and Culture Media

Bacterial strains used in this work were *S. albus* J1074 [1] and *S. albus* B29 [5]. Growth medium for *S. albus* was tryptone soy broth (TSB), MA medium was used for sporulation, and MFE medium [8] as regular production medium of compounds **1**–**4**. R5A medium [33] was used for bioconversion experiments. TSB or YDP [34] were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of compounds **1**–**4** against bacteria or fungi, respectively.

4.2. Isolation and Structural Characterization of Compounds

Whole cultures of *S. albus* J1074 grown in MFE medium during 120 h at 30 °C were extracted with ethyl acetate containing formic acid (1%) and analyzed by UPLC and LC-MS for the production of paulomycins, following previously described methods [5,34]. Reversed phase chromatography was performed in an Acquity UPLC instrument fitted with a BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm, Waters, Cardanyola del Vallés, Spain). Samples were eluted with 10% acetonitrile for 1 min, followed by a linear gradient from 10 to 100% acetonitrile over 9 min, at a flow rate of 0.5 mL/min and a column temperature of 35 °C. For HPLC-MS analysis, an Alliance chromatographic system coupled to a ZQ4000 mass spectrometer and a SunFire C18 column (3.5 µm, 2.1 × 150 mm, Waters) was used. Solvents were the same as above and elution was performed with an initial isocratic hold with 10% acetonitrile during 4 min followed by a linear gradient from 10 to 88% acetonitrile over 26 min, at 0.25 mL/min. MS analysis were done by electrospray ionization in the positive mode, with a capillary voltage of 3 kV and a cone voltage of 20 V. Detection and spectral characterization of peaks was performed in both cases by photodiode array detection in the range from 200 to 500 nm using Empower software (Waters) to extract bidimensional chromatograms at different wavelengths, depending on the spectral characteristics of the desired compound.

Isolation of peaks 1–4 was performed following the procedure previously described for isolation of paulomycins [35]. *S. albus* J1074 was grown in MFE medium at 30 °C for 120 h in five Erlenmeyer flasks (2 L), each containing 400 mL of medium; each flask was inoculated with spores and incubated in an orbital shaker at 250 rpm. Purification of the four peaks was performed by preparative HPLC using as solvent 57% methanol and 0.1% TFA in water in isocratic conditions optimized for each peak at 5 mL/min. After every purification step, the collected peaks were diluted with methanol and concentrated by solid-phase extraction (Sep-Pak C18, Waters) to remove acid traces that could affect the stability of the purified molecules. Finally, the compounds were dissolved in a 50% mixture of *tert*-butanol and H_2O-milliQ and lyophilized. Yield and productivity of each compound was as follows: **1**, 1.2 mg (0.6 µg/mL); **2**, 1.2 mg (0.6 µg/mL); **3**, 0.5 mg (0.25 µg/mL); and **4**, 0.5 mg (0.25 µg/mL).

The structural elucidation of compounds **1**–**4** was carried out at Fundación Medina (Granada, Spain) by a combination of LC-DAD-HRMS analysis carried out on an Agilent 1200 Rapid Resolution HPLC system coupled to a Bruker maXis mass spectrometer (Rivas-Vaciamadrid, Spain). For the NMR analyses, compounds **1**–**4** were dissolved in deuterated DMSO (DMSO-*d6*) and transferred to a 1.7 mm tube. Acquisitions were carried out on a Bruker AVANCE III 500 MHz spectrometer (Rivas-Vaciamadrid, Spain) equipped with a 1.7 mm TCI Microcryoprobe. All spectra were registered at 24 °C.

Peak 1: brownish amorphous powder; compound **1**: for ^{1}H and ^{13}C NMR data see Table 1; HRESIMS *m/z* 936.2739 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{38}H_{54}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 936.2739); compound **1′** (product **1** after abstraction of one molecule of H_2O): HRESIMS *m/z* 918.2636 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{38}H_{52}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 918.2631).

