



**Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**"Influencia de reguladores globales
sobre la producción de un nuevo
compuesto policetónico en
Streptomyces argillaceus"**

Javier González Valdés

2013-2014

Trabajo Fin de Máster

Quien me iba a decir a mi, 5 años atrás cuando comenzó esta nueva andadura, que un día como hoy estaría escribiendo estas líneas de agradecimiento a toda esa gente, que de una manera u otra, ha hecho que cada paso dado haya sido firme y hacia delante.

Sé que seré injusto porque por suerte siempre he estado rodeado de muchas y, sobre todo, muy buenas personas. Desde aquí, **GRACIAS A TODOS**, los más cercanos y los que están más lejos, los que habéis estado y ya no estáis, o los que llegasteis y os quedareis para toda la vida. Nada hubiese sido lo mismo sin cada uno de vosotros.

Me gustaría comenzar agradeciendo a Carmen y a Salas por brindarme esta grandísima oportunidad y poder pertenecer a este grupo histórico, científica como personalmente. Mención especial a Carmen por su plena confianza en mi, su paciencia y sus millones de buenas correcciones.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio, porque aunque la "ciencia es ciencia", vosotros lo hacéis un poquito más fácil. Olano, Leire, Raúl, Carolina, Brian, Suhui, Armando, Adriana y Jorge, gracias por absolutamente todo.

No sería justo conmigo mismo si no los nombrase a parte:

Dr. Dani Z, fue corto pero creo que más intenso sería difícil, gracias por confiar en mi desde el minuto cero y, aún estando lejos ahora, ambos sabemos que nos tendremos ahí para siempre.

Susana y Arantxa, Susan y Achi, Tata y Mama... tantas cosas que agradeceros que no tengo claro ni por donde empezar. Me habéis ayudado y aportado tanto que estaré en duda con vosotras toda mi vida. Creo que sois de lo bueno, lo mejor.

Gracias a toda esa gente que aún estando en otros laboratorios, no conviviendo el día a día, han aportado su granito de arena en esta mi historia. He tenido la gran suerte de conocer a personas excepcionales, unas que siguen por aquí y otras se han tenido que marchar ya, pero desde aquí os mando toda la suerte del mundo en vuestros caminos, que nunca os abandone la estrella que tenéis y ojalá nos volvamos a encontrar.

Por otra parte, también me gustaría agradecer a Blázquez y a Dani. Creo que no habría llegado a donde estoy sin vosotros, sois pieza clave en mi vida. El mejor regalo que Biotec me dio: Os quiero Uubus!

Finalmente, Tino, Ceci, Lau y también Clau. Gracias. Gracias. Y gracias otra vez. Como dijo Jean Massieu "la gratitud es la memoria del corazón" y ahí me acompañaréis para toda la vida.

Javi

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
1.1. EL CÁNCER	2
1.2. QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL	3
1.3. ACTINOMICETOS	5
1.4. BÚSQUEDA Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS	7
1.5. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR <i>STREPTOMYCES</i>	10
1.6. MEJORA EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTITUMORALES	11
1.7. <i>STREPTOMYCES ARGILLACEUS</i>	13
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1. MICROORGANISMOS	16
2.2. PRODUCTOS QUÍMICOS	16
2.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	17
2.4. CUANTIFICACIÓN POR PESO SECO	18
2.5. EXTRACCIÓN DEL COMPUESTO POLICETÓNICO Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	18
RESULTADOS	
3. VALORACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTOS REGULADORES GLOBALES DE <i>S. ARGILLACEUS</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL <i>CLUSTER 1701</i>	20
3.1. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE GENES REGULADORES GLOBALES EN LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL <i>CLUSTER 1701</i>	21
3.2. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE GENES REGULADORES GLOBALES EN LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL <i>CLUSTER 1701</i>	26
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	33
BIBLIOGRAFÍA	34

El objetivo del presente trabajo Fin de Máster ha sido determinar la influencia de distintos reguladores globales del metabolismo secundario de *Streptomyces argillaceus* (*nsdAa*, *afsSa*, *dasRa*, *3818a* y *areBa*) en la producción de una familia de compuestos policetónicos recientemente identificados, codificados por el *cluster* 1701 de *S. argillaceus*. Para ello se ensayó la producción de dichos compuestos por cepas mutantes de *S. argillaceus* en dichos genes reguladores y en aquéllos casos donde la producción de los compuestos se vio afectada, se ensayó también el efecto de sobreexpresar esos reguladores globales.

Se ha podido determinar que la sobreexpresión de los genes *dasRa*, *areBa* y *3818a* en *S. argillaceus* incrementan la producción de los compuestos policetónicos del *cluster* 1701 entre 2'2 y 8'4 veces.

INTRODUCCIÓN



1.1. EL CÁNCER

El cáncer se podría definir como el término genérico que engloba a un conjunto de enfermedades en las que células normales de cualquier parte del cuerpo sufren una transformación, de modo que se desregulan y multiplican sin control pudiendo llegar a invadir otros órganos y tejidos. Las células cancerosas tienen defectos en los circuitos regulatorios que gobiernan la proliferación y homeostasis de una célula normal, por lo que sufren una transformación que evoluciona hasta el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la evolución de una célula sana hasta convertirse en tumoral no es un proceso bien establecido y definido, sino la adquisición de una serie de características, de forma secuencial y aleatoria, que permiten a la célula evadir los mecanismos de control de la proliferación celular y continuar su multiplicación indefinida (Hanahan y Weinberg, 2011).

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer y subtipos según el órgano afectado. Cada uno de ellas con características particulares, pudiendo considerarse incluso enfermedades independientes que varían en sus manifestaciones clínicas, en su evolución y en su tratamiento específico, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes. Una posible relación entre los diferentes tipos de cáncer fue propuesta por Hanahan y Weinberg en el año 2000 (Hanahan y Weinberg, 2000), que determinan 6 posibles alteraciones esenciales en la fisiología de la célula para explicar el crecimiento anómalo. Estas características se podrían resumir en la autosuficiencia a las señales de crecimiento y desarrollo, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión a la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenible e invasión de tejidos y metástasis. Más recientemente se añadió la capacidad de evasión al sistema inmunológico (Kroemer y Pouyssegur, 2008) y diferentes fenotipos de estrés como el metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo así como el daño en el ADN y las distintas relaciones que se establecen entre estas alteraciones de la célula tumoral (Figura 1.1; Luo *et al.*, 2009).

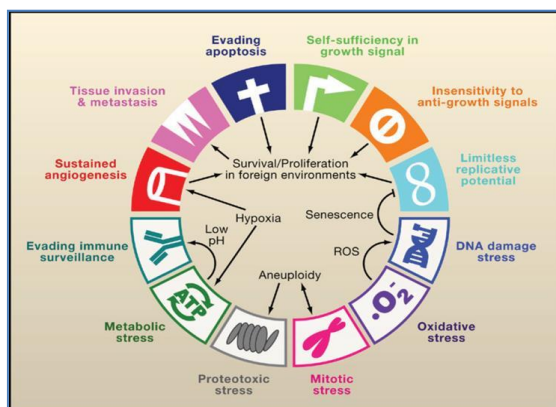


Figura 1.1. Representación esquemática de las características que pueden presentar células tumorales y las relaciones que se establecen entre ellas (Luo *et al.*, 2009).

La transformación de la célula normal en una tumoral es un proceso progresivo desde una lesión precancerosa hasta el tumor maligno. Esas modificaciones son el resultado del acúmulo de cambios debidos a las interacciones entre diferentes factores de riesgo, de tipo genético (suponen un bajo porcentaje) y de tipo ambientales, físicos (luz UV, radiación ionizante), químicos (tabaco...) o biológicos (infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos). Además el envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer, aumentando la incidencia de cáncer espectacularmente con la edad.

Según datos revelados por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS-web CancerMondial de IARC <http://www-dep.iarc.fr/>), alrededor de 14,1 millones de personas desarrollaron un cáncer durante 2012. Además, como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, se le atribuyen 8,2 millones de defunciones (13% de las defunciones mundiales) ocurridas en 2012. Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad mundial anual son cáncer de pulmón (1,59 millones de defunciones) y de hígado (746.000 defunciones), seguidos por cáncer de estómago, colon y mama. Además, como consecuencia del incremento de la esperanza de vida y de la exposición a carcinógenos, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años (Clapp *et al.*, 2008). Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 14 millones en 2030.

1.2. QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL

El estudio e identificación de los cambios genéticos responsables del desarrollo tumoral, y la caracterización de los procesos celulares en los que participan estos genes, han mejorado sustancialmente el control de determinados tipos de cáncer gracias al progreso en tres áreas fundamentales: diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Novo, 2008).

Actualmente, el tratamiento del cáncer se lleva a cabo principalmente a cuatro niveles: quimioterapia, cirugía, radioterapia e inmunoterapia (Awada *et al.*, 2004). Los últimos avances científicos y tecnológicos han permitido mejorar estos

tratamientos haciendo más fácil el control de determinados tipos de cáncer, así como sus posibles recidivas y efectos secundarios.

La quimioterapia, uno de los tratamientos más ampliamente utilizados, consiste en el uso de fármacos para destruir (citotóxicos) o para frenar (citostáticos) el crecimiento de las células cancerosas. La mayoría de los fármacos quimioterápicos actúan afectando a la división celular y a la síntesis o función del ADN (Gredicak y Jeric, 2007). El primer compuesto citotóxico que se estudió para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer fue la iperita o gas mostaza que se utilizó inicialmente como arma militar en la Primera Guerra Mundial. Desde entonces se han descubierto y desarrollado gran cantidad de compuestos antitumorales que poseen actividad biológica que repercuten en el desarrollo, multiplicación o diferenciación del organismo vivo en el que actúan (Lancini y Lorenzetti, 1993), existiendo en la actualidad más de un centenar de medicamentos diferentes para combatir la enfermedad y prevenir el crecimiento, multiplicación y diseminación de las células malignas (Bérdy, 2005).

El mayor problema del uso de estos fármacos en el tratamiento del cáncer es la carencia de toxicidad selectiva, puesto que al tratarse de células del propio organismo resulta muy difícil identificar dianas que sean exclusivas de las células cancerosas. Todo esto se traduce en unos efectos secundarios que dificultan su administración. Por otra parte, también existe el problema de la aparición de tumores resistentes o multirresistentes a los tratamientos actuales, debido a que las células malignas van acumulando mutaciones que pueden afectar a la diana sobre la que se esté actuando o a la incorporación del fármaco a las células, y conferirles ventaja bajo la presión selectiva del quimioterápico.

Los agentes empleados hoy en día en las terapias oncológicas pueden dividirse en varias categorías atendiendo a su modo de acción y a cómo afectan a las células malignas (Rang *et al.*, 2008):

- ◆ **Agentes alkilantes:** compuestos que actúan formando enlaces covalentes con grupos nucleofílicos presentes en el ADN impidiendo así su replicación.
- ◆ **Antimetabolitos:** bloquean las vías metabólicas involucradas en la síntesis de ADN. Afectan a la etapa de síntesis de ADN del ciclo celular.

- ◆ **Antibióticos antitumorales:** sustancias naturales de origen microbiano cuyo efecto se debe fundamentalmente a su acción directa sobre el ADN.
- ◆ **Alcaloides de la vinca y relacionados:** compuestos derivados de plantas que impiden la formación del huso mitótico y producen la interrupción de la metafase.
- ◆ **Hormonas:** se utilizan para el tratamiento de tumores sensibles a hormonas. Su crecimiento puede inhibirse mediante hormonas con efectos opuestos, por antagonistas hormonales, o por fármacos que inhiban la síntesis de dichas hormonas.
- ◆ **Otros fármacos:** grupo muy heterogéneo que comprende nuevos fármacos que han sido diseñados para atacar dianas específicas relacionadas con el tumor.

Los antibióticos antitumorales producidos por microorganismos (bacterias y hongos) son un grupo muy importante dentro de los compuestos quimioterápicos y son utilizados por la industria farmacéutica dada su abundancia y diversidad estructural. Los compuestos de origen microbiano más utilizados son los producidos por bacterias aisladas de ecosistemas terrestres pertenecientes al orden Actinomycetales (Bérdy, 2005; Newman y Cragg, 2012). Además en los últimos años también se han convertido en una importante fuente de nuevos compuestos antitumorales los actinomicetos aislados de ecosistemas marinos (Hong *et al.*, 2009).

