

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

**Ingeniería metabólica aplicada
al aumento de la producción de
macrolactamas glicosiladas en
cepas de *Streptomyces***

Ainhoa Lanza Martínez

Departamento de Biología Funcional

Área de Microbiología/Universidad de Oviedo

Julio/2020



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



RESUMEN

Los actinomicetos constituyen el principal grupo de bacterias productoras de compuestos bioactivos, dentro de los cuales se incluyen los policétidos. Como consecuencia de la aparición de bacterias multirresistentes ha emergido la necesidad de nuevos compuestos bioactivos. Es por esto por lo que en este estudio se propone una estrategia de ingeniería metabólica de la cepa de *Streptomyces* sp. CS227 para conseguir un incremento de producción de las titanmicinas, grandes policétidos macrocíclicos glicosilados, cuyo clúster biosintético se encuentra silenciado en condiciones normales de laboratorio. El análisis bioinformático de dicho clúster empleando el *software* antiSMASH indica que para la síntesis de las titanmicinas se necesitan 23 malonil-CoA, 9 metilmalonil-CoA y 1 etilmalonil-CoA, además de glucosa-1-fosfato, como precursora de los desoxiazúcares con los cuales estos metabolitos se encuentran glicosilados. Teniendo en cuenta que la disponibilidad de precursores constituye un cuello de botella en la biosíntesis de metabolitos secundarios, se emplearon dos estrategias para incrementar el *pool* intracelular de precursores implicados en la síntesis de las titanmicinas. Por un lado, se empleó el plásmido pMIXT para sobreexpresar los genes *ovmGIH* y *pgm*, implicados en la conversión de acetyl-CoA a malonil-CoA y en la transformación de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, respectivamente. Por otro lado, empleando los plásmidos pEM4Ti y pOJ260Ei se intentó la sobreexpresión del gen *tit35* que codifica para una crotonil-CoA carboxilasa/reductasa que realiza la transformación de crotonil-CoA en etilmalonil-CoA. Se consiguieron clones portando los plásmidos pMIXT y pEM4Ti. En este trabajo se discuten y analizan cuáles serían las siguientes etapas por realizar para completar el estudio y determinar si se ha logrado aumentar la producción de las titanmicinas. Del mismo modo se proponen diversos estudios futuros que podrían realizarse para la continuación de este trabajo y diversas alternativas a los problemas que puedan surgir durante su ejecución.

ABSTRACT

Actinomycetes constitute the main group of bacteria producing bioactive compounds, including polyketides. Because of the appearance of multiresistant pathogens, the need for new bioactive compounds has emerged. Therefore, in this study is proposed a metabolic engineering strategy of the strain *Streptomyces* sp. CS227 in order to achieve an increase in the production of titanmycins, large glycosylated macrocyclic polyketides, whose biosynthetic cluster is silenced under standard laboratory conditions. The bioinformatic analysis of this cluster using the antiSMASH software indicates that 23 malonyl-CoA, 9 methylmalonyl-CoA and 1 ethylmalonyl-CoA are required for the synthesis of titanmycins, as well as glucose-1-phosphate, as a precursor of deoxy sugars with which these metabolites are glycosylated. Taking into account that the availability of precursors constitutes a bottleneck in the biosynthesis of secondary metabolites, two strategies were used to increase the intracellular pool of precursors involved in the synthesis of titanmycins. On the one hand, the plasmid pMIXT was used to overexpress the genes *ovmGIH* and *pgm*, involved in the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA and in the transformation of glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate, respectively. First, using the plasmids pEM4Ti and pOJ260Ei, the overexpression of the gene *tit35* that codes for a crotonyl-CoA carboxylase / reductase that performs the transformation of crotonyl-CoA into ethylmalonyl-CoA was attempted. Mutants with plasmids pMIXT and pEM4T were obtained. This work discusses and analyzes what would be the next steps to complete the study and determine if there has been an increase in the production of titanmycins. Furthermore, future approximations to continue this work and several alternatives to the problems that might be faced will be proposed.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Necesidad de nuevos compuestos bioactivos	4
1.2. Ingeniería metabólica.....	4
1.2.1. Definición y origen	4
1.2.2. Rutas y flujos metabólicos.....	5
1.2.3. Etapas de los estudios de ingeniería metabólica	5
1.2.4. Aplicaciones	8
1.3. Ejemplo de aplicación a nivel industrial: ingeniería metabólica de <i>Corynebacterium glutamicum</i> para la producción de L-ornitina	8
1.4. Policétidos.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Plásmidos y cepas bacterianas.....	12
3.2. Medios de cultivo	13
3.3. Amplificación por PCR	14
3.3.1. Diseño de cebadores para la PCR	14
3.3.2. Condiciones de la PCR.....	14
3.4. Construcción de los plásmidos	15
3.4.1. Digestión de plásmidos e inserto	15
3.4.2. Ligación.....	15
3.5. Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	16
3.6. Minipreparaciones	16
3.7. Lisis alcalina	16
3.8. Generación de mutantes en <i>Streptomyces</i>	17
3.8.1. Transformación en <i>E. coli</i> ET12567/pUB307.....	17
3.8.2. Conjugación <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i>	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Elección de los genes a manipular.....	18

4.1.1.	Para aumentar los precursores generales de la síntesis de policétidos glicosilados: acetil-CoA carboxilasa y fosfoglucomutasa	18
4.1.2.	Para aumentar la cantidad intracelular de etilmalonil-CoA necesario para la síntesis de titanmicinas: crotonil-CoA carboxilasa/reductasa.....	18
4.2.	Diseño de los cebadores para la PCR	20
4.3.	Plásmidos obtenidos	21
4.4.	Clones obtenidos	22
5.	DISCUSIÓN.....	22
6.	CONCLUSIONES	29
7.	BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Necesidad de nuevos compuestos bioactivos

Los actinomicetos, principalmente el género *Streptomyces*, constituyen el grupo de bacterias más relevante en la producción de compuestos bioactivos: aproximadamente dos tercios de todos los productos naturales son generados por miembros de esta familia. Además de antibióticos, otros metabolitos secundarios naturales útiles en medicina han sido aislados de este grupo de bacterias, incluyendo inmunosupresores, agentes antitumorales, antihelmínticos y antifúngicos. Se puede ampliar la aplicación de estos compuestos a otros campos tales como la agricultura o la medicina veterinaria [1, 2, 3].

Como consecuencia del incremento en el número de bacterias multirresistentes, de la emergente necesidad de nuevos compuestos bioactivos para hacer frente a enfermedades causadas por nuevos patógenos y de la propia toxicidad de los antibióticos debido a los efectos secundarios que pueden causar en los pacientes, se está volviendo a poner el foco de atención en los actinomicetos para poder conseguir nuevos compuestos bioactivos [4]. Esta tarea se ve facilitada gracias al desarrollo en las técnicas de secuenciación de ADN, genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica y el análisis de perfiles metabólicos, ya que conocer esta información facilita la ingeniería de los microorganismos [5].

No obstante, muchos de estos compuestos bioactivos no se producen en las condiciones de cultivo estándar de laboratorio o, si lo hacen, suele ser en cantidades muy pequeñas, lo cual implica que exista además la necesidad de desarrollar estrategias que permitan activar y/o incrementar la producción de dichos metabolitos. La estrategia tradicional consiste en llevar a cabo programas de mutagénesis al azar con las cepas productoras nativas seguidos de selección de los mutantes que presenten una mayor producción del compuesto de interés. El inconveniente de este enfoque es que se necesita mucho tiempo y esfuerzo para aplicarlo [2].

Más recientemente, se han desarrollado otras aproximaciones en las cuales está implicada la ingeniería metabólica.

1.2. Ingeniería metabólica

1.2.1. Definición y origen

La ingeniería metabólica es una disciplina que de manera sistemática manipula las cepas para lograr la sobreproducción de compuestos de interés, empleando estrategias de ingeniería genética [2].

La ingeniería metabólica tuvo su origen durante las últimas décadas del siglo XX. Con los primeros avances en el campo de la ingeniería genética y después de que, en 1973, se

consiguiesen introducir plásmidos portadores de resistencia a diferentes antibióticos en *Escherichia coli* de manera exitosa, consiguiendo que dichos plásmidos se mantuvieran biológicamente funcionales [6], comenzó a pensarse en la posibilidad de diseñar las células bacterianas para convertirlas en pequeñas fábricas para sobreproducir diversos productos con fines químicos y farmacéuticos. La producción de un metabolito concreto requiere la modulación coordinada de la expresión de muchos genes, lo cual llevó a que, durante la década de 1980, las investigaciones se centrasen en conocer el funcionamiento de las redes metabólicas celulares, conocer todas las rutas que llevan desde un sustrato hasta el producto objetivo, además del análisis termodinámico y cinético de las mismas. Todo ello culminaría en 1991 en dos publicaciones que marcarían el inicio de la ingeniería metabólica, la cual era definida entonces como la mejora de la formación de productos o de las actividades celulares mediante la manipulación de funciones enzimáticas, de transporte o reguladoras, o introducción de otras nuevas, empleando la tecnología del ADN recombinante [7, 8, 9]. En estos primeros años las aplicaciones de la ingeniería metabólica iban dirigidas a la mejora del rendimiento y producción de productos en las cepas nativas productoras, el aumento del rango de sustratos que pueden dar lugar al metabolito de interés, la producción en cepas diferentes a la nativa productora y la adaptación de las células a condiciones adversas durante la síntesis [8, 10]. A partir de entonces, el interés y los avances en este campo irían en aumento.