Peak 2: brownish amorphous powder; compound **2**: for ^{1}H and ^{13}C NMR data see Table 2; HRESIMS *m/z* 936.2737 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{38}H_{54}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 936.2739); compound **2′** (product **2** after abstraction of one molecule of H_2O): HRESIMS *m/z* 918.2630 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{38}H_{52}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 918.2631).

Peak 3: brownish amorphous powder; compound **3**: for ^{1}H and ^{13}C NMR data see Table 3; HRESIMS *m/z* 950.2893 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 936.2893); compound **3′** (product **3** after abstraction of one molecule of H_2O): HRESIMS *m/z* 932.2782 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 932.2787).

Peak 4: brownish amorphous powder; compound **4**: for ^{1}H and ^{13}C NMR data see Table 4; HRESIMS *m/z* 950.2899 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{39}H_{56}N_3O_{20}S_2{}^+$ = 936.2893); compound **4′** (product **4** after abstraction of one molecule of H_2O): HRESIMS *m/z* 932.2782 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{39}H_{54}N_3O_{19}S_2{}^+$ = 932.2787).

4.3. Biological Activity

The antibacterial activity of paulomycin derivatives, compounds **1**–**4**, was analyzed via determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The antifungal activity of paulomycin derivatives was tested against *Candida albicans*. MIC was evaluated using two serial dilutions of each compound, from 200 μg/mL to 3.12 μg/mL and from 150 μg/mL to 2.34 μg/mL, and bacterial cultures with an initial OD_{600} of 0.3. Growth on the microtiter plates was determined during 24 h of incubation at 37 °C.

The cytotoxic activity of compounds **1**–**4** was tested against the following human tumor cell lines: colon adenocarcinoma (HT29), non-small cell lung cancer (A549), breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), gastric carcinoma (AGS), promyelocytic leukemia (HL-60), pancreatic adenocarcinoma (CAPAN), and ovarian carcinoma (A2780). Mouse embryonic fibroblast cell line NIH/3T3 was used as control to evaluate cytotoxicity against non-malignant cells. Cells were previously grown for a week on DMEM-10% FBS medium, then aliquoted to 5000 cells per well in 96-well plates using the *Cell counting kit-8-(96992)* (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Spain) and grown for an extra 24 h. Compounds were dissolved in DMSO, keeping in mind that final concentration of DMSO in the assays should be kept at 0.1%. After the incubation, 10 μL of compound (in diverse concentrations) were added to each well and incubated for another 48 h. Lastly, 10 μL of CCK-8 reagent (Sigma-Aldrich) were added, left to develop for 2 h in the incubator, and measured at 450 nm using an *Elisa Bio-tek ELx 800* (BioTek, Winooski, VT, USA).

Supplementary Materials: ^{1}H-, ^{13}C-NMR, HMBC, HSQC, and NOESY spectra of compounds **1**–**4** are available as Supplementary Materials.

Acknowledgments: This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Grants, MINECO (BIO2012-33596 to J.A.S. and PIM2010EEI-00752 to C.M.), and "Apoyo a grupos de excelencia", Principado de Asturias-FEDER (FC-15-GRUPIN14-014). J.F.-D.l.H. predoctoral fellowship of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO (BES-2013-064704). We thank Fundación Bancaria Cajastur for financial support to C.O. We also like to thank Fernando Reyes from Fundación Medina for technical support in the structural elucidation of compounds.