1.3. ACTINOMICETOS

El orden Actinomycetales está conformado por 11 subórdenes que comprenden 139 géneros (*Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 2001). Son microorganismos Gram positivos, en forma de bacilos o filamentosos, que forman filamentos ramificados, dando lugar a una estructura denominada micelio. Se encuentran distribuidos ampliamente, pero predominan sobre todo en el suelo, constituyendo entre el 20-60% de la población microbiana del mismo. Algunas especies son patógenas de humanos, animales o plantas, pero la gran mayoría presentan interés biotecnológico ya que son capaces de producir una gran cantidad de compuestos bioactivos incluyendo antibióticos, compuestos antitumorales,

inmunosupresores, antivirales, agentes antiparasitarios y compuestos para la inactivación de enzimas.

Existen unos 23000 metabolitos secundarios bioactivos descritos, y solamente unos 150 han sido desarrollados por compañías farmacéuticas. Aproximadamente 10000 de estos compuestos son producidos por actinomicetos, representando un 45% del total, aumentando al 80% si sólo tenemos en cuenta aquellos compuestos actualmente en uso. Dentro de los actinomicetos destacan como productores de metabolitos con actividad terapéutica: *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Streptoverticillium* y *Actinomadura* (Horan, 1994; Labeda y Shearer, 1990; Bérdy, 1989). Pero sobre todos ellos hay que resaltar el género *Streptomyces* como productor de unos 7600 compuestos, constituyendo un 75% del total (Bérdy, 2005), destacando sobre todo que gran parte de estos compuestos presentan actividad antitumoral, y por su versatilidad en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Méndez y Salas, 2003).

1.3.1 El género *Streptomyces*: productor de compuestos bioactivos

El género *Streptomyces* comprende un grupo de bacterias Gram positivas aerobias estrictas, con un alto contenido G+C, cuyo hábitat natural es el suelo. Son bacterias muy versátiles nutricionalmente y se caracterizan por poseer un metabolismo secundario, durante el cual se generan diversos compuestos de interés industrial (antibióticos, herbicidas, antifúngicos, antitumorales...), y un ciclo de diferenciación morfológica complejo (Figura 1.2). Tomando como modelo *Streptomyces coelicolor*, el estreptomiceto mejor caracterizado, el ciclo se inicia con la germinación bajo condiciones favorables de una espora que dará lugar al micelio sustrato, formado por hifas ramificadas que se unen fuertemente al medio donde crecen. Tras 2 o 3 días, se produce el crecimiento de las hifas que constituirán el micelio aéreo. Por último debido a cambios metabólicos, se detiene el crecimiento de las hifas y se produce la septación de las mismas, de modo que se lleva a cabo la individualización de los genomas en nuevas esporas que al germinar cierran el ciclo biológico (Kieser *et al.*, 2000).

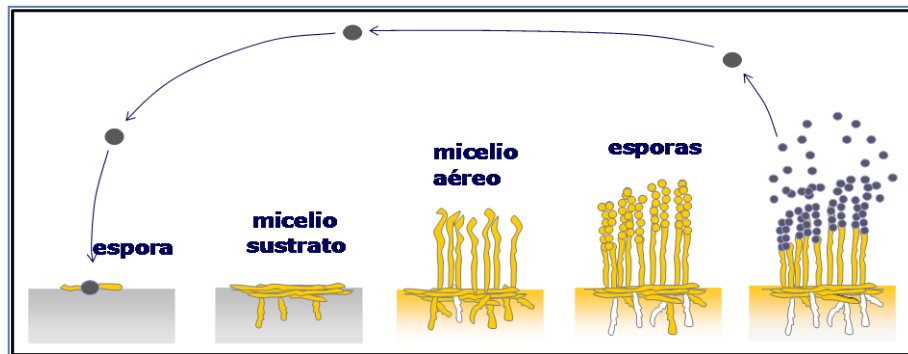


Figura 1.2. Ciclo de diferenciación morfológica de *Streptomyces*.

Los *Streptomyces* son los organismos más importantes como productores de compuestos con actividad biológica (Méndez y Salas, 2003). Producen todo tipo de moléculas bioactivas con diversas e interesantes funciones. Cabe destacar la gran variedad de antibióticos que producen (Bérdy, 2005), llegando a representar hasta la cuarta parte de todos los antibióticos conocidos.

1.4. BÚSQUEDA Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

Durante los últimos años, el avance en diferentes áreas de trabajo relacionadas con la investigación en antitumorales ha permitido obtener más y mejores fármacos contra las dianas de las células tumorales. Si bien las mejoras han sido sustanciales, aún existen muchos problemas en este sentido. Uno de los principales es la escasa toxicidad selectiva de los compuestos, es decir, los fármacos actúan tanto sobre la célula tumoral como sobre la célula normal, de modo que el tratamiento resulta nocivo para el paciente. Otro problema importante es la aparición en las células cancerosas de resistencia a los fármacos antitumorales, motivos por los cuales se produce una importante demanda de búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con dicha actividad.

Una posibilidad para identificar nuevos fármacos, es la revisión de moléculas caracterizadas en cuanto a su actividad biológica como antibióticos, pero que son reanalizadas como antitumorales al ser ensayadas frente a distintas dianas tumorales. Otra estrategia clásica sería realizar la búsqueda o “screening” de nuevos microorganismos en ambientes poco explorados como por ejemplo ambientes marinos, desiertos o selvas tropicales. Actualmente se cree que se ha explorado en torno a un 1% de la diversidad microbiana, con lo que la naturaleza aún sería una importante fuente de recursos (Lefevre *et al.*, 2008). En este sentido existen

microorganismos marinos en simbiosis con organismos como esponjas que pueden producir moléculas desconocidas con actividades interesantes. Algunos compuestos como el Yondelis®, aislado por la empresa Pharmamar (<http://www.pharmamar.com/>) a partir del tunicado *Ecteinascidia turbinata* ya está comercialmente aprobado para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos avanzado o metastásico, tratamiento del cáncer de ovario recurrente platinosensible y actualmente en fase II para cáncer de mama, de próstata, de pulmón y para tumores pediátricos.

Otra estrategia para generar nuevos compuestos es la química combinatoria, técnica que consiste en introducir modificaciones químicas aleatorias en compuestos bioactivos existentes, o la síntesis de nuevos compuestos basados en los ya conocidos con el fin de obtener una librería de compuestos semisintéticos o sintéticos que pueden ser utilizados como posibles fármacos contra diferentes líneas celulares tumorales. Una de las ventajas de esta técnica es la multitud de nuevos compuestos obtenidos y la automatización del proceso de síntesis que permite el ahorro de tiempo y dinero (Newman y Cragg, 2012).

El reciente auge en la secuenciación y análisis de genomas de actinomicetos y en particular del género *Streptomyces* ha revelado la presencia de 24 a 34 agrupaciones de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en cada uno de ellos, no asociados previamente con la producción de ningún compuesto. Hasta hace relativamente poco, se pensaba que un microorganismo era capaz de producir un pequeño número determinado de metabolitos secundarios. Sin embargo, en la actualidad se sabe que éstos poseen, cuanto menos, la información genética necesaria para producir muchos más. Con el descubrimiento y caracterización de numerosas agrupaciones de genes de biosíntesis se establecieron los principios básicos sobre la maquinaria biosintética. Este hecho convierte la “minería genómica” en una vía para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Estas nuevas rutas de biosíntesis previamente desconocidas y en su mayoría silentes o crípticas en condiciones de laboratorio, se convierten por lo tanto en nuevos objetivos de estudio para su manipulación y modificación genética (Zerikly y Challis, 2009) a través de distintas estrategias como la biosíntesis combinatoria, técnica que consiste en la utilización de la ingeniería genética para conseguir lograr la coexistencia de genes de dos o más rutas de biosíntesis distintas en un microorganismo productor de un

compuesto activo, con la finalidad de generar así compuestos híbridos (Méndez y Salas, 2003; Floss, 2006).

Debido al interés biotecnológico que presenta el género *Streptomyces*, se ha secuenciado el genoma de un gran número de especies. El primer actinomiceto secuenciado fue *S. coelicolor* A3(2) en el año 2002 (Bentley *et al.*, 2002), del que se conocía que producía 4 metabolitos secundarios. Sin embargo, tras la secuenciación de su genoma y la aplicación del “genome mining” se identificaron 18 rutas huérfanas (Gross, 2007). Posteriormente, fueron secuenciados *S. avermitilis*, *S. peucetius*, *S. ambofaciens* y *S. griseus* IFO 13350, (Ikeda *et al.*, 2003; Parajuli *et al.*, 2004; Choulet *et al.*, 2006 y Ohnishi *et al.*, 2008). En los últimos años el avance y abaratamiento de las técnicas de secuenciación ha permitido identificar en diversas cepas de *Streptomyces* gran cantidad de agrupamientos de genes de biosíntesis de compuestos de metabolitos secundarios que eran desconocidos hasta el momento (Lautru *et al.*, 2005; Claesen y Bibb, 2010). Esto genera la posibilidad de aislar e identificar compuestos con nuevas actividades biológicas. En muchos casos, los microorganismos estudiados no producen dichos compuestos en condiciones de laboratorio, de modo que es de gran importancia la activación y optimización de las producciones.

Streptomyces posee un cromosoma lineal de unas 8 Mb (Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1991), en cuyos extremos presenta repeticiones invertidas (TIRs) y proteínas unidas covalentemente a los extremos 5'. Este tamaño es inusualmente grande para una bacteria (*Escherichia coli* 4,6 Mb), lo que hace del cromosoma de *Streptomyces* único en su estructura y tamaño (Omura *et al.*, 2001). Presentan un gran número de genes esenciales de metabolismo primario en la parte central del cromosoma mientras que en los brazos tienen de 24 a 34 agrupaciones de genes de metabolismo secundario, lo que supone en torno al 5% del genoma total del microorganismo. Este hecho muestra la gran importancia del metabolismo secundario para este tipo de bacteria y permite muchas posibilidades de estudio y un gran potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos (Challis, 2008; Zerikly y Challis, 2009).

1.5. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR *STREPTOMYCES*

La producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* generalmente coincide con el desarrollo del micelio aéreo, en medio sólido, y con la fase estacionaria, en el líquido. La expresión de los genes del metabolismo secundario está controlada por diferentes familias de proteínas reguladoras, algunas de las cuales se encuentran sólo en actinomicetos y son inducidas por moléculas de señalización intra y extracelulares (Bibb, 2005).

Existen distintos niveles de regulación: en el nivel más alto, se encuentran los **genes de regulación global o pleiotrópicos**, genes localizados fuera de la agrupación de genes del *cluster* pero relacionados con su biosíntesis, que codifican reguladores globales y actúan incrementando o disminuyendo los niveles de expresión. Éstos se pueden dividir en:

- ◆ Genes de **regulación global** (como *bldA*, *bldB*, *bldD* o *bldG* en *S. coelicolor*) que constituyen el nivel más alto de regulación y afectan tanto a la diferenciación morfológica como a la biosíntesis de antibióticos (Wencheng *et al.*, 2006).
- ◆ Genes reguladores que afectan a varias rutas de biosíntesis distintas y forman el **nivel intermedio de regulación** (como *afsB*, *abaA*, *absA1A2*, *afsK-afsR*, *tcrA* o sistemas de dos componentes).
- ◆ En el nivel más bajo se encuentran los **genes reguladores específicos de ruta** localizados dentro del *cluster* de biosíntesis del compuesto. Por ejemplo, en el *cluster* de biosíntesis de la mitramicina se han identificado 2 genes de regulación positiva específicos de ruta: *mtmR* y *mtrY* (Lombó *et al.*, 1999; García-Bernardo *et al.*, 2000).

Hasta el momento aún no se ha descrito ningún gen de regulación global en *S. argillaceus*, pero se trata de un tema en estudio actualmente (Susana Álvarez García, comunicación personal).

1.6. MEJORA DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS

En los últimos años se han generado nuevos compuestos o derivados de éstos mediante diferentes estrategias (Apartado 1.4). El mayor inconveniente surge de la productividad de estos compuestos ya que es muy variable y a veces los rendimientos no son muy elevados. Para desarrollar nuevos compuestos para aplicación clínica es necesario que estos compuestos se produzcan en cantidades suficientes, lo que en muchas ocasiones resulta difícil porque el microorganismo natural no lo sintetiza en las cantidades adecuadas para poder llevar a cabo ensayos preclínicos. Por esta razón, es importante tanto la optimización de las condiciones del medio de cultivo (nutrientes, pH, temperatura y presión de oxígeno), como las modificaciones de las cepas productoras desde el punto de vista genético.