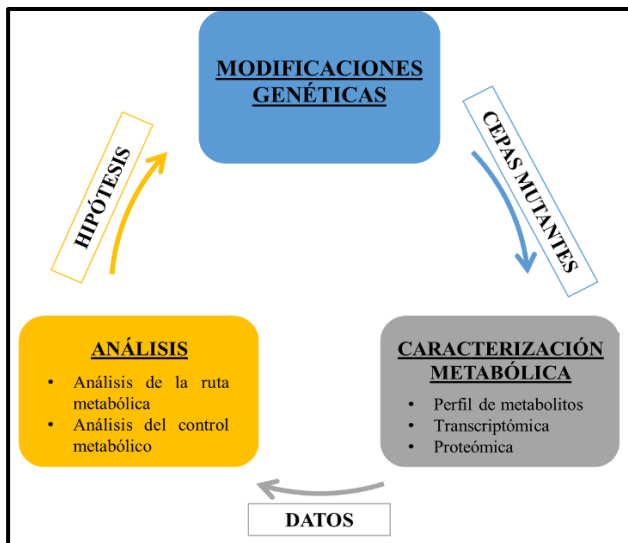
1.2.2. Rutas y flujos metabólicos

Una de las bases centrales de la ingeniería metabólica es el conocimiento de las rutas metabólicas y sus flujos. Una ruta metabólica puede definirse como cualquier secuencia factible de reacciones bioquímicas que conecta un conjunto de metabolitos de entrada y salida. El flujo vendría definido entonces como la velocidad a la que se procesan los metabolitos de entrada para transformarse en los productos finales. Es importante que todas estas reacciones se puedan detectar [10]. Frecuentemente el número de rutas disponibles para transformar sustratos de partida en un determinado producto final es muy elevado, lo cual hace que sea necesario, no solamente conocer las rutas metabólicas, si no también evaluarlas teniendo en cuenta su eficiencia termodinámica y cinética, la posible toxicidad de los intermediarios que intervienen y la expresión de los enzimas necesarios para las transformaciones en la cepa huésped seleccionada [9].

1.2.3. Etapas de los estudios de ingeniería metabólica

En la práctica los estudios de ingeniería metabólica poseen tres etapas principales: modificación genética, caracterización metabólica y análisis (Figura 1). Conociendo la información sobre las rutas de biosíntesis y los mecanismos de control, pueden formularse hipótesis acerca de cómo la manipulación genética de un determinado gen o enzima podría afectar

al metabolismo microbiano, y, por tanto, a la producción de un compuesto. Una vez realizadas las manipulaciones genéticas, se generan cepas modificadas genéticamente que son caracterizadas



mediante estrategias experimentales. Algunas técnicas empleadas para medir las concentraciones relativas de metabolitos y cuantificar las reacciones que tienen lugar en la célula son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*, MS), así como la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Además, se han desarrollado *microarrays* para monitorizar la expresión génica tras una

Figura 1. Esquema de los ciclos iterativos que constituyen un proceso de ingeniería metabólica.

perturbación. Los datos obtenidos permiten analizar las consecuencias de la modificación realizada sobre el metabolismo de la cepa. Si no se consigue el objetivo inicial, a partir de los resultados obtenidos, pueden elaborarse modelos y formularse nuevas hipótesis, y comenzar un nuevo ciclo [11, 12].

Para poder realizar las manipulaciones genéticas, es necesario primeramente conocer el clúster de biosíntesis del metabolito de interés. Un clúster biosintético es un conjunto de genes implicados en la síntesis, regulación y transporte de un determinado metabolito. La determinación de estas agrupaciones de genes se hace mediante un estudio bioinformático de la secuencia del genoma, empleando algoritmos y bases de datos, que contienen información sobre el metabolismo secundario de los microorganismos, y que permiten la predicción de los clústeres, el análisis de las rutas de biosíntesis y la predicción de los sustratos. Uno de los programas de análisis más ampliamente utilizado es el *antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell* (antiSMASH) [2, 13]. Para poder vincular el clúster con un determinado metabolito, se necesita combinar la información anterior con el análisis del proteoma y metaboloma [2, 3]. En este sentido, y en relación con el análisis del metaboloma, cobran especial importancia los Modelos de Rutas Metabólicas a Escala del Genoma (*Genome Scale Metabolic Networks Models*, GSMN Models) que actualmente se han convertido en una importante herramienta de análisis del metabolismo de los microorganismos. Se basan en una serie de algoritmos que permiten predecir las rutas y el flujo metabólico bajo unas condiciones genéticas y ambientales dadas [3].

En el caso de los actinomicetos, con el desarrollo y aplicación de técnicas de secuenciación de sus genomas de forma masiva, se ha observado que cada cepa presenta de 30 a

40 clústeres de biosíntesis, por lo tanto, el potencial para sintetizar metabolitos secundarios es elevado. No obstante, solamente una fracción de esos clústeres se expresa en condiciones estándar de laboratorio [14]. Con objeto de desencadenar y/o aumentar la expresión de estos clústeres y por tanto incrementar la producción de determinados metabolitos, de forma general, se pueden emplear diferentes estrategias:

- I. Modificar la distribución del flujo metabólico de precursores hacia la ruta de interés. En las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios se usan precursores procedentes de las principales rutas del metabolismo primario: ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucólisis y ruta de las pentosas fosfato; pero al mismo tiempo esos precursores son utilizados en muchas otras rutas, de manera que la disponibilidad de precursores puede constituir un cuello de botella en la síntesis de compuestos bioactivos. Se pueden lograr aumentos de producción mediante el incremento de la cantidad intracelular de precursores, lo cual se consigue sobreexpresando los genes que codifican enzimas que catalizan pasos específicos de la ruta de biosíntesis de interés o desviando el empleo de precursores de otras rutas no productivas mediante la eliminación de genes clave de dichas reacciones [14].
- II. Desregular la ruta biosintética, bien sobreexpresando reguladores positivos (activadores) o bien inactivando reguladores negativos (represores) [2, 14]. Otros elementos reguladores que se pueden modificar son promotores, terminadores y sitios de unión al ribosoma [3]. Es importante tener en cuenta que la manipulación de los factores reguladores de la ruta generalmente produce niveles de expresión alterados de los genes biosintéticos y de resistencia en la cepa, pero otros aspectos de la producción de metabolitos secundarios, como el suministro de precursores, permanecen intactos [15].
- III. Sobreexpresar genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis o inactivar aquellos que codifican para enzimas que transforman el metabolito de interés en otro producto diferente [14]. Mediante la sobreexpresión de genes que codifiquen enzimas de los puntos de ramificación de las rutas, se podría desviar el flujo hacia la ruta que dé lugar al producto deseado. Esta estrategia también se utiliza para disminuir el número de subproductos que podrían generarse [2, 3, 12, 16]. La existencia de una enzima que limite la velocidad de transformación podría ser otro cuello de botella y determinar de ese modo la baja producción del compuesto final. Para evitarlo la solución sería sobreexpresar el gen que codifica dicha enzima [12].
- IV. En los clústeres de biosíntesis se incluyen genes que codifican mecanismos de protección para la bacteria frente a efectos tóxicos del producto, y que en muchos casos influyen en la biosíntesis del antibiótico. Aumentar la resistencia a antibióticos se puede usar para seleccionar mutantes con producción incrementada [14].

- V. Expresar el clúster de biosíntesis de manera heteróloga en otra cepa no productora. En relación con la cepa huésped que se va a usar hay dos posibilidades: puede usarse la cepa nativa productora y entonces el clúster, que ya estaría presente en ella, resultaría sobreexpresado, o expresar estos clústeres en otras cepas diferentes, en muchos casos en cepas más fáciles de manipular genéticamente. Este enfoque hace que sea necesario que los clústeres puedan ser clonados en un vector del tamaño adecuado. Esto podría ser un inconveniente en el caso de rutas biosintéticas cuyos genes no estén agrupados en el cromosoma. Algunas consideraciones para tener en cuenta son las características de crecimiento de la cepa seleccionada, así como la disponibilidad de información y herramientas necesarias para llevar a cabo estrategias de manipulación genética [2, 14].
- VI. Combinar genomas de cepas productoras ya mejoradas [14].

Además, hay que destacar que la manipulación genética de los actinomicetos es muy compleja debido al alto contenido en pares GC en sus genomas, su morfología filamentosa y su lento crecimiento [3].

1.2.4. Aplicaciones

En el caso de la industria biotecnológica, la ingeniería metabólica se emplea para mejorar el metabolismo celular, conseguir un aumento de la productividad y lograr al mismo tiempo reducir o eliminar subproductos no deseados. Además, también puede emplearse para eliminar o reducir el efecto de rutas de regulación negativas (inhibición por retroalimentación *-feedback-*), para conseguir nuevos productos, para ampliar el rango de sustratos que pueden transformarse en un metabolito de interés o incluso mejorar otras características del procesamiento industrial [12]. De esta manera, con la ayuda de la ingeniería metabólica, puede lograrse que estos procesos sean económicamente competitivos para la comercialización a gran escala de los productos deseados.

En agricultura se puede emplear para rediseñar determinadas plantas y conseguir que tengan, por ejemplo, un mayor porcentaje de azúcar disponible que pueda usarse como materia prima en procesos industriales, o también es posible producir proteínas terapéuticas en plantas.

Sus aplicaciones en medicina se encuentran en aumento: pueden realizarse mediciones del flujo y perfil metabólico a células aisladas de animales de experimentación sanos, enfermos, tratados o mutantes, para así poder tener un mayor conocimiento de una determinada enfermedad humana. Los avances en este campo prometen contribuir al desarrollo de una medicina cada vez más personalizada que permita adaptar las terapias al perfil metabólico y genético de cada paciente [11].

1.3. Ejemplo de aplicación a nivel industrial: ingeniería metabólica de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de L-ornitina

La L-ornitina es un aminoácido no esencial con aplicaciones en la industria alimentaria como suplemento dietético. Además, es precursora en la síntesis de L-arginina. Puede ser producida mediante digestión enzimática de la caseína o por producción microbiana empleando cepas de *E. coli* o *C. glutamicum* manipuladas metabólicamente. Kim y colaboradores, en 2015, realizaron un estudio para conseguir incrementar la producción de L-ornitina en *C. glutamicum*. La cepa productora de *C. glutamicum* inicial producía 35,3 mg/L de ornitina. A esta cepa se aplicaron una serie de manipulaciones genéticas sucesivas [17].