Author Contributions: J.F.-D.l.H. performed the experiments. J.F.-D.l.H. and C.O. analyzed the data. C.M. and J.A.S. consulted for the project. J.A.S. and C.O. conceived and designed the experiments. C.O. wrote the manuscript. All the authors reviewed and approved the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chater, K.F.; Wilde, L.C. Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease Sall. *J. Bacteriol.* **1976**, *128*, 644–650. [PubMed]
2. Baltz, R.H. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 759–772. [CrossRef] [PubMed]
3. Zaburannyi, N.; Rabyk, M.; Ostash, B.; Fedorenko, V.; Luzhetskyy, A. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genom.* **2014**, *15*. [CrossRef] [PubMed]
4. Myronovskyi, M.; Tokovenko, B.; Brötz, E.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; Luzhetskyy, A. Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 795–806. [CrossRef] [PubMed]
5. Olano, C.; García, I.; González, A.; Rodriguez, M.; Rozas, D.; Rubio, J.; Sánchez-Hidalgo, M.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Salas, J.A. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, 242–256. [CrossRef] [PubMed]
6. Xu, F.; Nazari, B.; Moon, K.; Bushin, L.B.; Seyedsayamdost, M.R. Discovery of a cryptic antifungal compound from *Streptomyces albus* J1074 using high-throughput elicitor screens. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
7. Majer, J.; Chater, K.F. *Streptomyces albus* G produces an antibiotic complex identical to paulomycins A and B. *J. Gen. Microbiol.* **1987**, *133*, 2503–2507. [CrossRef] [PubMed]

8. González, A.; Rodríguez, M.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Salas, J.A.; Olano, C. New insights into paulomycin biosynthesis pathway in *Streptomyces albus* J1074 and generation of novel derivatives by combinatorial biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*. [CrossRef] [PubMed]
9. Wiley, P.F. A new antibiotic U-43120 (NSC-163500). *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 587–589. [CrossRef] [PubMed]
10. Argoudelis, A.D.; Brinkley, T.A.; Brodasky, T.F.; Buege, J.A.; Meyer, H.F.; Mizsak, S.A. Paulomycins A and B. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 285–294. [CrossRef] [PubMed]
11. Argoudelis, A.D.; Baczynskyj, L.; Haak, W.J.; Knoll, W.M.; Mizsak, S.A.; Shilliday, F.B. New paulomycins produced by *Streptomyces paulus*. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 157–169. [CrossRef] [PubMed]
12. Argoudelis, A.D.; Baczynskyj, L.; Mizsak, S.A.; Shilliday, F.B. *O*-demethylpaulomycins A and B, U-77,802 and U-77,803, paulomenols A and B, new metabolites produced by *Streptomyces paulus*. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1316–1330. [CrossRef] [PubMed]
13. Argoudelis, A.D.; Baczynskyj, L.; Buege, J.A.; Marshall, V.P.; Mizsak, S.A.; Wiley, P.F. Paulomycin-related antibiotics: Paldimycins and antibiotics $273a_2$. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 408–418. [CrossRef] [PubMed]
14. Argoudelis, A.D.; Baczynskyj, L.; Mizsak, S.A.; Shilliday, F.B.; Spinelli, P.A.; DeZwaan, J. Paldimycins A and B and antibiotics $273a_{2\alpha}$ and $273a_{2\beta}$. Synthesis and characterization. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 419–436. [CrossRef] [PubMed]
15. Eliopoulos, G.M.; Reiszner, E.; Moellering, R.C., Jr. In vitro evaluation of the new paulomycin antibiotic paldimycin. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **1987**, *6*, 306–308. [CrossRef] [PubMed]
16. Olano, C.; Méndez, C.; Salas, J.A. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 571–616. [CrossRef] [PubMed]
17. Olano, C.; Méndez, C.; Salas, J.A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 144–164. [CrossRef] [PubMed]
18. Zarins-Tutt, J.S.; Barberi, T.T.; Gao, H.; Mearns-Spragg, A.; Zhang, L.; Newman, D.J.; Goss, R.J. Prospecting for new bacterial metabolites: A glossary of approaches for inducing, activating andupregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 54–72. [CrossRef] [PubMed]
19. Wiley, P.F.; Mizsak, S.A.; Baczynskyj, L.; Argoudelis, A.D. The structure of paulomycin. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1273–1275. [CrossRef] [PubMed]
20. Wiley, P.F.; Mizsak, S.A.; Baczynskyj, L.; Argoudelis, A.D.; Duchamp, D.J.; Watt, W. The structure and chemistry of paulomycin. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2493–2499. [CrossRef]
21. Sarmiento-Vizcaíno, A.; Braña, A.F.; Pérez-Victoria, I.; Martín, J.; de Pedro, N.; Cruz, M.; Díaz, C.; Vicente, F.; Acuña, J.L.; Reyes, F.; et al. Paulomycin G, a new natural product with cytotoxic activity against tumor cell lines produced by deep-sea sediment derived *Micromonospora matsumotoense* M-412 from the Avilés canyon in the Cantabrian sea. *Mar. Drugs.* **2017**, *15*. [CrossRef] [PubMed]
22. Camery, J.R.; Hong, S.T.; Gould, S.J. Seongomycin: A new sulfur-containing benzo[b]fluorene derived from genes clustered with those for kanamycin biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3139–3142.
23. Gilpin, M.L.; Fulston, M.; Payne, D.; Cramp, R.; Hood, I. Isolation and structure determination of two novel phenazines from a *Streptomyces* with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo-β-lactamase. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1081–1085. [CrossRef] [PubMed]
24. Hooper, A.M.; Rickards, R.W. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. XI. Biological origins and semisynthesis of thionaphthomycins, and the structures of naphthomycins I and J. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 845–851. [CrossRef] [PubMed]
25. Omura, S.; Fujimoto, T.; Otoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 113–116. [CrossRef] [PubMed]
26. Stadler, M.; Bitzer, J.; Mayer-Bartschmid, A.; Müller, H.; Benet-Buchholz, J.; Gantner, F.; Tichy, H.V.; Reinemer, P.; Bacon, K.B. Cinnabaramides A–G: Analogues of lactacystin and salinosporamide from a terrestrial streptomycete. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 246–252. [CrossRef] [PubMed]
27. Schulz, D.; Nachtigall, J.; Riedlinger, J.; Schneider, K.; Poralla, K.; Imhoff, J.F.; Beil, W.; Nicholson, G.; Fiedler, H.P.; Süssmuth, R.D. Piceamycin and its *N*-acetylcysteine adduct is produced by *Streptomyces* sp. GB 4-2. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 513–518. [CrossRef] [PubMed]