Los programas de mejora de la producción de compuestos de interés por actinomicetos consistían en mutagenizar la cepa productora y posteriormente seleccionar cepas con mejores producciones. Sin embargo, actualmente, con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, el conocimiento de los genes de biosíntesis de muchos compuestos y el conocimiento de la secuencia de varios genomas de *Streptomyces*, se puede abordar de una forma más racional la mejora de la producción de compuestos por microorganismos.

Las estrategias de mejora de cepas se pueden enfocar a distintos niveles, presentando como finalidad el incremento en la producción final del compuesto (Figura 1.3.):

a) Una posible estrategia sería la **manipulación de genes pleiotrópicos** de regulación global que están fuera de la ruta de biosíntesis del compuesto. En este caso se pueden expresar genes que actúen regulando positivamente la biosíntesis del metabolito secundario o inactivar aquellos que lo hacen negativamente. En *S. coelicolor* se han identificado distintos genes que actúan sobre el regulador específico de la ruta de actinorrodina en una compleja red de regulación global. Por ejemplo, la inactivación del gen *absA2* que codifica una proteína que forma parte de un sistema de transducción de señales de dos componentes, genera un importante incremento en la producción de actinorrodina identificando al gen como un regulador negativo de la producción (Brian *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2001). Otro ejemplo sería el gen *atrA* (Actinorhorin Associated Transcripcional Regulator)

miembro de la familia de reguladores tipo TetR que ha sido caracterizado como activador de la producción de actinorrodina. La inactivación de *atrA* genera una disminución en los niveles de producción del compuesto (Uguru *et al.*, 2005) mientras que la sobreexpresión en la cepa silvestre de *S. coelicolor* aumenta significativamente la producción de actinorrodina en todas las condiciones ensayadas (Towle, 2007).

b) Otra estrategia que se podría emplear para aumentar la producción de un compuesto, es realizar modificaciones directamente sobre genes de las **agrupaciones de biosíntesis del metabolismo secundario**. En este caso se puede actuar sobreexpresando genes activadores, de resistencia, estructurales y/o eliminar la expresión de genes represores de la ruta. En *S. coelicolor* existen multitud de trabajos realizados con los diferentes genes de la ruta de biosíntesis de actinorrodina. La inactivación del gen regulador *actII-orf4* genera un bloqueo en la producción del compuesto mientras que su sobreexpresión produce un importante aumento en la producción de actinorrodina (Fernández-Moreno *et al.*, 1991; Gramajo *et al.*, 1993). Otro claro ejemplo es el gen *mtmR* de la ruta de biosíntesis de mitramicina que codifica para una proteína reguladora tipo SARP (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein*). La sobreexpresión del gen *mtmR* en la cepa productora *S. argillaceus* genera un incremento en la producción final de mitramicina 16 veces superior a la cepa original (Lombó *et al.*, 1999). Además *mtmR* también fue capaz de activar la biosíntesis de actinorrodina y complementar la mutación del gen *actII-orf4* en *S. coelicolor* JF1 restaurando la producción del compuesto (Lombó *et al.*, 1999).

c) Finalmente existe otra estrategia denominada **ingeniería metabólica** que consiste en modificar el metabolismo primario a nivel de expresión de proteínas o a nivel del incremento y canalización de precursores biosintéticos hacia el metabolismo secundario para incrementar de esta forma la producción del compuesto. Un trabajo reciente de este grupo describe la mejoría de la producción de mitramicina en *S. argillaceus* a través del aporte de precursores como Malonil-CoA y Glucosa-1-fosfato (Zabala *et al.*, 2013).

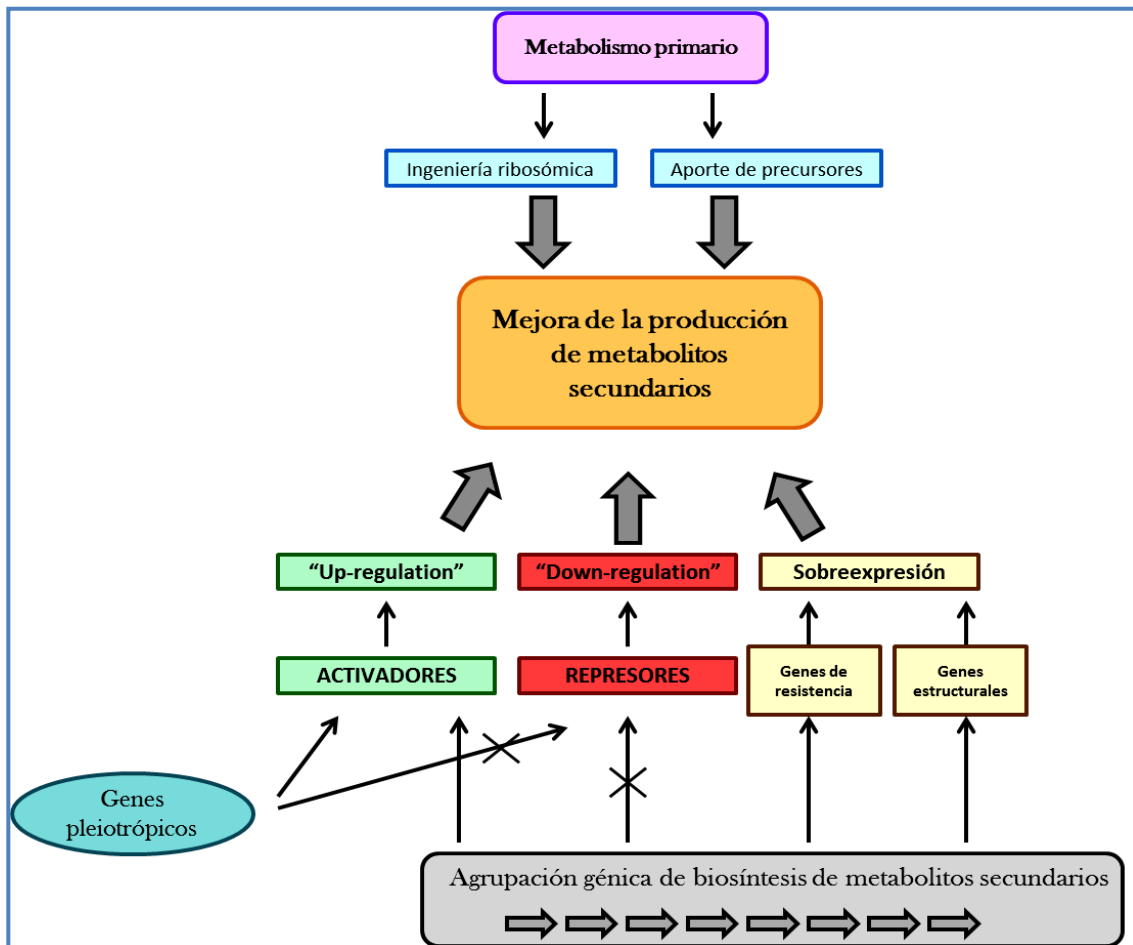


Figura 1.3. Esquema de las diferentes estrategias utilizadas para el incremento de producción de metabolitos secundarios (Olano *et al.*, 2008).

1.7. *STREPTOMYCES ARGILLACEUS*

Streptomyces argillaceus es el microorganismo productor del antitumoral mitramicina (Lombó *et al.*, 1996). Recientemente, se ha secuenciado su genoma completo (grupo de investigación Dra. Carmen Méndez y Dr. Jose Antonio Salas, UNIOVI). El análisis “*in silico*” de la secuencia del genoma de *S. argillaceus*, permitió descubrir que dicho genoma posee 29 agrupaciones de genes de biosíntesis codificadoras de compuestos que podrían tener actividad biológica, la mayoría de las cuales no se expresan bajo las condiciones estándar de laboratorio (Méndez y Salas, datos sin publicar).

En trabajos previos no publicados realizados por Suhui Ye Huang (comunicación personal) se ha identificado un agrupamiento de genes que podrían codificar la biosíntesis de un compuesto desconocido hasta el momento en *S. argillaceus*. Este agrupamiento de genes (**cluster 1701**) contiene varios genes que codifican un compuesto de tipo policetónico. Al analizar cultivos de la cepa silvestre y una cepa mutada en este agrupamiento génico con cromatografía líquida de muy alta eficacia (UPLC), se identificaron 7 picos diferenciales relacionados con la agrupación 1701. Los **picos 1 y 2**, con máximos de absorción a 400 nm, corresponderían a los compuestos finales de la ruta (Figura 1.4A), el **pico 3**, con un máximo de absorción a 350 nm (Figura 1.4B) y los **picos 4, 5, 6 y 7** con máximos de absorción a 280 nm (Figura 1.4C), podrían ser intermediarios de la ruta de biosíntesis.

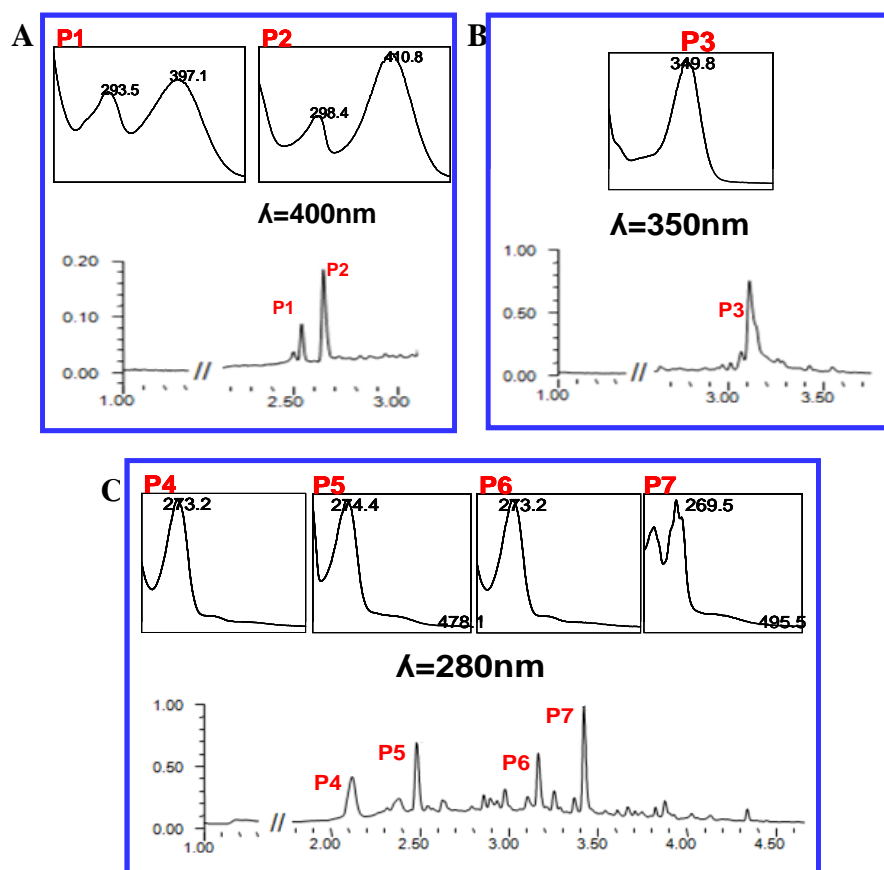


Figura 1.4. Cromatogramas y espectros de absorción de UPLC de extractos de butanol de cultivos de *S. argillaceus*: **A)** Picos 1 y 2 a 400 nm. **B)** Pico 3 a 350nm. **C)** Picos 4, 5, 6 y 7 a 280nm.

Dado el posible interés de estos compuestos descubiertos en *S. argillaceus*, es importante obtener cepas que presenten buenos niveles de producción para su purificación y faciliten los posteriores estudios a realizar.

OBJETIVOS

El objetivo global del presente Trabajo Fin de Máster fue la mejora de la producción de los nuevos compuestos policetónicos codificados por el *cluster* 1701. Se fijaron además los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de la producción de los compuestos del *cluster* 1701 por cepas de *S. argillaceus* con mutaciones en determinados genes reguladores globales.
- Estudio de la producción de los compuestos del *cluster* 1701 por cepas de *S. argillaceus* sobreexpresando determinados genes reguladores globales.