El primer enfoque del estudio consistía en eliminar rutas competitivas. Para ello se eliminaron dos genes: *proB*, que codifica gamma-glutamil transferasa, para así bloquear una ruta alternativa competitiva, y *argF* que codifica L-ornitina carbamoiltransferasa, para conseguir bloquear la conversión de L-ornitina a citrulina. De este modo, se consiguió aumentar la producción de ornitina en un 7% [17].

Otro punto clave en el que se centraron fue en la represión ejercida por el operón de la arginina que limita la producción. Se eliminó el gen *argR*, que codifica para el represor de dicho operón, consiguiendo aumentar la producción en un 552% [17].

La siguiente estrategia se centró en mejorar la ruta de síntesis de la L-ornitina a partir de L-glutamato. Para ello se sobreexpresaron los genes *argCJBD*, implicados en esta ruta, mediante la clonación de dichos genes en un vector adecuado, con el cual se transformó la cepa de trabajo. El porcentaje de aumento de producción fue de 20297% [17].

El último punto de estudio fue el nivel de NADPH, cofactor implicado en diversas etapas de la síntesis de ornitina. Mediante la sustitución del promotor del operón de la transcetolasa (operón *tkl*) por un promotor fuerte (promotor de la superóxido dismutasa), se pretendía aumentar el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato. Se consiguió aumentar el nivel intracelular de NADPH y alcanzar un aumento de producción del 23979% con respecto a la cepa inicial [17].

Finalmente se realizaron cultivos en *fed-batch* para analizar el rendimiento de producción de ornitina con esta cepa manipulada metabólicamente, empleando glucosa como sustrato. Se obtuvo una producción de 51,5 g/L, con una productividad de 1,29 g/L/h [17].

Esto demuestra la gran repercusión y relevancia de la ingeniería metabólica, no solamente en el campo de la producción de antibióticos, sino también de otros compuestos. Además, también quedan reflejados los grandes aumentos de producción que pueden lograrse con estas técnicas.

1.4. Policétidos

Los policétidos son un grupo de metabolitos secundarios, que poseen gran diversidad tanto a nivel estructural como a nivel funcional. De esta manera presentan aplicación como

antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos y antivirales, entre otras. Las bacterias son productoras de policétidos, pero estos compuestos también pueden ser sintetizados por otros organismos como hongos, plantas, insectos, moluscos y protistas [18].

La síntesis de los policétidos es un proceso complejo que requiere la implicación de enzimas multifuncionales que reciben el nombre de policétido sintetasas (PKS). En el caso de *Streptomyces*, el cual es uno de los principales géneros de bacterias productoras de policétidos y uno de los mejor estudiados en términos de biosíntesis de estos compuestos, existen tres tipos de PKS: tipo I, tipo II y tipo III. Concretamente este estudio se centrará en las PKS de tipo I, las cuales son generalmente las responsables de la producción de policétidos macrocíclicos (macrólidos). Estos compuestos están caracterizados por un anillo macrocíclico de lactona [18].

El procedimiento de síntesis de un policétido involucra la condensación de unidades acilo o malonilo. Las PKS de tipo I son proteínas multifuncionales constituidas por varios módulos, cada uno de los cuales es responsable de un ciclo de condensación que tienen lugar de manera no iterativa. Al mismo tiempo, cada módulo está constituido por varios dominios que aportan diferentes actividades enzimáticas que proporcionan las funciones necesarias para dar lugar al policétido final a través de cada una de las condensaciones particulares [2, 18]. El primer dominio a considerar es el de la proteína transportadora de acilo (ACP), a la cual se transfieren las moléculas de sustrato (es decir, unidades acilo o malonilo). Dicha transferencia está catalizada por la actividad aportada por el dominio acetiltransferasa (AT). Para poder condensar nuevas moléculas de sustrato con la molécula unida a la ACP, es necesaria la actividad del dominio cetosintasa (KS), que cataliza dicha reacción. Estos tres serían los dominios esenciales presentes en un módulo de una PKS de tipo I. Además, los módulos pueden tener otros dominios adicionales: ceto-reductasa (KR), que reduce cetoésteres; deshidratasa (DH), que deshidrata los compuestos generándose un doble enlace carbono-carbono; y enoil-reductasa (ER), que reduce dicho doble enlace. Estas tres actividades enzimáticas son opcionales y sirven para introducir diversas modificaciones en los grupos funcionales presentes en la molécula de policétido [18]. Por lo tanto, en el proceso de producción de policétidos, la cadena de policétido en expansión se transfiere de un módulo a otro módulo, de manera que en cada módulo se incorpora a dicha molécula una nueva de sustrato y se modifican sus grupos funcionales en función de los tipos de dominios que conformen el módulo, hasta que la molécula completa se libera del último módulo por una actividad enzimática especial: una tiosterasa (TE) [2, 18]. Un ejemplo de cómo tiene lugar este proceso aparece representado en la Figura 2, donde se detalla el esquema de la PKS de tipo I involucrada en la biosíntesis del macrólido eritromicina, en el actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea*. Esta PKS se encuentra organizada en 3 subunidades: DEBS 1, DEBS 2 y DEBS 3, y cada una comprende varios módulos [2, 19]. Sin embargo, el compuesto liberado al final por la PKS no es el producto final, ya que a menudo es necesaria la actuación de una serie de enzimas

post-PKS, que llevan a cabo diversas modificaciones (oxidaciones, glicosilaciones, metilaciones, etc.) que confieren a los metabolitos la estructura final y su funcionalidad [18, 19].

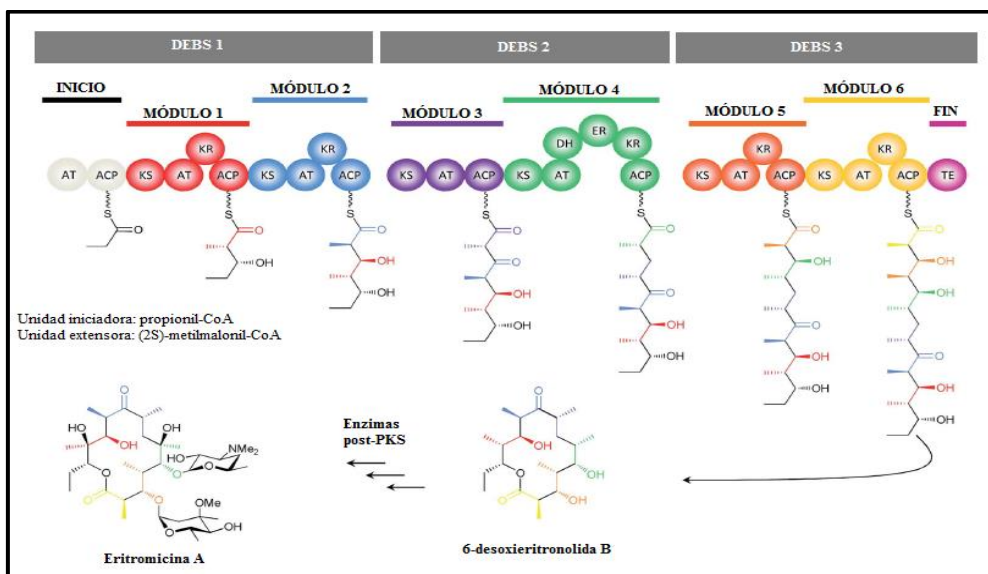


Figura 2. Esquema de la PKS de tipo I involucrada en la síntesis de la eritromicina. ACP: proteína transportadora de acilo. AT: aciltransferasa. KS: cetosintasa. KR: cetoreductasa. DH: deshidratasa. ER: enoil reductasa. TE: tosterasa [19].

2. OBJETIVOS

En este estudio se va a trabajar con las titanmicinas, grandes policétidos macrocíclicos glicosilados cuya estructura definitiva aún no se conoce, Figura 3, que están producidas por la cepa *Streptomyces sp.* CS227, aislada de hormigas cortadoras de hojas [20].

El objetivo final de este estudio es emplear estrategias de ingeniería metabólica para conseguir un aumento de producción de las titanmicinas en la cepa *Streptomyces sp.* CS227, ya que el clúster de biosíntesis de dicho metabolito se encuentra silenciado y no se expresa en condiciones normales de laboratorio [20]. Si se consiguiese incrementar la producción se podrían aislar estos compuestos en mayor cantidad lo que facilitaría la caracterización definitiva de su estructura.

Concretamente, el aumento de producción de estos policétidos macrocíclicos se va a intentar conseguir mediante la modificación de la disponibilidad de precursores, siendo este por

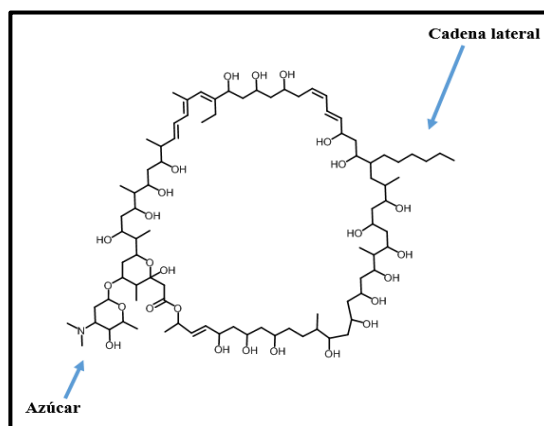


Figura 3. Esquema de la predicción de la estructura para las titanmicinas en base a los módulos de las PKS implicadas en su síntesis. Además, se señala el azúcar y la cadena lateral. La masa molecular es aproximadamente de 1600 Da, ya que se cree que la cadena lateral puede tener longitud variable (Comunicación personal de M. G. Malmierca).

tanto el objetivo de las manipulaciones genéticas a realizar. En vistas a conseguir este incremento en la disponibilidad de precursores se van a adoptar dos enfoques: el primero de estos tendrá como objetivo incrementar la disponibilidad intracelular de los precursores malonil-CoA y glucosa-1-fosfato, necesarios para la síntesis de cualquier compuesto macrocíclico glicosilado; mientras que el segundo se centrará más concretamente en incrementar aquellos precursores específicos que se necesitan para la síntesis de las titanmicinas, como es el etilmalonil-CoA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Plásmidos y cepas bacterianas

La cepa bacteriana que se usó es la cepa de *Streptomyces sp.* CS227 productora de titanmicinas [20]. Se realizó un análisis bioinformático de su genoma empleando el *software online* antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org#!/start>) y la herramienta *Protein BLAST*, blastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Otras cepas bacterianas que se usaron en este estudio fueron: *E. coli* DH5 α [21] como cepa huésped para la clonación y *E. coli* ET12567/pUB307 [22] para la conjugación intergenérica.