28. Gomez-Escribano, J.P.; Song, L.; Fox, D.J.; Yeo, V.; Bibb, M.J.; Challis, G.L. Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the *cpk* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2716–2720. [CrossRef]
29. Woo, C.M.; Gholap, S.L.; Herzon, S.B. Insights into lomaiviticin biosynthesis. Isolation and structure elucidation of (−)-homoseongomycin. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1238–1241. [CrossRef] [PubMed]
30. Ikeda, H.; Shin-Ya, K.; Nagamitsu, T.; Tomoda, H. Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 325–342. [CrossRef] [PubMed]
31. Suhui, Y.; Molloy, B.; Braña, A.F.; Zabala, D.; Olano, C.; Cortés, J.; Moris, J.F.; Salas, J.A.; Méndez, C. Identification by genome mining of a type I polyketide gene cluster from *Streptomyces argillaceus* involved in the biosynthesis of pyridine and piperidine alkaloids argimycins P. *Front. Microbiol.* **2016**, *15*. [CrossRef]
32. Fukumoto, A.; Kim, Y.P.; Hanaki, H.; Shiomi, K.; Tomoda, H.; Omura, S. Cyslabdan, a new potentiator of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Streptomyces* sp. K04-0144 II. Biological activities. *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 7–10. [CrossRef] [PubMed]
33. Fernández, E.; Weissbach, U.; Sánchez Reillo, C.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Rohr, J.; Salas, J.A. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4929–4937. [PubMed]
34. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*; Current Protocols: Brooklyn, NY, USA, 1994.
35. Braña, A.F.; Rodríguez, M.; Pahari, P.; Rohr, J.; García, L.A.; Blanco, G. Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Arch. Microbiol.* **2014**, *196*, 345–355. [CrossRef] [PubMed]

Sample Availability: Samples of the compounds **1–4** are available from the authors.

© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).