MATERIAL Y MÉTODOS



2.1. MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo así como su genotipo y procedencia se indican en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1. Microorganismos utilizados en este trabajo.

Organismo	Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Streptomyces argillaceus</i> (WT)	ATCC 12956	Productor de mitramicina	American Type Culture Collection
<i>S. argillaceus</i> $\Delta nsdAa$	--	Gen <i>nsdAa</i> inactivado	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> $\Delta afsSa$	--	Gen <i>afsSa</i> inactivado	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> $\Delta areBa$	--	Gen <i>areBa</i> inactivado	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> $\Delta dasRa$	--	Gen <i>dasRa</i> inactivado	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> $\Delta 3818a$	--	Gen <i>3818a</i> inactivado	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> pEM4	--	Contiene el vector de expresión pEM4	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> pEM4 <i>areBa</i>	--	Gen <i>areBa</i> sobreexpresado en multicopia	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> pEM4 <i>dasRa</i>	--	Gen <i>dasRa</i> sobreexpresado en multicopia	Susana Álvarez García (datos no publicados)
<i>S. argillaceus</i> pEM4 <i>3818a</i>	--	Gen <i>3818a</i> sobreexpresado en multicopia	Susana Álvarez García (datos no publicados)

2.2. PRODUCTOS QUÍMICOS

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

El antibiótico **tioestreptona** se ha empleado cuando fue necesario, a una concentración final de 25 µg/ml (medio sólido) o 5 µg/ml (medio líquido).

2.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

2.3.1. Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 20 minutos.

2.3.1.2. Medios para el cultivo de *Streptomyces*

- **Medio A** (Sánchez and Braña, 1996): Medio sólido utilizado para la esporulación de *Streptomyces*. Composición: MOPS (21g/l), glucosa (5g/l), extracto de levadura (0,5 g/l), extracto de carne (0,5 g/l), casaminoácidos (1 g/l), agar (22 g/l). Ajustar a pH 7 con KOH antes de autoclavar.
- **Medio TSB** (Tryptone Soya Broth, Merck): Medio líquido comercial utilizado para obtener preinóculos de *Streptomyces*. Si se añaden 22 g/l de agar se obtiene medio TSB sólido, llamado medio **TSA**. Estos medios también pueden ser utilizados con *E. coli*.
- **SM10** (Medio de EntreChem S.L.): Medio líquido empleado para ensayos de producción, óptimo para el análisis de producción de los compuestos policetónicos. Composición: MOPS (20.9 g/l), L-Prolina (11.5 g/l), Glicerol (23 g/l), NaCl (0.5 g/l), K₂HPO₄ (2.1 g/l), Na₂SO₄ (0.28 g/l), MgSO₄ 0.02M (10 ml/l), CaCl₂ 0.02M (10 ml/l), oligoelementos (5 ml/l). Ajustar a pH 6.5 con KOH antes de autoclavar.

2.3.2. Condiciones de cultivo de *Streptomyces*

En general, para realizar los cultivos líquidos de *Streptomyces* se partió de un preinóculo en TSB. Para ello se inoculó dicho cultivo con una suspensión de esporas en glicerol, previamente recogidas de placas crecidas a 30°C durante 7 días. Los cultivos se incubaron en matraces lisos de 50 ml con 10 ml de TSB a 30°C y en agitación de 250 rpm durante 36-48 horas.

Los cultivos en los distintos medios se realizaron en matraces lisos de 250 ml que contenían 50 ml del medios de cultivo SM10 inoculado con la cantidad de preinóculo necesaria para obtener una densidad óptica final de 0,2 (nunca

superando los 2 ml de preinóculo por matraz). Los matraces se incubaron a 30°C y 250 rpm durante ocho días; se tomaron muestras de 1 ml de cada uno de los matraces a los tiempos 24, 48, 72, 96, 120 y 144, para evaluar la producción del compuesto y determinar el crecimiento mediante la cuantificación por peso seco.

2.3.3. Condiciones de conservación

Para conservar las cepas de *Streptomyces* se recogieron esporas de cultivos en medios sólidos cultivadas a 30°C durante 7 días, y se conservaron en una solución de glicerol al 20% a una temperatura de -20°C.

2.4. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO POR PESO SECO

Para cuantificar el crecimiento de los cultivos líquidos de *Streptomyces* se valoró su peso seco por unidad de volumen. Para ello, se recogieron 2 ml de cultivo en un tubo eppendorf previamente pesado en balanza de precisión, se centrifugaron cinco minutos a 13200 rpm, para eliminar el sobrenadante, y el micelio precipitado se resuspendió con agua MilliQ, tras lo cual volvió a ser precipitado mediante centrifugación y lavado de nuevo. Tras una última centrifugación, el micelio, ya libre de sales y restos de cultivo, fue deshidratado a 60 °C durante 80 horas. Se pesó el eppendorf con el micelio seco en una balanza de precisión y se calculó la biomasa existente en los dos mililitros de cultivo originales como el incremento de masa entre el tubo vacío y el tubo con micelio desecado.

2.5. EXTRACCIÓN DEL COMPUESTO POLICETÓNICO Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

2.5.1. Extracción de compuestos

Se cuantificó la producción de compuestos codificados por el *cluster* 1701, en muestras de 1 ml de cultivo de cada una de las cepa ensayadas. Para ello se realizó una extracción doble con butanol, utilizando 1 ml del solvente orgánico. Tras evaporar el solvente en una centrífuga de vacío "Speed-vac", el extracto seco se resuspendió en 60 µL de DMSO-metanol para su posterior análisis.

2.5.2. Análisis por UPLC

El sistema de identificación y análisis cuantitativo de los diferentes picos correspondientes a los compuestos policetónicos codificados por el *cluster* 1701, se llevó a cabo mediante cromatografía en fase reversa en un equipo Acquity UPLC equipado con una columna BEH C18 (2,1 x 100 mm, Waters) y utilizando acetonitrilo y 0,05% de ácido trifluoroacético como solventes. Las muestras fueron eluidas con 10% de acetonitrilo y 90% de TFA 0,1% durante 1 minuto, seguido por un gradiente lineal de acetonitrilo desde el 10% al 100% y TFA desde 90% a 0% durante 7 minutos. El flujo utilizado fue de 0,5 ml/min y la temperatura de la columna de 30°C.

La detección de los picos y la caracterización de su espectro de absorción se realizaron con un sistema de fotodiodos en línea y utilizando el software Empower de Waters. Los cromatogramas bidimensionales se extrajeron a longitudes de onda de 280, 350 y 400 nm.

Para valorar la producción de los compuestos policetónicos, se valoró el área del pico correspondiente.

RESULTADOS



3. VALORACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTOS REGULADORES GLOBALES DE *S. ARGILLACEUS* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL *CLUSTER* 1701.

A partir del análisis de la secuencia del genoma de *S. argillaceus* se identificaron una serie de genes que podrían estar implicados en la regulación de la biosíntesis de compuestos del metabolismo secundario. Se seleccionaron los genes *afsSa*, *nsdAa*, *areBa*, *dasRa* y *3818a* como posibles reguladores globales por presentar homología con otros genes de función conocida en otros estreptomicetos. Con el fin de determinar el posible efecto de dichos reguladores sobre la biosíntesis de compuestos del metabolismo secundario, se generaron mutantes en los mismos por inactivación génica en *S. argillaceus* (WT), así como cepas de *S. argillaceus* sobreexpresando de forma independiente cada uno de los genes (Susana Álvarez García, datos no publicados).

En este Trabajo Fin de Máster se determinó el efecto de la inactivación y/o sobreexpresión de los genes *afsSa*, *nsdAa*, *areBa*, *dasRa* y *3818a* en la producción del compuesto policetónico producido por la agrupación génica 1701.

Las diferentes cepas de *S. argillaceus* se sembraron en medio MA para obtener esporas. Con las mismas, se realizó un preinóculo añadiendo entre 30 y 50 μ l de la suspensión de esporas a 10 ml de TSB en un matraz erlenmeyer de 50 ml. Además se añadió tioestreptona como antibiótico de selección en las cepas que portaban el vector pEM4 con el gen sobreexpresado. Tras 48 horas en agitación a 30 °C, se utilizaron esos cultivos como preinóculo para inocular matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de producción SM10 (con tioestreptona cuando fuese necesario), ajustando la densidad óptica (600 nm) a 0'2. Los matraces inoculados se mantuvieron en agitación a 250 rpm y 30 °C durante el tiempo del ensayo. De cada uno de ellos, se tomó una muestra diariamente de un 1 ml de cultivo para extraer los compuestos producidos mediante una doble extracción con butanol. De forma paralela, se tomaron otros 2 ml de cultivo para cuantificar el crecimiento en cada uno de los cultivos y corregir si fuese necesario los valores de producción.

Los compuestos se analizaron de manera individual, a excepción de los compuestos 1 y 2 que se analizaron de forma conjunta ya que pueden interconvertirse entre ellos.

3.1 EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE GENES REGULADORES GLOBALES EN LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL CLUSTER 1701.

1) *S. argillaceus* *ΔnsdAa*: El gen *nsdA* es un gen que afecta negativamente a la producción de antibióticos y a la esporulación en *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2006). La disrupción del gen causa la sobreproducción de esporas y de tres de los antibióticos conocidos producidos por *S. coelicolor*. Existen homólogos del gen *nsdA* en otros *Streptomyces* y también se han encontrado proteínas similares a NsdA en otros actinomicetos (Li *et al.*, 2006).

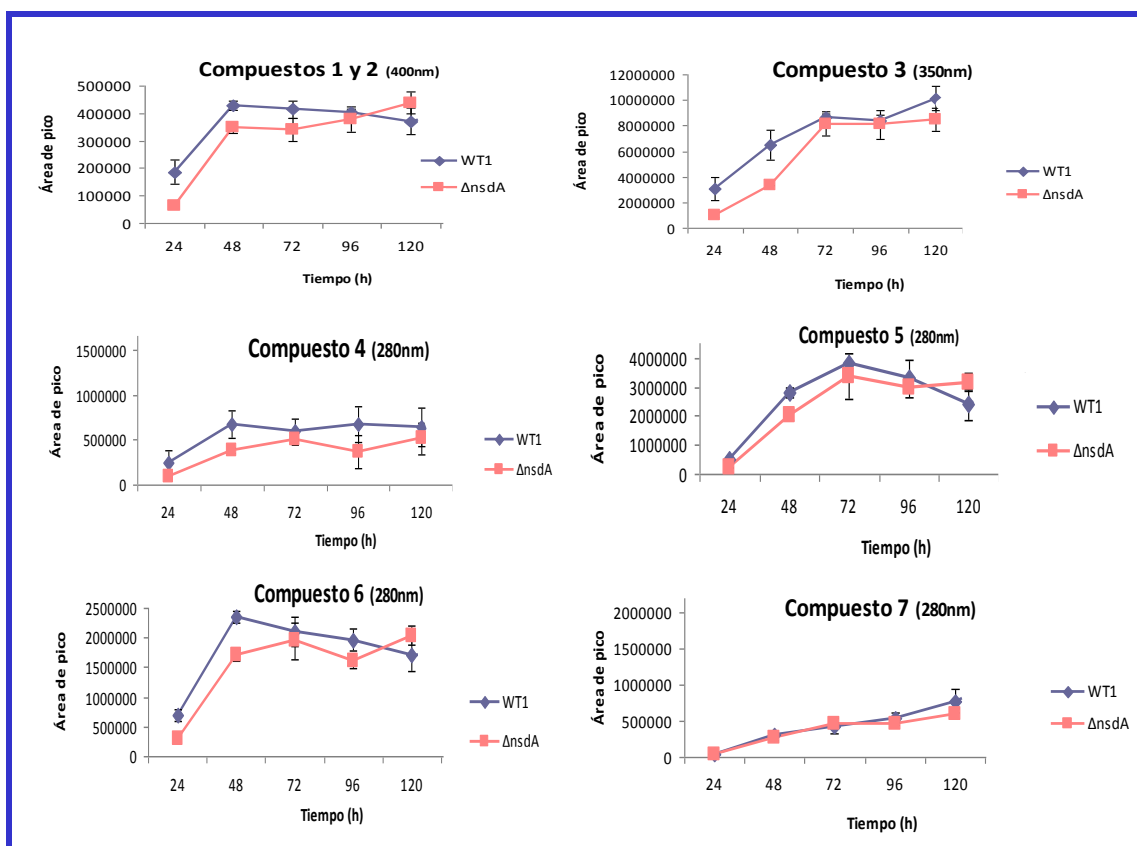


Figura 3.1. Efecto de la inactivación del gen *nsdAa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. **WT1**, cepa silvestre de *S. argillaceus*. **$\Delta nsdA$** , *S. argillaceus* $\Delta nsdA$.