Para alcanzar los objetivos anteriormente planteados, se emplearon diferentes construcciones plasmídicas.

pMIXT: plásmido replicativo de 15,2 kb. Co-expresa los genes *ovmGIH*, que codifican para la ACC del clúster de biosíntesis de la oviedomicina de *S. antibioticus*, y el gen *pgm*, que codifica para una PGM de *S. coelicolor*, bajo el control del promotor constitutivo del gen de resistencia a la eritromicina E (*ermE***p*). Aporta resistencia al antibiótico ampicilina en *E. coli*, mientras que en *Streptomyces* la aporta frente a tiostreptona. Además, contiene el *oriT* (origen de transferencia para la conjugación) lo cual permite que pueda usarse como plásmido conjugativo (Figura 4, A) [23]. En este estudio se empleó este plásmido para sobreexpresar los genes *ovmGIH* y *pgm*, y analizar los efectos de dicha sobreexpresión.

pEM4T: plásmido replicativo de 8,8 kb. La presencia del origen de replicación pUC hace que sea replicativo en *E. coli*, mientras que el origen pWHM4 lo hace replicativo en *Streptomyces*. Permite la expresión de un determinado gen bajo la regulación del promotor *ermE***p*. Aporta resistencia a ampicilina en *E. coli* y a tiostreptona en *Streptomyces*. Puede ser utilizado en procedimientos de conjugación ya que contiene el *oriT* del plásmido RP4 (Figura 4, B) [24]. Este plásmido se utilizó, por un lado, para sobreexpresar el gen *tit35* en *trans* y, por otro lado, como plásmido control.

pOJ260E: plásmido suicida en *Streptomyces*. Tiene un tamaño de 3,6 kb, y permite la integración de un gen exógeno bajo el control del promotor *ermE***p* en el cromosoma bacteriano,

mediante recombinación simple. No obstante, en *E. coli* es replicativo ya que contiene el origen de replicación pUC. Aporta resistencia a apramicina tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*. Para poder emplearlo como plásmido conjugativo contiene el *oriT* de RP4 (Figura 4, C) [25]. Este vector se usó, al igual que el anterior, para sobreexpresar el gen *tit35*, pero en este caso en *cis*.

pSET152E: plásmido integrativo en *Streptomyces* de 5,9 kb. Permite subclonar un gen o grupo de genes bajo el control del promotor *ermE**p e integrarlos en el cromosoma de la bacteria, mediante recombinación sitio específica, gracias a que posee el gen *int* que codifica para la integrasa del fago phiC31 y además el sitio *attP* necesario para dicha recombinación. En *E. coli*, debido a la presencia del origen de replicación pUC, funciona como plásmido replicativo. Tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*, este plásmido aporta resistencia a apramicina (Figura 4, D) [20]. Este vector se empleó como plásmido control frente a cepas portadoras de construcciones derivadas de pOJ260E.

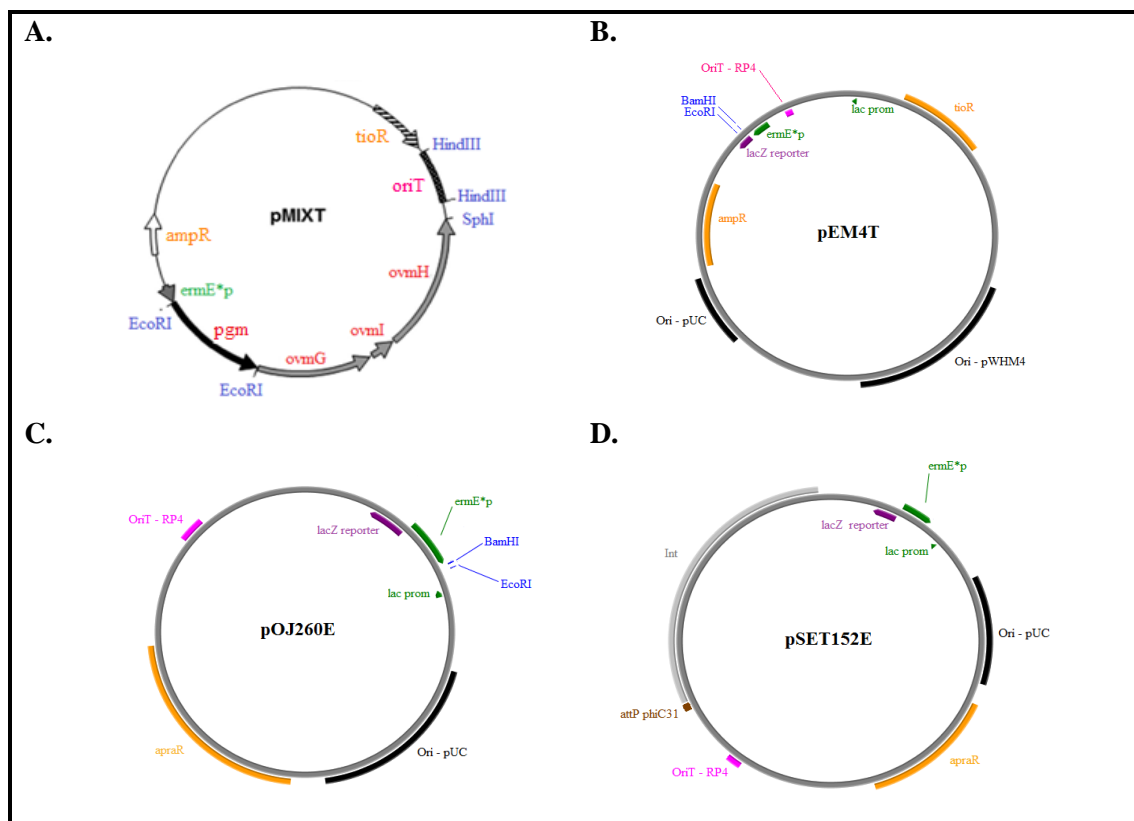


Figura 4. Esquema de los plásmidos. A) pMIXT [23]. B) pEM4T. C) pOJ260E. D) pSET152E. *tioR*, gen de resistencia a tiostreptona; *ampR*, gen de resistencia a ampicilina; *apraR*, gen de resistencia a apramicina; *ermE**p, promotor del gen de resistencia a la eritromicina E; *lac prom*, promotor del operón *lac*; *lacZ*, gen testigo que codifica β -galactosidasa; gen *pgm*, codifica fosfoglucomutasa; *ovmGIH*, grupo de genes que codifican el complejo acetil-CoA carboxilasa; *Ori-pUC*, origen de replicación en *E. coli*; *Ori-pWHM4*, origen de replicación en *Streptomyces*; *OriT-RP4*, origen de transferencia del plásmido RP4 para la conjugación; *Int*, gen que codifica la integrasa del fago phiC31; *attP* sitio para la recombinación. En azul se indican los sitios de restricción.

Los esquemas de los plásmidos pEM4T, pOJ260E y pSET152E se obtuvieron empleando el *software online* PlasMapper (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>).

3.2. Medios de cultivo

Medio MA (por litro): 21 g MOPS, 5 g de glucosa, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g extracto de carne, 1 g de casaminoácidos y 22 o 25 g/L agar; ajustado a pH 7 con KOH. Es un medio para la esporulación de *Streptomyces*.

Medio MS (por litro): 20 g manitol, 20 g harina de soja, 20 mM MgCl₂, y 2% agar. Se usa como medio de cultivo para la conjugación intergenérica.

Medio SNA 0,5% (por litro): 8 g de caldo de cultivo y 0,5% agar. Es un medio que se usa para la cobertera de la conjugación intergenérica.

Medio 2xTY (por litro): 16 g triptona, 5 g NaCl y 10 g extracto de levadura. Para hacer medio sólido hay que añadir además 22 g/L de agar. Se emplea como medio estándar para el crecimiento de *E. coli*.

Los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos, cuando fue necesario: ampicilina (100 µg/mL para *E. coli*), tiostreptona (25 µg/mL en medio sólido), apramicina (100 µg/mL para *E. coli* y 25 µg/mL para *Streptomyces*), cloranfenicol (25 µg/mL para *E. coli*), kanamicina (25 µg/mL para *E. coli* y 10 µg/mL para *Streptomyces*), tetraciclina (10 µg/mL para *E. coli*) y ácido nalidíxico (25 µg/mL).

3.3. Amplificación por PCR

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) para poder amplificar el gen *tit35*.

3.3.1. Diseño de cebadores para la PCR

Los cebadores utilizados en la reacción de amplificación fueron diseñados empleando el *software online* Primer3Plus (<https://primer3plus.com/>), el cual proporciona no solamente la secuencia del oligonucleótido, sino que además indica su correspondiente temperatura de *melting* o de fusión, T_m, que es la temperatura a la cual hibridan dichos oligonucleótidos. Para poder insertar posteriormente el amplicón en un plásmido, se le añadió un sitio de restricción en 5' y otro en 3' y se comprobó que los enzimas de restricción no digiriesen dentro del gen de interés empleando el *software online* NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

3.3.2. Condiciones de la PCR

Todas las reacciones de amplificación se realizaron con la polimerasa de alta afinidad *Herculase II Fusion* (*Agilent Technologies*). Cada PCR se realizó en un volumen total de 50 µL, conteniendo 10 µL del buffer de reacción *5X Herculase II*, 2-8 ng/µL del ADN molde (ADN genómico de la cepa de *Streptomyces sp.* CS227), 0,25 µM de cada cebador, 250 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 1 µL de la polimerasa y 5 µL de DMSO.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el termociclador *SureCycler 8800* (*Agilent Technologies*), comenzando con un ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 4 min. A continuación, 30 ciclos de amplificación que incluían una etapa inicial a 98 °C durante 20 s, seguida de una etapa a 55 °C ($T_m - 5$ °C) durante 20 seg, y una tercera a 72 °C durante 45 s (30 s/kb). Finalmente, una etapa de extensión a 72 °C durante 3 min.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa del 0,7% para comprobar si la PCR se había realizado correctamente. Finalmente, se realizó la extracción del amplicón (fragmento de 1,2 kb) a partir del gel de agarosa, utilizando el kit comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*).

3.4. Construcción de los plásmidos

3.4.1. Digestión de plásmidos e inserto

Los enzimas de restricción que se emplearon para las digestiones fueron: *FastDigest BamHI* y *FastDigest EcoRI* (*Thermo Scientific*).

La digestión de cada plásmido, pEM4T y pOJ260E, se realizó en un volumen total de reacción de 100 μ L, de los cuales 0,05 μ g/ μ L eran de ADN plasmídico, 10 μ L del buffer de digestión (*10X FastDigest Buffer*, de *Thermo Scientific*), 0,03 U/ μ L de cada enzima de restricción y 0,2 μ g/ μ L de ribonucleasa (RNasa). La digestión se llevó a cabo durante 20 min a 37 °C y sin agitación.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% para comprobar las digestiones, y se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico del gel empleando el *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*).

Para el producto de la PCR, la reacción de digestión se realizó en un volumen total de 60 μ L, de los cuales 0,017 μ g/ μ L eran el ADN por digerir disuelto en agua milli-Q, 6 μ L del buffer de digestión (*10X FastDigest Buffer*, de *Thermo Scientific*) y 0,03 U/ μ L, de cada enzima de restricción. La digestión se realizó a 37 °C, durante 30 min. Finalmente, se purificó el producto de la digestión empleando el kit comercial *GeneJET PCR Purification Kit* (*Thermo Scientific*).

3.4.2. Ligación

Se empleó el espectrofotómetro *SimpliNano* (*BioChrom*) para conocer la concentración de ADN presente en las muestras digeridas y poder calcular a partir de ellas la cantidad de ADN de inserto y de plásmido necesarias para cada ligación, proporción 1:3 (m/m).

La ligasa que se utilizó fue la *T4 DNA Ligase* (*Thermo Scientific*). La ligación se realizó en un volumen total de 20 μ L, constituidos por 4 μ L del buffer de ligación (*5X T4 DNA Ligase*

Buffer), 0,1 U/ μ L de la ligasa, según las indicaciones del fabricante; y la cantidad de plásmido e inserto la calculada previamente. La reacción de ligación se llevó a cabo durante 24 h, a 14 °C.

3.5. Transformación en *E. coli* DH5 α

Se realizó la transformación en *E. coli* DH5 α de los plásmidos obtenidos mediante choque térmico: se añadieron los 20 μ L de la ligación a las células DH5 α , se dejaron en hielo 20 min y se les realizó el choque térmico, a 42 °C durante 45 s. A continuación, 200 μ L de la transformación se añadieron en 800 μ L de medio líquido 2xTY, sin antibióticos, y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 250 rpm. Finalmente, se sembraron las transformaciones en placa en medio 2xTY, suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C durante un *overnight*.

3.6. Minipreparaciones

Las minipreparaciones de ADN se realizaron para comprobar que las colonias obtenidas tras las transformaciones contenían el plásmido esperado. Cada colonia para analizar se inoculó en 1 mL de medio 2xTY con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante un *overnight*. Tras esta incubación se hicieron las minipreparaciones, procedimiento que incluía la lisis de las células hospedadoras empleando lisozima (20 mg/mL) y hervido durante 45 s. Una centrifugación a 13200 rpm durante 15 min permitió precipitar las proteínas y el ADN cromosómico. El ADN plasmídico contenido en el sobrenadante se precipitó añadiendo acetato sódico, 3 M (pH 5,2) e isopropanol, en proporción 1:10 y 1:1 (v/v), respectivamente, y centrifugando a 13200 rpm durante 10 min. El *pellet* se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua mili-Q.

Se realizó una digestión de comprobación para ver si el plásmido aislado contenía el inserto, siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.4.1. y empleado como buffer de digestión el *10X FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)*.

3.7. Lisis alcalina

Este procedimiento permite obtener plásmidos a gran escala a partir de células de *E. coli*. Se inoculó una de las colonias que contenía el plásmido en 20 mL de medio 2xTY suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó la suspensión durante 15 h a 37 °C y 250 rpm. Para producir la lisis alcalina de las células se empleó lisozima (a una concentración final de 10 mg/mL) y una solución alcalina/SDS (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Tras añadir acetato potásico 3 M (pH 4,8) y centrifugar a 8000 rpm y 4 °C durante 10 min, se consiguió precipitar el ADN genómico. Para recuperar el ADN plasmídico contenido en el sobrenadante se añadió isopropanol en una proporción 1:0,7 (v/v) y se centrifugó a 4400 rpm durante 10 min. Se lavó el *pellet* con etanol al 70% y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8).

3.8. Generación de mutantes en *Streptomyces*

3.8.1. Transformación en *E. coli* ET12567/pUB307

Para cada reacción de transformación se añadieron 2-10 ng/μL del plásmido correspondiente disuelto en agua mili-Q a 50 μL de células *E. coli* ET12567/pUB307, las cuales son electrocompetentes. Esta suspensión se electroporó a 2500 V durante 5 ms, utilizando el electroporador *MicroPulserTM* (*Bio-Rad*). Las células electroporadas se inocularon en 800 μL de medio líquido 2xTY, sin antibiótico, y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 250 rpm. Finalmente, se sembraron las transformaciones en placa de medio 2xTY, suplementado con los antibióticos correspondientes. Estas placas se incubaron a 37 °C durante un *overnight*.

Para comprobar que las colonias que habían crecido tras la incubación contenían el plásmido se hicieron minipreparaciones según el protocolo indicado en la sección 3.6.

3.8.2. Conjugación *E. coli* y *Streptomyces*

La conjugación es un procedimiento de transferencia intercelular de plásmidos que implica contacto entre las células involucradas. En este caso, las células donadoras eran las *E. coli* pUB transformadas, y las receptoras las *Streptomyces sp.* CS227.

Las *E. coli* ET12567/pUB307 transformadas debían alcanzar la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica a 600 nm entre 0,4 y 0,6) para poder realizar la conjugación. Por este motivo, se determinó la densidad celular empleando el espectrofotómetro *BioPhotometer* (*Eppendorf*). A continuación, para eliminar cualquier resto de antibióticos que pudiera interferir con la conjugación, se centrifugaron las *E. coli* ET12567/pUB307 a 4400 rpm durante 2 min y se resuspendieron en medio líquido 2xTY.

Se realizó un lavado de las esporas de *Streptomyces sp.* CS227 para eliminar el glicerol en el que se encontraban guardadas y que podría interferir con el crecimiento de *Streptomyces* y de *E. coli*. Para ello se añadió medio líquido 2xTY a las esporas, se aplicaron dos programas de centrifugación a 11000 rpm durante 4 min y se resuspendió el *pellet* en medio 2xTY. A continuación, se pregerminaron las esporas incubando 10⁸ UFC (unidades formadoras de colonias) de las mismas durante 10 min a 50 °C y 250 rpm.

Para cada conjugación a las esporas pregerminadas se les añadieron 500 μL de las *E. coli* ET12567/pUB307 transformadas conteniendo el plásmido correspondiente. Estas conjugaciones fueron sembradas en placas con medio MS sin antibióticos e incubadas durante 12 h a 30 °C; tiempo tras el cual se les añadió la cobertera de medio SNA 0,5%, suplementado con ácido nalidíxico y el antibiótico correspondiente, y se incubaron a 30 °C. Se realizó un seguimiento periódico de las placas y las colonias que mostraron crecimiento se sometieron a pases selectivos

con el antibiótico correspondiente en medio MA e incubando a 30 °C. Finalmente, se sometieron a esporulación en medio MA para hacer un *stock* de dichas esporas en glicerol.

4. RESULTADOS

4.1. Elección de los genes a manipular

En vistas a lograr manipular la disponibilidad de precursores y teniendo en cuenta los dos enfoques a seguir indicados en los objetivos, se seleccionaron los genes cuya sobreexpresión daría lugar a la modificación deseada.

4.1.1. Para aumentar los precursores generales de la síntesis de policétidos glicosilados: acetil-CoA carboxilasa y fosfoglucomutasa

Este primer enfoque consistía en sobreexpresar los genes que codifican el complejo acetil-CoA carboxilasa (ACC), la cual es una enzima que cataliza la transformación de acetil-CoA en malonil-CoA. Conjuntamente también se sobreexpresó el gen *pgm*, que codifica fosfoglucomutasa (PGM), un enzima que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato es especialmente importante ya que muchos metabolitos secundarios se encuentran glicosilados con uno o varios desoxiazúcares derivados de ella. Consecuentemente, con esta estrategia se pretendía, por un lado, mediante la sobreexpresión de los genes que codifican la ACC incrementar la cantidad intracelular de malonil-CoA y, por otro lado, mediante la sobreexpresión del gen *pgm* incrementar la disponibilidad intracelular de glucosa-1-fosfato. Esto podría desencadenar una mayor producción, no solamente de titanmicinas, sino en general de los policétidos derivados del malonil-CoA, y que además se encuentren glicosilados con azúcares derivados de glucosa-1-fosfato [23].