Como se aprecia en la Figura 3.1, la inactivación del gen *nsdAa* no produce cambios significativos en la producción de ninguno de los 7 compuestos del cluster 1701 analizados respecto a la cepa control (*S. argillaceus* WT1). Las curvas de producción de los 7 compuestos son ligeramente inferiores a la de la cepa control, pero las diferencias son poco importantes.

2) *S. argillaceus* Δ afsSa: La proteína AfsR de *S. coelicolor* es un regulador pleiotrópico que posee un dominio tipo SARP (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*). Parece jugar un importante papel como integrador de múltiples señales fisiológicas y ambientales que se traducen mediante cascadas de fosforilación. AfsR fosforilada activa la transcripción de *afsS* que codifica una proteína que aumenta la producción de actinorrodina (Act), undecilprodigiosina (Red) y un antibiótico dependiente de calcio (CDA) en *S. coelicolor* (Matsumoto *et al.*, 1994).

En la Figura 3.2 se muestran las curvas de producción de la cepa mutante en el gen *afsSa* respecto a la cepa control. Al igual que en el caso anterior, la producción de los 7 compuestos es ligeramente inferior en el mutante que en la cepa silvestre.

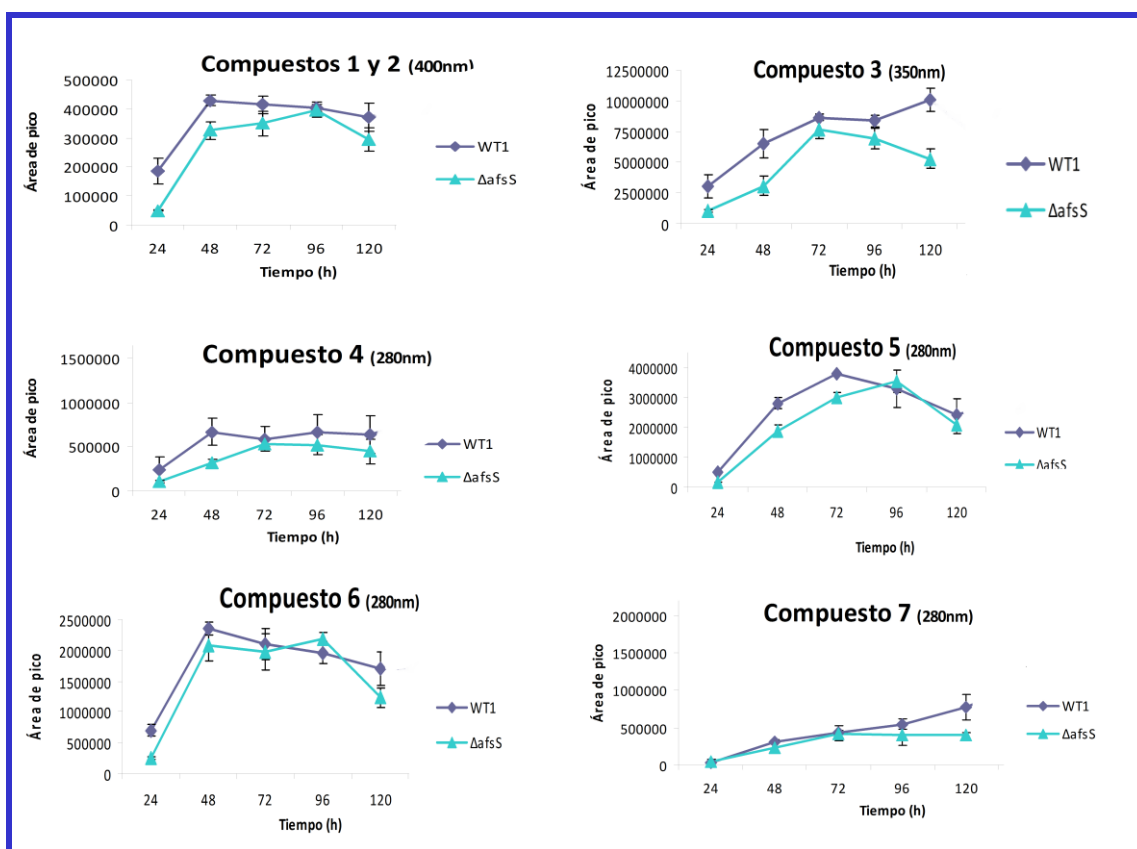


Figura 3.2. Efecto de la inactivación del gen *afsSa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. WT1, cepa silvestre de *S. argillaceus*. Δ afsS, *S. argillaceus* Δ afsSa.

3) *S. argillaceus* *AdasRa*: Es un gen que controla las rutas de biosíntesis de antibióticos en función del estado nutricional del micelio. Actúa inhibiendo la producción de Act y Red en *S. coelicolor*, al reprimir la transcripción de los genes reguladores específicos de ruta de estos cluster de biosíntesis. Esta represión, es eliminada en presencia de glucosamina-6-fosfato (Hesketh *et al.*, 2009).

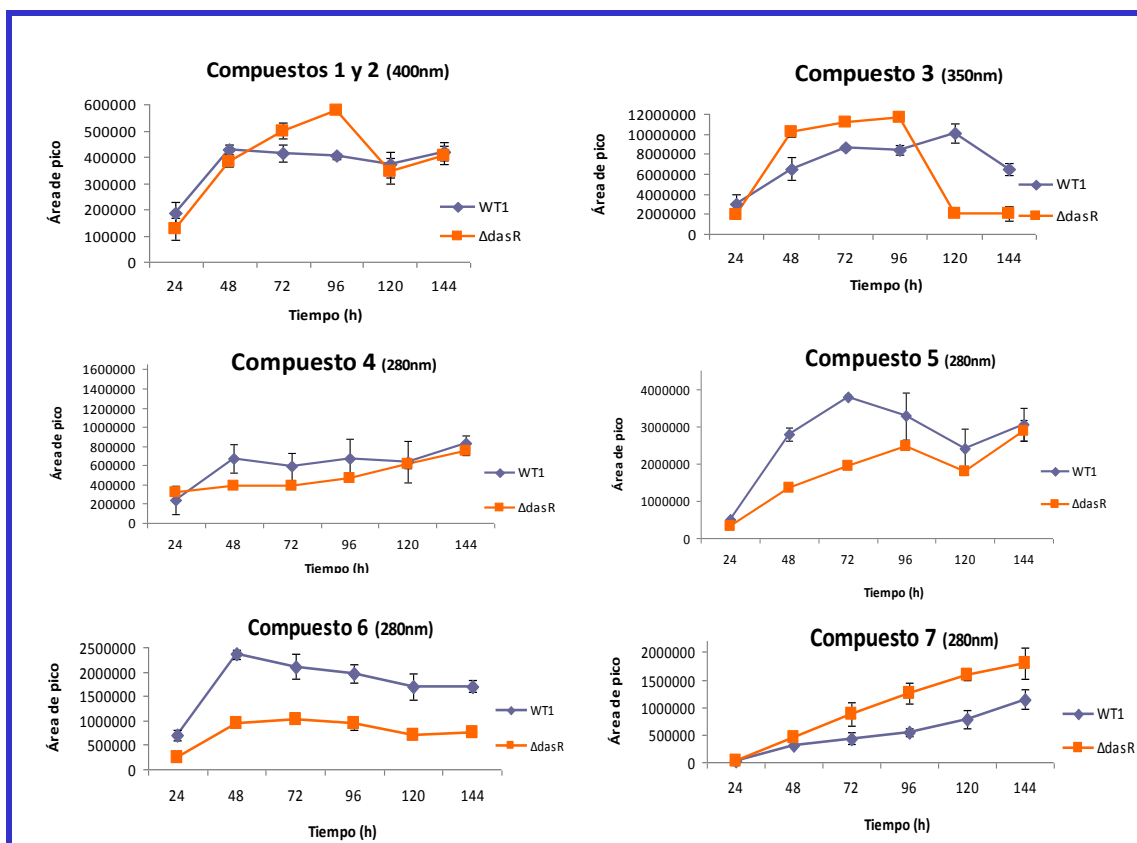


Figura 3.3. Efecto de la inactivación del gen *dasRa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. WT1, cepa silvestre de *S. argillaceus*. Δ dasR, *S. argillaceus* Δ dasRa.

El efecto que produce la inactivación génica en *S. argillaceus* del gen *dasRa* produce un comportamiento variable en la producción de los compuestos policetónicos del cluster 1701. A las 96 horas, los compuestos 1/2 y 3 se producen en mayor cantidad que en el control, pero posteriormente la producción decrece hasta ser igual o inferior a la de la cepa control. En el caso de los compuestos 4, 5 y 6, las producciones son inferiores a lo largo de toda la curva de producción respecto al control. Sin embargo, la producción del compuesto 7 es siempre superior respecto al control, hasta alcanzar unos niveles 1'6 veces superiores al control (Figura 3.3).

4) *S. argillaceus* Δ areBa: *S. clavuligerus* produce el antibiótico β -lactámico cefamicina C y el ácido clavulánico. La formación de ambos requiere la interacción de la proteína autorreguladora positiva CcaR con los promotores diana a través del reconocimiento de secuencias ARE (*AutoRegulatory Elements*) localizados antes o cerca del promotor de los genes reguladores específicos de ruta. La unión indica la conexión entre el metabolismo primario y la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico (Santamarta *et al.*, 2007). Por tanto estas proteínas actuarían como activadores transcripcionales, ya que se han descrito casos en los que su delección retrasa o inhibe la producción de antibióticos (Takano, 2006).

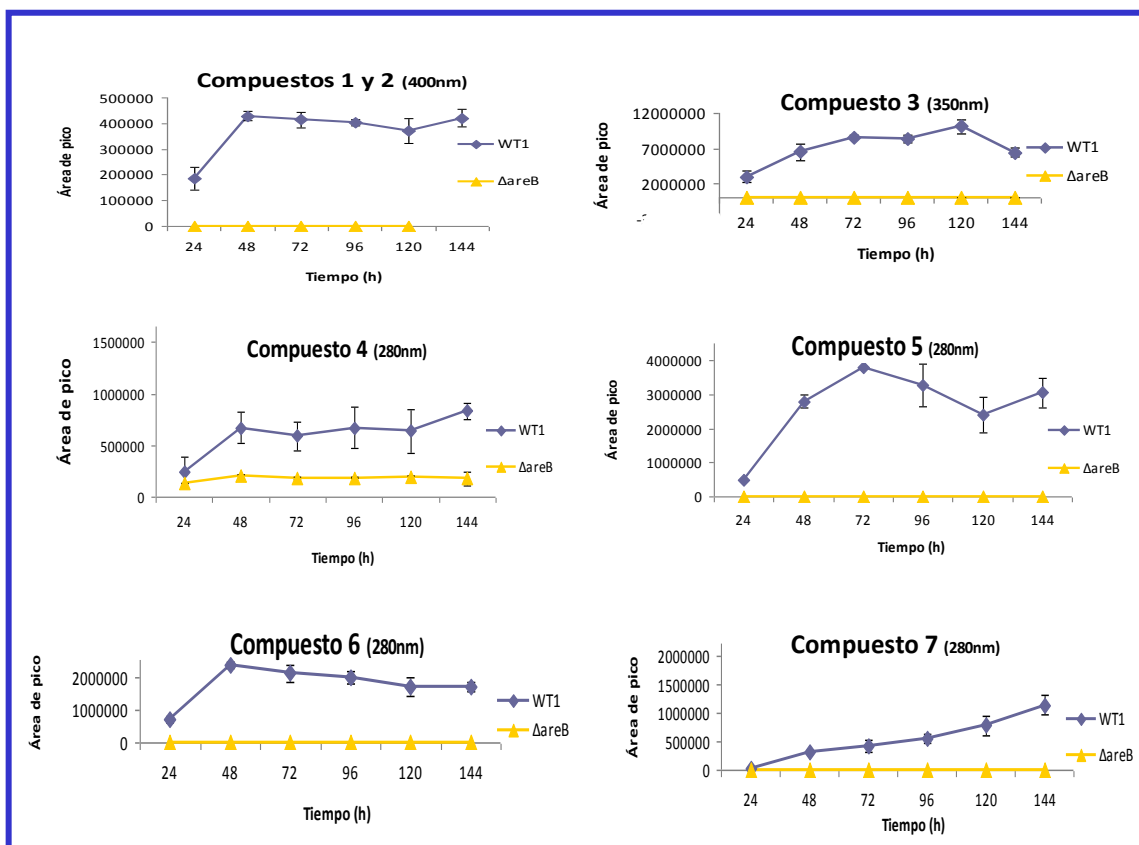


Figura 3.4. Efecto de la inactivación del gen *areBa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. WT1, cepa silvestre de *S. argillaceus*. Δ areB, *S. argillaceus* Δ areBa.