4.1.2. Para aumentar la cantidad intracelular de etilmalonil-CoA necesario para la síntesis de titanmicinas: crotonil-CoA carboxilasa/reductasa

Esta estrategia estaba basada en la sobreexpresión del gen que codifica para la crotonil-CoA carboxilasa/reductasa. Esta enzima cataliza la transformación de crotonil-CoA en etilmalonil-CoA, y es clave en la ruta del etilmalonil-CoA, la cual interviene en la asimilación del acetil-CoA [26]. En la biosíntesis de las titanmicinas se necesita como precursor una unidad de etilmalonil-CoA. Por lo tanto, si se consigue incrementar la disponibilidad de dicho metabolito, se podría lograr incrementar la producción de titanmicinas.

Concretamente, en la cepa de *Streptomyces* de estudio, la CS227, el gen que codifica la crotonil-CoA carboxilasa/reductasa se encuentra localizado en el clúster biosintético 21, y se trataría del gen *tit35*. Esto se conoce gracias a la predicción bioinformática que proporciona el programa antiSMASH y la herramienta *online* blastP (Figura 5).

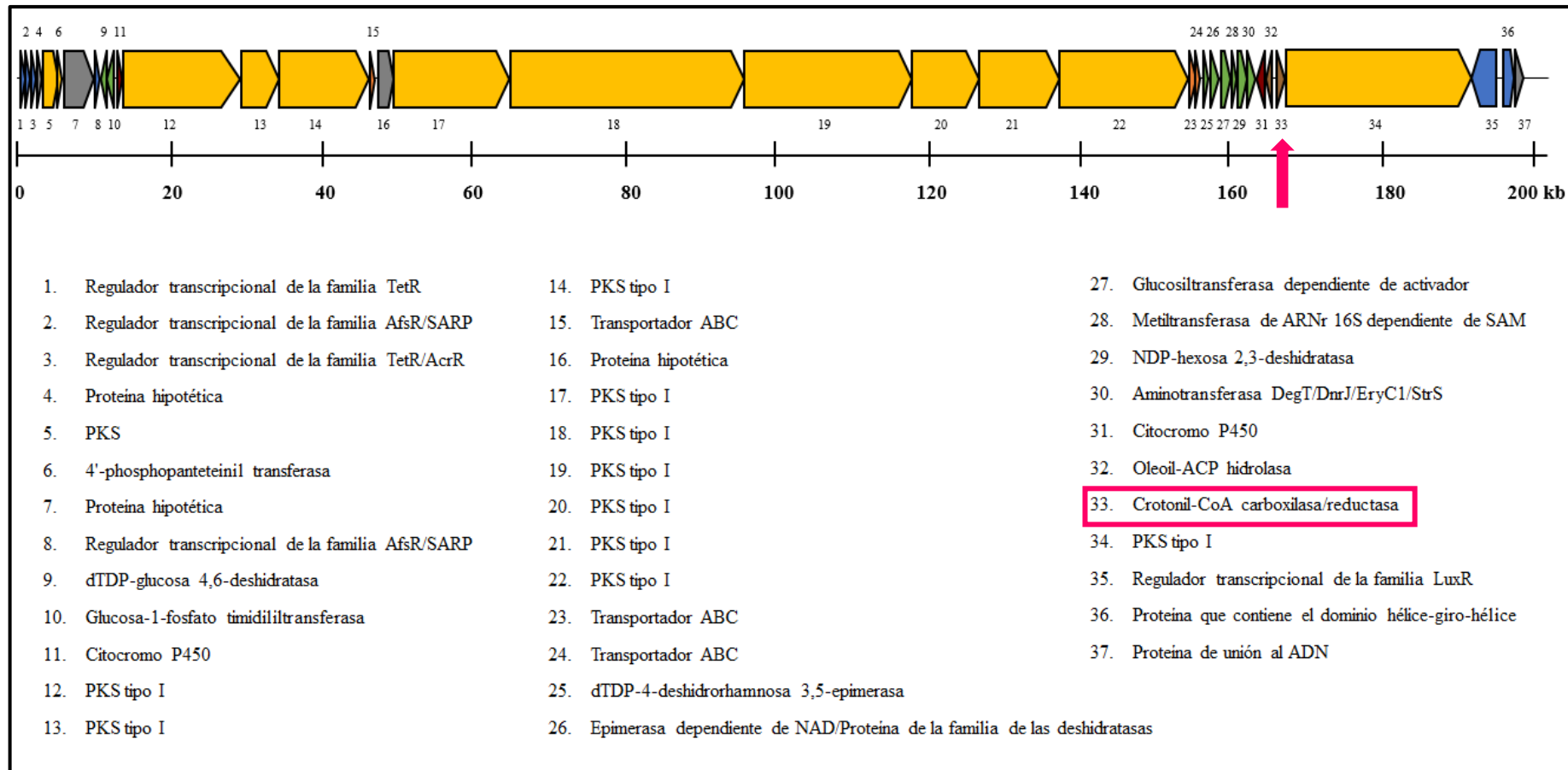


Figura 5. Esquema del clúster 21 de la cepa de *Streptomyces* sp. CS227. En azul, genes con función reguladora; en verde, genes implicados en la síntesis del desoxiazúcar; en amarillo, genes implicados en la síntesis de la cadena policetídica; en rojo, genes que codifican proteínas auxiliares; en marrón, genes implicados en la síntesis de precursores; en naranja, genes que codifican transportadores; y en gris, genes que codifican proteínas de función desconocida. Se señala en rosa el gen *tit35*, que codifica para la crotonil-CoA carboxilasa/reductasa, y que es el gen que se va a sobreexpresar empleando los plásmidos pEM4T y pOJ260E.

Una relación de las principales rutas metabólicas en las que intervienen los precursores implicados en la síntesis de titanmicinas se muestra en la Figura 6, donde se señalan además los genes a sobreexpresar y la dirección en la que dicha sobreexpresión modificaría las rutas.

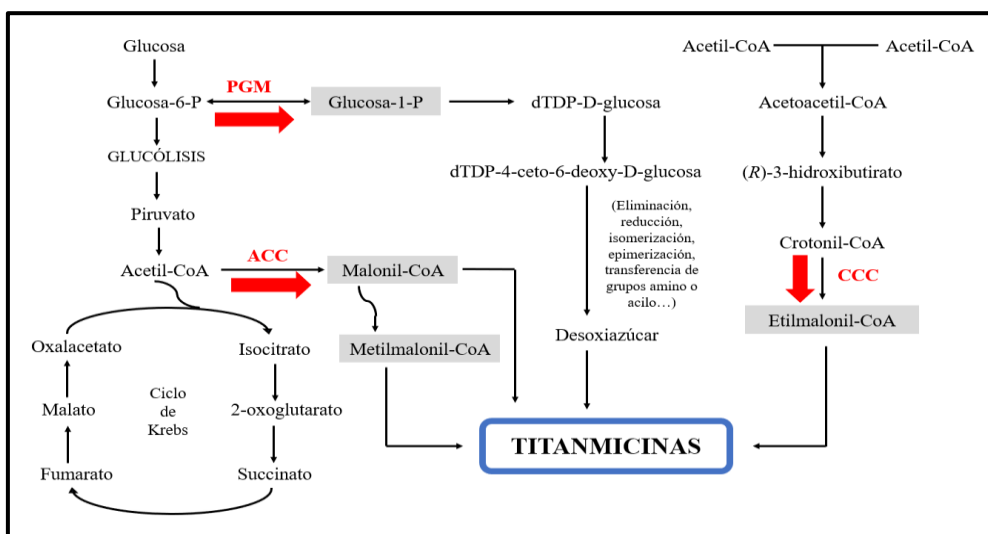


Figura 6. Esquema de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de los principales precursores necesarios para la síntesis de titanmicinas. De acuerdo con el análisis bioinformático realizado con el antiSMASH, se predice que para producir estos metabolitos se necesitan 23 x maloni-CoA, 9 x metilmaloni-CoA y 1x etilmaloni-CoA, además del correspondiente desoxiazúcar. Se indican en rojo los genes que van a sobreexpresarse en este estudio. PGM: fosfoglucomutasa. ACC: acetil-CoA carboxilasa. CCC: crotonil-CoA carboxilasa/reductasa [20, 23, 26, 27].

4.2. Diseño de los cebadores para la PCR

Los cebadores para llevar a cabo la reacción de amplificación del gen *tit35* fueron 227eccc.5 y 227eccc.3. Las secuencias de estos cebadores fueron determinadas a partir de la secuencia del gen empleando el *software* Primer3Plus (Tabla 1, Figura 7).

Para poder introducir, posteriormente, el amplicón en los plásmidos adecuados fue necesario añadirle un sitio de restricción en 5' y otro en 3'. Ambos plásmidos utilizados, pEM4T y pOJ260E, contienen sitios de reconocimiento para las enzimas BamHI y EcoRI. Estas enzimas, tal y como se vio con NEBcutter, no cortaban en el interior de la secuencia del gen. Por lo tanto, fueron los que se eligieron y se incluyeron en la secuencia de los cebadores. Finalmente, a la secuencia de ambos cebadores se le añadió al inicio los nucleótidos TAT para así facilitar que el enzima de restricción pueda actuar y además para compensar el % de GC de dichas secuencias.

Tabla 1. Cebadores usados en la reacción de PCR. En negro: secuencia obtenida con Primer3Plus. En rojo: sitio de reconocimiento de BamHI. En verde: sitio de reconocimiento de EcoRI. En azul: nucleótidos TAT.