La inactivación del gen *areBa* en *S. argillaceus* provoca el desvanecimiento total de la producción de todos los compuestos policetónicos del cluster 1701, a excepción del compuesto 4 que se produce en muy pequeña cantidad (Figura 3.4), un comportamiento ya observado en otros experimentos realizados previamente (Suhui Ye, comunicación personal).

5) *S. argillaceus* $\Delta 3818a$: El gen SAV3818 es un regulador transcripcional de la familia TetR y se ha encontrado un gen homólogo en *S. coelicolor*. Es muy probable que estos dos genes sean reguladores positivos de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Duong *et al.*, 2009).

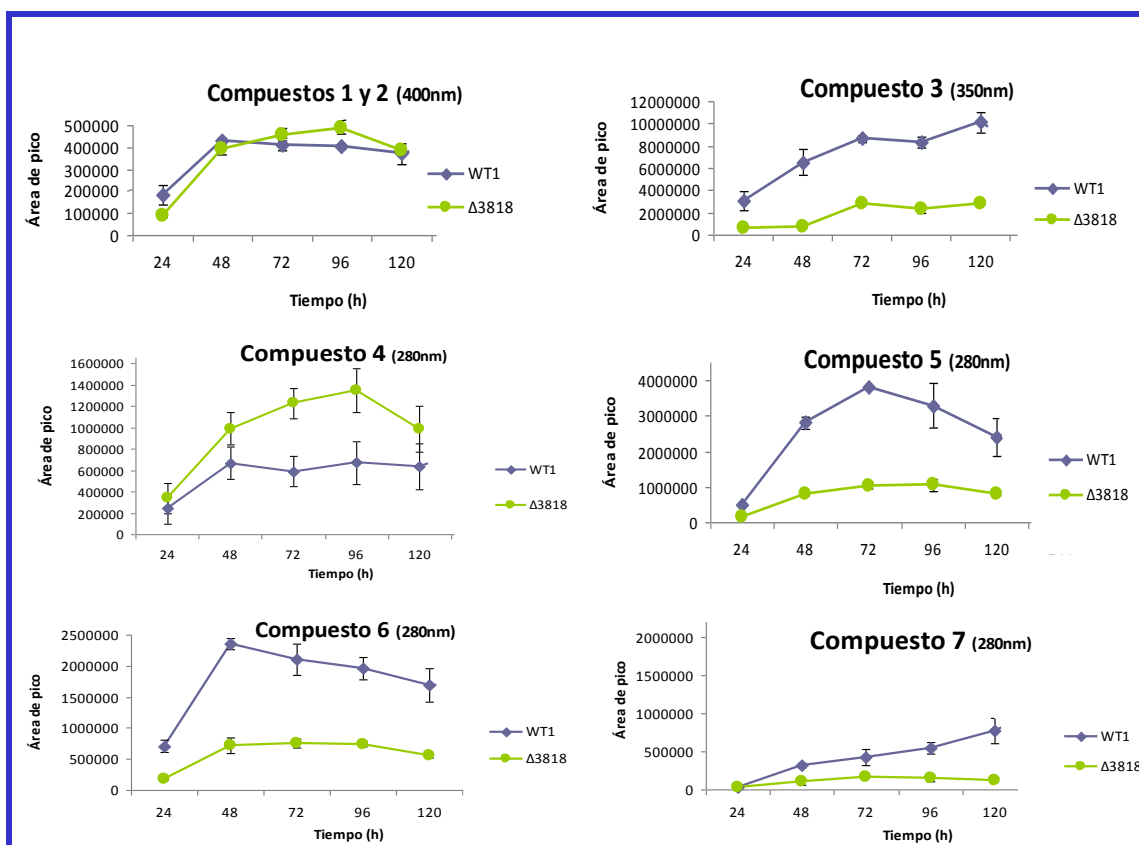


Figura 3.5. Efecto de la inactivación del gen 3818a de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. WT1, cepa silvestre de *S. argillaceus*. $\Delta 3818$, *S. argillaceus* $\Delta 3818a$.

La producción de compuestos del cluster 1701 por *S. argillaceus* con el gen 3818a inactivado se ve afectada, influyendo de diferente manera en la producción de los distintos compuestos policetónicos. La tendencia general es que la producción de la cepa mutante sea muy inferior a la del control (Compuestos 3, 5, 6 y 7; Figura 3.5). Sin embargo, la producción de los compuestos 1 y 2 no parece verse afectada por la inactivación del gen 3818a (Figura 3.5). En el caso del compuesto 4, vuelve a repetirse el comportamiento diferencial que se apreciaba en la inactivación del gen *areBa*. Mientras que la producción del resto de los compuestos disminuye, el compuesto 4 muestra un aumento sustancial de su producción (Figura 3.5).

3.2 EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE GENES REGULADORES GLOBALES EN LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLICETÓNICOS DEL CLUSTER 1701.

En base a los resultados obtenidos, se planteó el estudio del efecto que tenía la sobreexpresión de los genes *areBa*, *dasRa* y *3818a* en la producción de los compuestos policetónicos del *cluster* 1701, dado que su inactivación generalmente afectaba de forma negativa a la producción de los mismos. Para ello, se valoró la producción de estos compuestos policetónicos en cepas de *S. argillaceus* sobreexpresando cada uno de los genes en un vector multicopia, pEM4 (Quirós *et al.*, 1998), que es un vector bifuncional capaz de replicarse en *E. coli* y en *Streptomyces*, y que contiene el promotor constitutivo del gen de resistencia a eritromicina (Bibb *et al.*, 1985), bajo cuyo control se pueden sobreexpresar genes en *Streptomyces*.

1) *S. argillaceus* pEM4*dasRa*

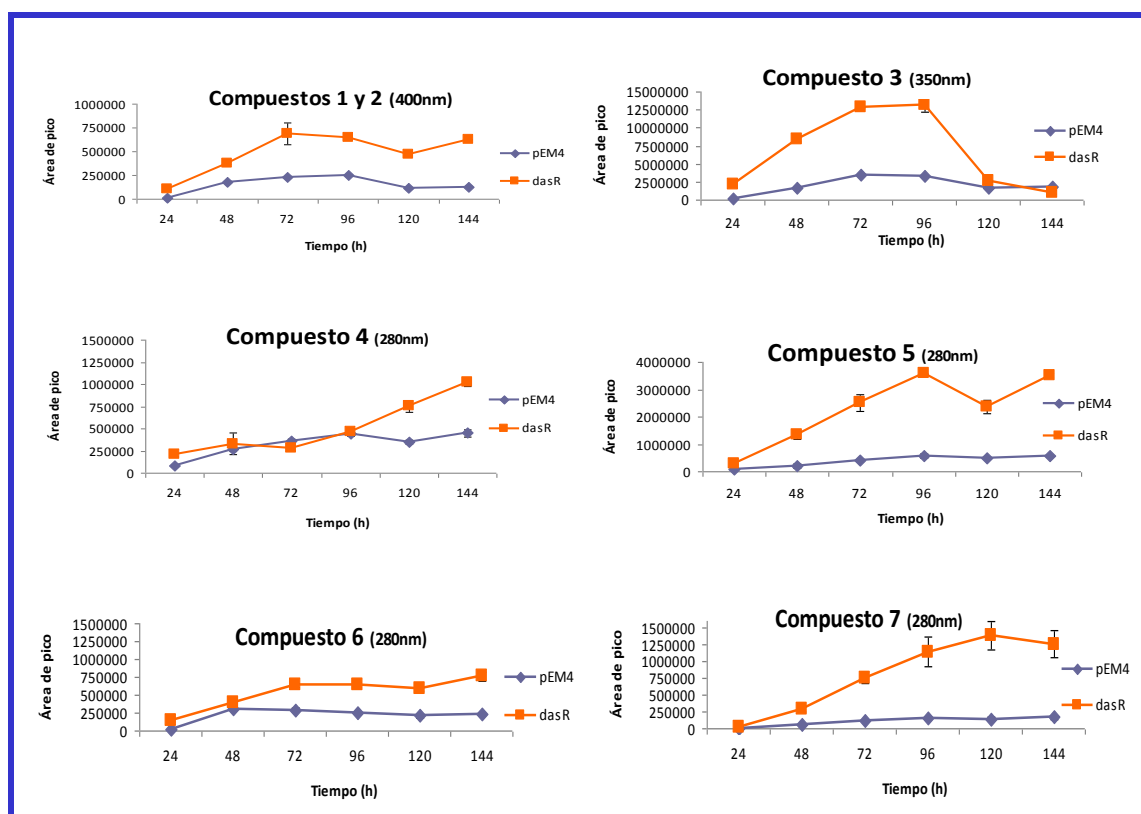


Figura 3.6. Efecto de la sobreexpresión del gen *dasRa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del *cluster* 1701. **pEM4**, *S. argillaceus* pEM4. **dasR**, *S. argillaceus* pEM4*dasRa*.

La sobreexpresión del gen *dasRa* en *S. argillaceus* tiene un efecto positivo en la producción de los 7 compuestos policetónicos (Figura 3.6). Se producen

incrementos importantes, llegando a aumentar hasta 8'4 veces respecto al control en el caso del compuesto 7 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Efecto de la sobreexpresión en *S. argillaceus* de *dasRa* en la producción de los compuestos del cluster 1701.

	<i>S. argillaceus pEM4dasRa</i>
Compuestos 1 y 2	2,7x
Compuesto 3	4,0x
Compuesto 4	2,2x
Compuesto 5	6,3x
Compuesto 6	2,4x
Compuesto 7	8,4x

2) *S. argillaceus pEM4areBa*

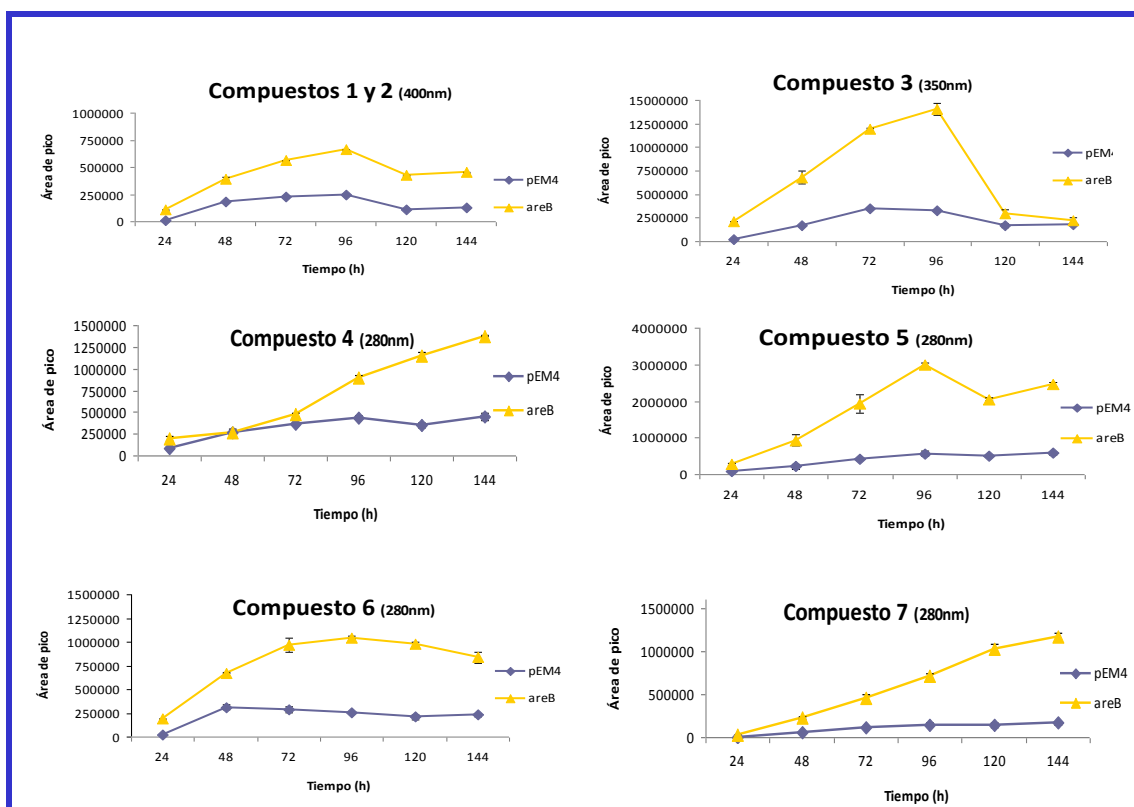


Figura 3.7. Efecto de la sobreexpresión del gen *areBa* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. **pEM4**, *S. argillaceus pEM4*. **areB**, *S. argillaceus pEM4areBa*.