Cebador	Extremo	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
227eccc.5	5'	TATGGATCCCGTGTCAAAAACGCTGTACG	60,4
227eccc.3	3'	TATGAATTCGCTAGGAAGCGGTGATCCT	60,2

```

CGTGTCAAAAACGCTGTACGAGCTGGGGCGACCCCCCGCCGCTCGGCGTGATCCCCGACCAGATG
TACGCGAACGTGATCCGCCAGGACCGCTTCGGAGAGCCCATCCAGGCGATGCGCACCGAGGTCC
TGCCGGTCCCCGGCCCGCCGGGGCGAGGTCTCTCGTCTACGTGATGGCCGCGGGCATCAACCA
CAACAACGTGTGGGCTCCCTCGGGAAGCCCATCGACGTCATCGCCATGCGCCAGAAGCTGCAC
GGCGCCACCAGGACTTCCACATCGGCGGCACCGACGCCTCCGGCGTGGTCTGGGCCGTGCGCG
AGGGCGTACGCAGTTCAAGGTGGGCGACGAGGTCGTACCTCCGGCGCGATCTGGGACGAGAC
CGCCGAGGACGTCCGGATGGGCATCGACCCGCTCGCCTCGAAGTCCCTGACCGCGTGGGGCTAC
GAGTCCAACCTACGGCTCCTTCGCGCAGTTCACGCGCGTCAAGGAACAGCAGTGCCACCCGAAGC
CCGAGAACCTGTCTGGGAGCACGCGGGCAGCTTCTGGTGACCGGGCGCCACCGCTACCGGCA
GCTCACCGGCTGGGCCCGAACGACGTGCAGCCGGGCGACCCGCTGCTGATCTGGGGCGGGCTCC
GGCGGCATCGGCTCGGCCCGGATCCAGGTCACCAACCTGCGCGGGCGGCATCCCCATCGCCGTCG
TCTCCAGCGAGGAGCGCGCAAGTGGGCCCTCGACCTCGGGCGCAAGGGCGTTCATCGACCGCAC
CGAGTTACCCACTGGGGGCGGTGCCCCGACGTGGTGACAAGGCCGCGCCAAGGCGTGGACC
GCCGAGGTCCGCCGCTTCGGCGCAAGTTCGGGAGGTCCTCGGGCAGCGCCGAACCCGCGCA
TCGTGCTCGAACACCCCGGCCAGGCGACCTGCCGACCTCCATGTTGCTGTCGACAACGGCGG
CATGGTTCGTATCTGCGGCGGCACCAGCGGCTACAACGGCGACCTCGACCTGCGCTACCTCTGG
ATGCGCAGCAAGCGGTCCAGGGTTCGCACGGTCCAGCACCCGCGAGAACCAGGGCCGTCATCC
GCCTCATGTCCGAGGGCCGCCTCGACCCGTGCGTCACCTGGTTCGGCGACCTTCGAGGACATCGC
CGAGGCCACCAGACGCTCCACGACAACCGCCAGGGCACCGGCAACTTCGCCGTCCTCGTCAAC
GCCACCTCACACGGGCTGACCACGCTCTCTGGGGTGGGCTAGGGGTTGCCGGGCGAGGATCACC
GCTTCCTACG
    
```

Figura 7. Secuencia empleada para el diseño de los cebadores para la PCR. Subrayado en gris y en azul aparece la secuencia del gen *tit35*; en rojo se indica donde hibrida el cebador 227ecc.5 y en verde se indica donde hibrida el cebador 227ecc.3.

4.3. Plásmidos obtenidos

El fragmento amplificado por PCR de 1,2 kb, correspondiente al gen *tit35* fue clonado en los sitios de restricción BamHI y EcoRI de los plásmidos pEM4T y pOJ260E para obtener los vectores finales pEM4Ti (10,0 kb) y pOJ260Ei (4,9 kb), respectivamente (Figura 8). Las construcciones fueron comprobadas por digestión y posterior secuenciación.

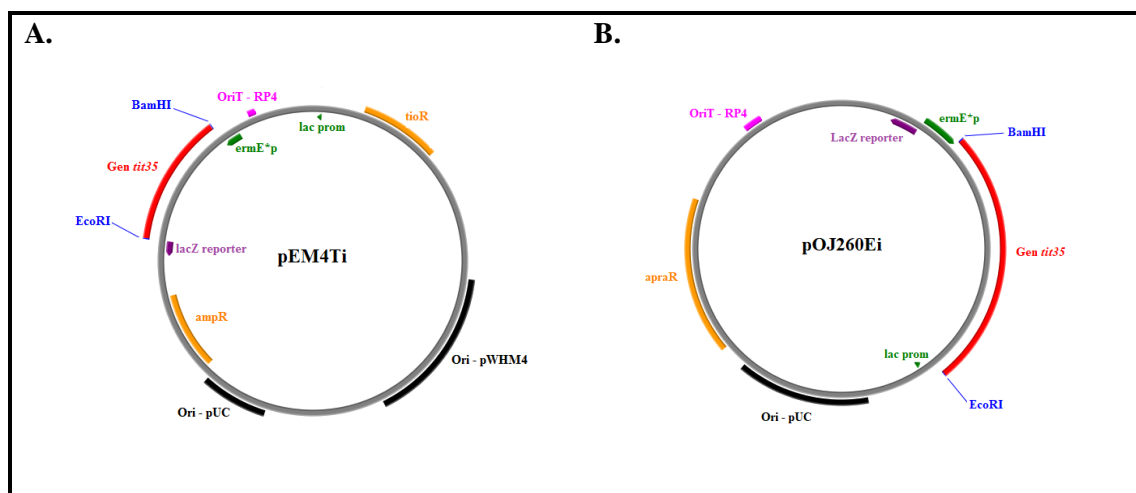


Figura 8. Esquema de los plásmidos obtenidos en este estudio portando el gen *tit35*. A) pEM4Ti. B) pOJ260Ei. *tioR*, gen de resistencia a tiosstreptona; *ampR*, gen de resistencia a ampicilina; *apraR*, gen de resistencia a apramicina; *ermE*p*, promotor del gen de resistencia a la eritromicina E; *lac prom*, promotor del operón *lac*; *lacZ*, gen *reporter* que codifica β -galactosidasa; *Ori-pUC*, origen de replicación en *E. coli*; *Ori-pWHM4*, origen de replicación en *Streptomyces*. En rosa: *OriT-RP4*, origen de transferencia del plásmido RP4 para la conjugación. En azul: sitios de restricción. Los esquemas de los plásmidos pEM4Ti y pOJ260Ei se obtuvieron empleando el *software online* PlasMapper.

4.4. Clones obtenidos

Tras la conjugación se observó crecimiento de colonias en las placas de cultivo por lo que se consiguieron los siguientes clones que fueron comprobados mediante PCR para verificar que portaban las construcciones adecuadas:

CS227 ACC/PGM: cepa de *Streptomyces* sp. CS227 conteniendo el plásmido pMIXT.

CS227 CCCtrans: cepa de *Streptomyces* sp. CS227 conteniendo el plásmido pEM4Ti.

5. DISCUSIÓN

En vista a los resultados obtenidos, el estudio no estaría completo ya que sería necesario comprobar la producción de metabolitos de las cepas generadas para así determinar si se ha conseguido producir un incremento de producción de las titanmicinas como consecuencia de las manipulaciones genéticas realizadas.

De forma genérica, un análisis de producción implica inicialmente propagar las cepas en un medio de cultivo adecuado para la producción de metabolitos secundarios. Este medio de cultivo es diferente en función de la cepa y el compuesto de interés, por lo que sería necesario probar varios medios de cultivo para encontrar el adecuado. Se realizaría entonces una incubación de estos cultivos, y se tomarían muestras a diferentes tiempos para determinar cuándo se produce el metabolito de interés. En el caso de que el metabolito de interés sea extracelular, este es excretado por los microorganismos al medio de cultivo, por lo que para poder separarlo de las células y de los metabolitos intracelulares, se emplearían técnicas sencillas como centrifugación o filtración [28]. Si el metabolito de interés es intracelular, el proceso es más complejo ya que es necesario lisar las células para poder obtenerlo. Se pueden encontrar técnicas de disrupción químicas (extracción empleando ácidos, o bien realizando una extracción alcalina), mecánicas (sonicación, microondas, por presión...) o combinaciones de las dos anteriores [29]. Finalmente, para realizar la extracción final y concentración de los metabolitos del medio de cultivo se emplearían solventes orgánicos. Al igual que pasaba con el caso del medio de cultivo, el solvente que se utilice será específico para cada tipo de metabolito, ya que el proceso de extracción depende de la naturaleza química del compuesto, y más concretamente de su polaridad ya que cuanto más similar sea la polaridad del compuesto a la del disolvente empleado más eficaz será la extracción. Algunos solventes usados frecuentemente y que son buenos para la extracción de metabolitos secundarios son: acetato de etilo, acetona, butanol y metanol [20, 30].

Para el caso de las titanmicinas todas estas etapas y parámetros comentados anteriormente ya son conocidos y se encuentran optimizados. Las titanmicinas son compuestos intracelulares que se producen en medio sólido MP5 (composición por litro: 7 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 g de NaNO₃, 36 mL de glicerol, 20,9 g de MOPS; ajustado a pH 7,5 con NaOH) a partir

del cuarto día de crecimiento a 30 °C. Para su obtención se realiza una extracción con metanol sonicando las células (Comunicación personal de M. G. Malmierca).