La sobreexpresión del gen *areBa* en *S. argillaceus* tiene un efecto positivo en la biosíntesis de los 7 compuestos policetónicos (Figura 3.7). Se producen incrementos considerables en la producción respecto a la cepa control (*S. argillaceus pEM4*), desde 2'6 (compuestos 1 y 2) a 7'1 veces (compuesto 7) (Tabla 3.2).

	<i>S. argillaceus pEM4areBa</i>
Compuestos 1 y 2	2,6x
Compuesto 3	4,3x
Compuesto 4	3,3x
Compuesto 5	5,2x
Compuesto 6	3,4x
Compuesto 7	7,1x

Tabla 3.2. Efecto de la sobreexpresión en *S. argillaceus* de *areBa* en la producción de los compuestos del cluster 1701.

3) *S. argillaceus* pEM43818a

En cuanto al efecto de la sobreexpresión del gen *3818a*, se puede detectar una mejora de la producción en cada uno de los 7 compuestos policetónicos. El comportamiento de las curvas de producción es muy similar al de las cepas sobreexpresando tanto del gen *areBa* como del *dasRa*, observándose un máximo de producción en torno a las 96 horas en los compuestos 1/2, 3, 5 y 6, y un incremento prolongado en el tiempo en el caso de los compuestos 4 y 7 (Figura 3.8).

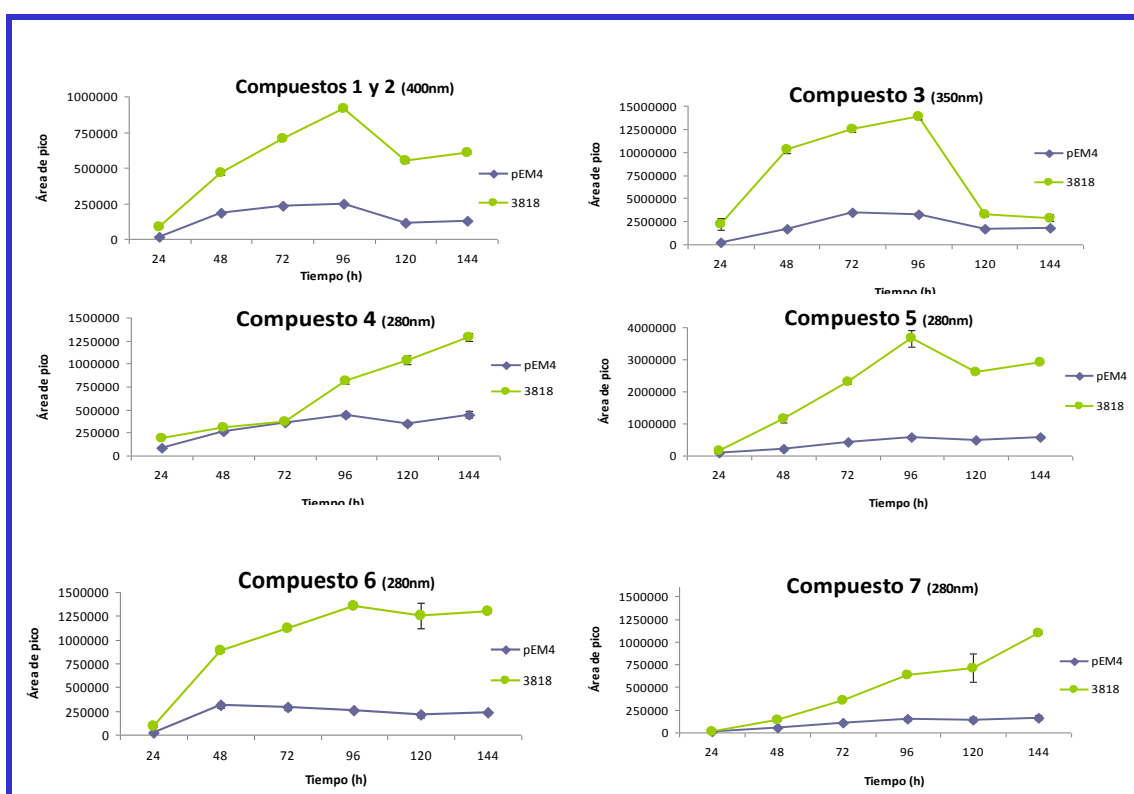


Figura 3.8. Efecto de la sobreexpresión del gen *3818a* de *S. argillaceus* en la producción de compuestos del cluster 1701. pEM4, *S. argillaceus* pEM4. 3818, *S. argillaceus* pEM43818a.

Como se muestra en las tablas de los incrementos de producción, de las sobreexpresiones de los genes *dasRa* (Tabla 3.1), *areBa* (Tabla 3.2) y *3818a* (Tabla 3.3), el mayor incremento se obtiene para el compuesto 7, seguido en todos los casos por el compuesto 5. Por el contrario, los resultados menos favorables se obtuvieron para los compuestos 1/2 y 4.

Tabla 3.2. Efecto de la sobreexpresión en *S. argillaceus* de *3818a* en la producción de los compuestos del cluster 1701.

	<i>S. argillaceus</i> pEM43818a
Compuestos 1 y 2	3,7x
Compuesto 3	4,2x
Compuesto 4	3,0x
Compuesto 5	6,4x
Compuesto 6	4,4x
Compuesto 7	6,6x

DISCUSIÓN



Recientemente se ha descubierto una nueva e interesante familia de compuestos policetónicos en *S. argillaceus*, cuyos niveles de producción son reducidos. Debido al interés de estos compuestos es necesario optimizar las producciones en cepas recombinantes para hacerlo viable desde un punto de vista industrial, ya que para realizar los diferentes estudios es necesario que los compuestos se produzcan en cantidades suficientes, lo que en muchas ocasiones resulta difícil porque el microorganismo natural no lo sintetiza en las cantidades adecuadas para poder llevar a cabo ensayos futuros.

La producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, está sometida a procesos de regulación de la expresión de sus genes de biosíntesis, en los que participan genes de regulación global o intermedia y genes de regulación específica. Conocer las rutas de señalización que desencadenan la producción de antibióticos se ha planteado como uno de los objetivos más perseguidos en *Streptomyces* con vistas a la explotación industrial de cepas en las que se pueda controlar la biosíntesis de un determinado metabolito secundario. No obstante, el mayor inconveniente en la biosíntesis de antibióticos es que se trata de un proceso muy complejo y altamente regulado, en el que influyen el estado nutricional, la concentración de moléculas señal, la propia biosíntesis y resistencia a antibióticos, y reguladores pleiotrópicos o globales y específicos de ruta (Hindra *et al.*, 2010).

El conocimiento de la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios resulta sumamente interesante desde un punto de vista práctico, puesto que los puntos de regulación constituyen una de las principales y más intuitivas dianas de la ingeniería metabólica cuando lo que se busca es el aumento de la producción de un determinado compuesto (Olano *et al.*, 2008). A medida que aumentan los datos respecto a la regulación en *Streptomyces* se va apreciando cada vez más su complejidad y la idea de una regulación de tipo jerárquico va dando lugar a la de una red mucho más compleja (Figura 4.1), en la que existe regulación cruzada, retroalimentación y una gran versatilidad, lo que permite a la bacteria adaptarse a los cambios que se producen en su medio ambiente (Sawai *et al.*, 2004). Por tanto, la regulación de la biosíntesis de antibióticos se trata de una complejísima red interconectada a varios niveles muy difícil de desentramar (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003).

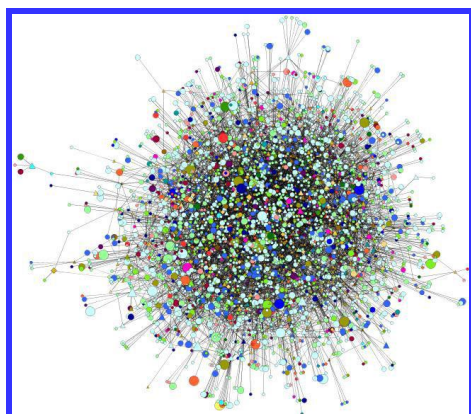


Figura 4.1. Predicción de la red de regulación transcripcional de *S. coelicolor* (Castro-Melchor *et al.*, 2010).

El modelo simplificado de genes globales actuando sobre genes específicos de ruta no refleja la complejidad real de los mecanismos que controlan la producción de antibióticos, ya que se ha demostrado la existencia de reguladores específicos que pueden actuar sobre la síntesis de varios antibióticos, y modular la acción de reguladores pleiotrópicos (Huang *et al.*, 2005).

El presente trabajo de investigación se centra en la mejora de la producción de un nuevo compuesto policetónico descubierto recientemente, del que aún se están realizando numerosos estudios. Con el fin de facilitar el conocimiento de sus propiedades, se marcó el objetivo de estudiar cepas de *S. argillaceus* que tienen modificados genes reguladores globales que podrían afectar en la producción del compuesto codificado por el *cluster* 1701.

La inactivación de los genes *nsdAa* y *afsSa* en *S. argillaceus* no produce cambios en la producción del compuesto policetónico de interés. A ambos genes se les han descrito efectos reguladores en la biosíntesis de diferentes compuestos, el gen *nsdA* actuando como regulador negativo de la producción de metabolitos secundarios (Li *et al.*, 2006) y el gen *afsS* activando la síntesis de los antibióticos, undecilprodigiosina y actinorrodina en *S. coelicolor* (Lian *et al.*, 2008). Sin embargo, en este caso parecen no tener efecto sobre el *cluster* 1701 en la producción de los compuestos policetónicos dado que en su ausencia los niveles de producción de estos compuestos sólo se ven ligeramente afectados. Esto puede ser debido a que dentro de la inmensa red de regulación existente, estos dos reguladores globales estén relacionados con otras rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios existentes en *S. argillaceus*, pero no con la 1701 en concreto.

En el caso del gen *3818*, descrito como un regulador global con efectos positivos en la producción de avermectinas en *S. avermitilis* ATCC31267 y en la producción de actinorrodina tanto en *S. coelicolor* M145 como en *S. lividans* TK21 (Duong *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el estudio de las cepas de *S. argillaceus* con el gen *3818a* bien inactivado o sobreexpresado, se corresponden con lo descrito en la bibliografía. Al ensayar la cepa *S. argillaceus* con el gen *3818a* inactivado los valores de producción de los compuestos 3, 5, 6 y 7 son muy inferiores a los de la cepa control, mientras que el compuesto 4 muestra un incremento en sus niveles de producción. Como cabía esperar, al sobreexpresar el gen *3818a* en multicopia en *S. argillaceus* los valores de la producción respecto a la cepa control (*S. argillaceus* pEM4) están altamente incrementados, hasta 6'6 veces en el caso del compuesto 7 (Tabla 3.3).

El efecto de la inactivación del gen *areBa* en *S. argillaceus* es el bloqueo por completo la producción de los compuestos policetónicos, a excepción del compuesto 4 cuyos valores de producción son ínfimos. Por otro lado, la sobreexpresión de este gen en multicopia dio como resultado una notable mejoría en la producción de los 7 compuestos policetónicos respecto a la cepa control. Estos resultados concordarían con el papel propuesto para AreB en otros *Streptomyces* como regulador positivo (Takano, 2006).

Por último, el efecto que produce la inactivación génica en *S. argillaceus* del gen *dasRa* produce un comportamiento variable en la producción de los compuestos policetónicos del *cluster* 1701. Por una parte, los compuestos 4, 5 y 6 ven reducida su producción respecto a la de la cepa control *S. argillaceus*, mientras que los compuestos 1/2 y 3 se producen en mayor cantidad hasta las 96 horas, pero posteriormente la producción decrece hasta ser igual o inferior a la de la cepa control. Por el contrario, la producción del compuesto 7 es superior a lo largo de toda la curva de producción, llegando a superar en el máximo de producción en 1'6 veces al control. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *dasRa* en *S. argillaceus* tiene un efecto positivo en la producción de los 7 compuestos policetónicos. Se producen incrementos importantes, llegando a aumentar hasta 8'4 veces en el caso del compuesto 7.

Aunque la inactivación de *dasRa* tiene un efecto variable sobre los distintos compuestos, su sobreexpresión tiene un efecto homogéneo positivo sobre la producción de los mismos. Este resultado no coincide con lo esperado en base a la función propuesta para DasR en otros *Streptomyces*, que sería la de un represor de la producción de antibióticos. Aunque en el momento actual no se conoce en profundidad la regulación del *cluster* 1701, en el mismo existe un gen que codifica para un regulador negativo tipo TetR. En este sentido, los resultados obtenidos podrían explicarse si DasR actuara regulando negativamente la expresión de dicho regulador TetR. TetR podría actuar inhibiendo la expresión de reguladores positivos presentes en el *cluster* que serían los encargados de actuar directamente sobre la expresión del *cluster* 1701 y que se produzca el compuesto policetónico.

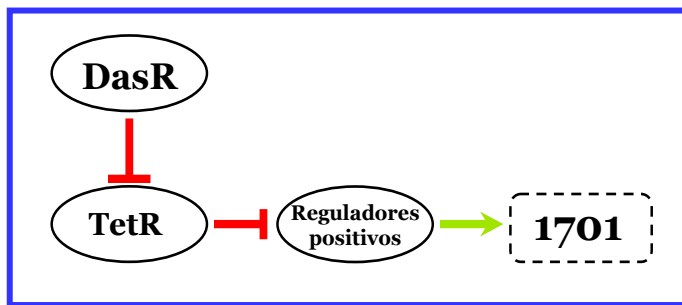


Figura 4.2. Hipótesis de regulación de AreB sobre el cluster 1701.

Por otro lado, el análisis de la secuencia del *cluster* 1701 revela que existen otros reguladores posiblemente positivos. Ante el comportamiento errático en los niveles de producción de los 7 compuestos policetónicos, parece que existe una regulación diferencial de los genes que componen el cluster. La regulación diferencial permite la activación/represión diferencial de genes o grupos de genes de una ruta metabólica y una regulación múltiple de genes individuales o regulación cruzada de rutas. Como por ejemplo, *DraR-K* juega un papel diferencial en la regulación de la producción de Act y Red de una manera dependiente del medio. Éste ha sido el primer sistema de dos componentes identificados que funciona de forma diferencial en la biosíntesis de antibióticos en *S. coelicolor* (Yu *et al.*, 2012). Por tanto, en base a los resultados queda patente que *dasRa* afecta a la regulación de la producción del compuesto policetónico en *S. argillaceus* y que esta regulación podría ser de manera diferencial.

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO



A partir del presente Trabajo Fin de Máster realizado se podría concluir:

- El estudio de la regulación global es una estrategia posible para la mejora de la producción de compuestos generados por *Streptomyces*.
- Se han identificado 3 cepas que producen una mejoría en los niveles de producción de los compuestos policetónicos codificado por el *cluster* 1701.
- Se ha conseguido un incremento de 3'7 y 8'4 veces en la producción de los compuestos 1/2 y 7, respectivamente, al sobreexpresar el gen *dasRa* en *S. argillaceus*.
- Se ha conseguido un incremento de 4'3 y 3'3 veces en la producción de los compuestos 3 y 4 respectivamente, al sobreexpresar el gen *areBa* en *S. argillaceus*.
- Se ha conseguido un incremento de 6'4 y 4'4 veces en la producción de los compuestos 5 y 6 respectivamente, al sobreexpresar el gen *3818a* en *S. argillaceus*.

En base a la información generada en este Trabajo Fin de Máster, se plantea como trabajo de futuro el **análisis de la expresión** de los diferentes genes del *cluster* 1701 en cada una de las tres cepas que producen incrementos en la producción del compuesto policetónico.

BIBLIOGRAFÍA



- Anderson, T. B., Brian, P., and Champness, W. C.** (2001). Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 39(3), 553-566.
- Awada, A., Mano, M., Hendlisz, A., and Piccart, M.** (2004). New anticancer agents and therapeutic strategies in development for solid cancers: a clinical perspective. *Expert Rev Anticancer Ther*, 4(1), 53-60.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tarraga, 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., Rabinowitsch, 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(6885), 141-147.
- Bérdy, J.** (1989). The discovery of the new bioactive microbial metabolites. Screening and identification. En M.E. Bushell y U. Gräfe (editores). Bioactive metabolites from microorganism. Progress in industrial microbiology. Vol. 27. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Bérdy, J.** (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*, 58(1), 1-26.
- Bergey's Manual of determinative bacteriology.** (2001). J. G. Holt, N.R. Krieg, P. H. A. Sneath y J. T. Stanley (editores) Zippincott Williams & Wilkings, USA.
- Bibb, M. J.** (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol*, 8(2), 208-215.
- Bibb, M. J., Janssen, G. R., and Ward, J. M.** (1985). Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38(1-3), 215-226.
- Brian, P., Riggle, P. J., Santos, R. A., and Champness, W. C.** (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol*, 178(11), 3221-3231.
- Castro-Melchor, M., Charaniya, S., Karypis, G., Takano, E., and Hu, W. S.** (2010). Genome-wide inference of regulatory networks in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics*, 11, 578.
- Challis, G. L.** (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154(Pt 6), 1555-1569.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F. X., Borges, F., Fourrier, C., Guerineau, M., and Decaris, B.** (2006). Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol. Biol. Evol.* 23: 2361-2369.

- Claesen, J., and Bibb, M.** (2010). Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(37), 16297-16302.
- Clapp, R. W., Jacobs, M. M., and Loechler, E. L.** (2008). Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health*, 23(1), 1-37.
- Duong, C. T., Lee, H. N., Choi, S. S., Lee, S. Y., and Kim, E. S.** (2009). Functional expression of *SAV3818*, a putative *TetR*-family transcriptional regulatory gene from *Streptomyces avermitilis*, stimulates antibiotic production in *Streptomyces* species. *J Microbiol Biotechnol*, 19(2), 136-139.
- Fernandez-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A., and Malpartida, F.** (1991). The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*, 66(4), 769-780.
- Floss, H. G.** (2006). Combinatorial biosynthesis--potential and problems. *J Biotechnol*, 124(1), 242-257.
- García-Bernardo, J., Braña, A. F., Mendez, C., and Salas, J. A.** (2000). Insertional inactivation of *mtrX* and *mtrY* genes from the mithramycin gene cluster affects production and growth of the producer organism *Streptomyces argillaceus*. *FEMS Microbiol Lett*, 186(1), 61-65.
- Gramajo, H. C., Takano, E., and Bibb, M. J.** (1993). Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol*, 7(6), 837-845.
- Gredicak, M., and Jeric, I.** (2007). Eneidyne compounds--new promises in anticancer therapy. *Acta Pharm*, 57(2), 133-150.
- Gross, H.** (2007). Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(2), 267-277.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hesketh, A., Kock, H., Mootien, S., and Bibb, M.** (2009). The role of *absC*, a novel regulatory gene for secondary metabolism, in zinc-dependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 74(6), 1427-1444.
- Hindra, Pak, P., and Elliot, M. A.** (2010). Regulation of a novel gene cluster involved in secondary metabolite production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 192(19), 4973-4982.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., and Ruan, J. S.** (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs*, 7(1), 24-44.

- Horan, A. C.** (1994). Aerobic actinomycetes: a continuing source of novel natural products. *Biotechnology*, 26, 3-30.
- Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., Karoonuthaisiri, N., Lih, C. J., Kao, C. M., Buttner, M. J., and Cohen, S. N.** (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 58(5), 1276-1287.
- 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*. *Nat Biotechnol*, 21(5), 526-531.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A.** (2000). Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation. Norwich.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J.** (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472-482.
- Labeda, D.P. and M.C. Shearer.** (1990). Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In: Isolation of biotechnological organisms from nature. D.P. Labeda (Ed.). McGraw-Hill Book Co. Inc. New York. 1-19.
- Lancini, G., and Lorenzetti, R.** (1993). Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Springer- Verlag New York, LLC.
- 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. *Nat Chem Biol*, 1(5), 265-269.
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J. M., and Decaris, B.** (1991). Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region. *J Bacteriol*, 173(13), 4229-4233.
- Lefevre, F., Robe, P., Jarrin, C., Ginolhac, A., Zago, C., Auriol, D., Vogel, T. M., Simonet, P., and Nalin, R.** (2008). Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. *Res Microbiol*, 159(3), 153-161.
- Li, W., Ying, X., Guo, Y., Yu, Z., Zhou, X., Deng, Z., Kieser, H., Chater, K. F., and Tao, M.** (2006). Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 188(24), 8368-8375.
- Lian, W., Jayapal, K. P., Charaniya, S., Mehra, S., Glod, F., Kyung, Y. S., Sherman, D. H., and Hu, W. S.** (2008). Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics*, 9, 56.
- Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A., and Chen, C. W.** (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*, 10(5), 923-933.
- Lombó, F., Blanco, G., Fernández, E., Méndez, C., and Salas, J. A.** (1996). Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide

- synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene*, 172(1), 87-91.
- Lombó, F., Braña, A. F., Méndez, C., and Salas, J. A.** (1999). The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol*, 181(2), 642-647.
- Luo, J., Solimini, N. L., and Elledge, S. J.** (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5), 823-837.
- Martínez-Antonio, A., and Collado-Vides, J.** (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6(5), 482-489.
- Matsumoto, A., Hong, S. K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., and Beppu, T.** (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene*, 146(1), 47-56.
- Méndez, C., and Salas, J. A.** (2003). On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs. *Comb Chem High Throughput Screen*, 6(6), 513-526.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M.** (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75(3), 311-335.
- Novo, F.J.** (2008). Cambios genéticos causantes de neoplasia. *Jano*. 1718: 28-31
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., and Horinouchi, S.** (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol*, 190(11), 4050-4060.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., and Salas, J. A.** (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng*, 10(5), 281-292.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., and Hattori, M.** (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21), 12215-12220.
- Parajuli, N., Basnet, D. B., Chan Lee, H., Sohng, J. K., and Liou, K.** (2004). Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys*, 425(2), 233-241.
- Quirós, L.M., Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Méndez, C., and Salas, J.A.** (1998). Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 28: 1177-1185.
- Rang, H.P., Dales, M.M., Ritter, J.M., and Flower, R.J.** (2008). Farmacología. 6ª edición. Ed. Elsevier. Barcelona.

- Sánchez, L., and Braña, A. F.** (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, 142 (Pt 5), 1209-1220.
- Santamarta, I., López-García, M. T., Pérez-Redondo, R., Koekman, B., Martín, J. F., and Liras, P.** (2007). Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE(*ccaR*) sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Mol Microbiol*, 66(2), 511-524.
- Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P. C., and Horinouchi, S.** (2004). Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 334, 53-61.
- Takano, E.** (2006). Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol*, 9(3), 287-294.
- Towle, J. E.** (2007). PhD Thesis, University of Leeds.
- 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*. *Mol Microbiol*, 58(1), 131-150.
- Wencheng, L., Ying, X., Guo, Y., Yu, Z., Zhou, X., Deng, Z., Kieser, H., Chater, K.F., and Tao, M.** (2006). Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 188: 8368:8375.
- Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S., Tan, H., Lu, Y., and Jiang, W.** (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by *DraR-K*, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 85(3), 535-556.
- Zabala, D., Braña, A. F., Flórez, A. B., Salas, J. A., and Méndez, C.** (2013). Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metab Eng*, 20, 187-197.
- Zerikly, M., and Challis, G. L.** (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*, 10(4), 625-633.