Finalmente, esas muestras extraídas que contendrían todos los metabolitos intracelulares producidos por la cepa de estudio serían analizadas para determinar la producción del compuesto específico. Una técnica que suele emplearse es la Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC). Esta técnica se basa en los mismos principios que la HPLC, de modo que permite separar los componentes de una mezcla, empleando una columna que actúa como fase estacionaria y una fase móvil que actúa como portadora de la muestra. En función de la naturaleza del compuesto se empleará una cromatografía de fase directa, con fase estacionaria polar y fase móvil no polar; o de fase reversa, con fase estacionaria no polar y fase móvil polar. Las más empleadas para este tipo de estudios son las cromatografías de fase reversa, de manera que los compuestos de la mezcla quedarán retenidos a lo largo de la columna en función de las interacciones no covalentes de los mismos con la fase estacionaria.

La UPLC tiene como ventajas el poder emplear presiones más elevadas y detectar compuestos presentes en menor concentración, además de proporcionar mayor sensibilidad, resolución y velocidad de procesamiento, en comparación con la HPLC, derivando en una mayor eficiencia de separación [31]. La eficiencia es inversamente proporcional al tamaño de las partículas empaquetadas en la columna que constituyen la fase estacionaria [32]. En el caso de la UPLC, el tamaño estándar de las partículas es de 1,7 μm que es el más utilizado [16, 20, 25, 32, 33, 34]. Las dimensiones de la columna también son determinantes en el proceso de separación. El poder de resolución viene determinado por la relación entre la longitud de la columna y el diámetro de las partículas, y cuanto mayor sea este cociente mayor será la eficiencia, de manera que las columnas de mayor longitud son las que permiten realizar las separaciones más difíciles. Las que se usan más frecuentemente en el análisis de producción de metabolitos son las de 100 mm, que proporcionan una alta resolución y buena eficiencia, pero permiten tiempos de análisis más cortos en comparación con otras de más longitud [16, 20, 25, 33, 34]. En relación con el diámetro interno, cuanto menor sea mayor será la sensibilidad. Los diámetros más pequeños (1 mm) son especialmente útiles para detectar metabolitos que se encuentran en muy baja concentración. No obstante, en los estudios de análisis de producción el tamaño más utilizado es de 2,1 mm ya que permite cargar la columna con mayor volumen de muestra y la eficiencia, aunque no es tan alta como en el caso de las columnas de 1 mm, sigue siendo buena [35].

Por otro lado, en la UPLC en fase reversa se necesita una fase móvil polar que estará constituida por la combinación de agua con un compuesto orgánico, el cual es menos polar. Hay estudios que indican que el empleo de agua pura como parte acuosa de la fase móvil no proporciona una buena elución de los antibióticos además de producir una separación inadecuada.

Este inconveniente se supera con la adición de aditivos ácidos los cuales modifican el pH de la fase móvil y así se consigue mejorar la separación y la detección. Un ácido que cumple estas condiciones es el ácido trifluoroacético, TFA, por lo que en la mayoría de los estudios de producción se emplea como parte acuosa agua mili-Q con TFA al 0,1%, ya que en esta proporción es con la que mejor separación y detección se consigue [16, 20, 25, 36]. Entre todos los compuestos posibles para constituir la parte orgánica de la fase móvil, el acetonitrilo, ACN, es el más utilizado [16, 20, 25, 33]. Este compuesto es miscible con agua y compatible con los aditivos ácidos empleados, además de proporcionar fases móviles de menor viscosidad, lo cual permite trabajar a mayores caudales y reducir los tiempos de análisis [36, 37].

Finalmente, el modo de elución suele ser en gradiente, en el cual la concentración del solvente orgánico que se emplea varía a lo largo del tiempo. Este tipo de elución permite separar todos los componentes de la mezcla, muy variados en cuanto a polaridad, en un tiempo razonable, y ejercer un mayor control durante el proceso de elución mejorando la detección y la resolución. El ACN es el que suele emplearse ya que tiene una elevada fuerza de elución, es decir, permite debido a su alta polaridad, separar los metabolitos de forma rápida [37]. El gradiente de ACN que suele emplearse en análisis de compuestos similares a las titanmicinas, como pueden ser otros policétidos glicosilados como sipanmicinas o mitramicinas, es de 10 al 100% de ACN [16, 20].

Por lo tanto, siempre y cuando la toma y medida de las muestras esté estandarizada, comparando los cromatogramas de las cepas modificadas con respecto a los de la cepa nativa se podría determinar si las alteraciones genéticas realizadas han provocado algún efecto en la producción de los metabolitos en estudio. Por comparativa se podrían observar diferencias entre ambos cromatogramas del tipo presencia o ausencia de un metabolito, o en relación con la cantidad de metabolito presente en cada muestra [20]. Para poder dar un dato de la concentración del compuesto en cada muestra sería necesario realizar una curva patrón empleando el compuesto puro a diferentes concentraciones. Se elaboraría entonces una recta patrón que relacionaría la concentración del metabolito con el área del pico cromatográfico, de la cual podrían extrapolarse las áreas de los picos de los cromatogramas de las muestras y determinar la concentración. El inconveniente que presenta esta estrategia es la disponibilidad del metabolito puro.

Podría además realizarse una etapa adicional empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de Masas (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, HPLC-MS) la cual combina la capacidad de separación de la HPLC con la capacidad de la MS para determinar la masa molecular de los compuestos a partir de su masa atómica. De esta forma se podría comprobar la masa del compuesto para asegurar que estamos trabajando con el metabolito de interés. Para el caso de titanmicinas, sería una masa molecular de aproximadamente 1600 Da.

Una vez llegados a este punto, se podrían encontrar dos situaciones diferentes: que se haya conseguido producir en la cepa de *Streptomyces* estudiada un incremento de producción de las titanmicinas o que no se haya conseguido.

En el caso de que se haya logrado incrementar la producción, se habría alcanzado el objetivo del estudio. A partir de este momento podrían realizarse una serie de estudios adicionales para poder obtener la mayor cantidad de información posible con el objetivo de caracterizar adecuadamente a estos metabolitos secundarios.

Por un lado, se podría realizar la elucidación estructural del compuesto. Para ello primeramente sería necesario realizar el aislamiento del metabolito de interés. Habría que hacer entonces un cultivo de la cepa sobreproductora en el medio MP5, pero a mayor escala que el cultivo realizado para determinar la producción inicial. Una vez extraídos los metabolitos producidos, se realizaría una HPLC preparativa que busca conseguir el aislamiento y la purificación de un compuesto específico de la mezcla, diferenciándose en este sentido de la HPLC analítica que tiene como único objetivo la separación de los componentes de la muestra para ponerlos de manifiesto. Además, en la modalidad preparativa se emplean mayores volúmenes de muestra. Finalmente, para la elucidación estructural del compuesto se emplearía la espectroscopía de RMN, técnica que permite estudiar la estructura de un determinado compuesto y que se basa en las propiedades nucleares de un átomo, siendo de especial importancia que el núcleo posea espín, es decir, que tenga un número impar de protones y/o neutrones (^1H , ^{13}C ...) y que sea, por tanto, magnéticamente activo. Mediante la aplicación de un campo electromagnético y de pulsos de radiofrecuencia, se produce una excitación de dichos núcleos y se obtiene un espectro de frecuencias frente a su intensidad. En el caso de los espectros de RMN 1D, la información que se puede obtener es acerca de un sitio químico concreto, pudiendo determinar su ambiente químico, núcleos cercanos, etc. En cambio, en el caso de los espectros de RMN 2D se puede obtener además información acerca de la conexión entre diferentes núcleos y por tanto se facilita de esta manera la elucidación de la estructura molecular. En el caso de trabajar con compuestos cuya estructura definitiva es desconocida, como es el caso de las titanmicinas, es necesario comparar los resultados de RMN con una biblioteca de compuestos de estructura ya conocida y conseguir de esta manera determinar la identidad de los diferentes átomos o grupos atómicos [20, 38].

Por otro lado, una vez determinada la estructura del compuesto, otros posibles estudios que se podrían hacer son los correspondientes a la determinación de su actividad antimicrobiana, para de esta manera poder determinar las aplicaciones que podrían tener las titanmicinas en salud, agricultura y medioambiente. Tal y como se indicaba en la introducción de este estudio, una de las causas por las que es importante la búsqueda de nuevos antibióticos es debido al incremento en el número de patógenos multirresistentes. Es por esto por lo que puede ser particularmente

interesante testar la actividad microbiana de las titanmicinas frente a estos microorganismos, ya que si tuvieran actividad frente a ellos esto supondría un gran avance: no solamente se conseguiría tener un nuevo antibiótico, sino que además este sería útil frente a bacterias multirresistentes. Algunos ejemplos de microorganismos multirresistentes a antibióticos que podrían analizarse serían *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina y *Enterococcus* resistentes a vancomicina [39, 40, 41]. Sería además interesante analizar la actividad de las titanmicinas frente a microorganismos patógenos causantes de importantes enfermedades (*Klebsiella pneumoniae*, causante de infecciones nosocomiales, *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea, y *Vibrio cholerae*, causante del cólera), para de esta manera poder tratar dichas enfermedades sin necesidad de recurrir a los antibióticos tradicionales [41, 42]. Por otro lado, también podría analizarse su actividad antitumoral frente a diferentes líneas celulares tumorales, como es el caso de las células HeLa o las células IGROV [24]. Si se desea testar su actividad como antifúngico, algunos hongos patógenos de humanos como *Candida albicans* o *Aspergillus niger*, son los que se analizan frecuentemente [39, 42]. Adicionalmente, y en vistas a posibles aplicaciones en el campo de la agricultura, podría analizarse la actividad antifúngica frente a hongos patógenos de plantas como *Macrophomina phaseolina* o *Ustilago maydis* [42].

Para hacer estas determinaciones pueden emplearse diferentes métodos. Una de estas técnicas sería la difusión en disco, que es la que se emplea rutinariamente en laboratorios clínicos. Este enfoque implica inocular placas de agar con el microorganismo frente al que se va a medir la actividad. Se emplean discos de papel de filtro con el compuesto de interés a la concentración deseada y se colocan en dichas placas. De esta manera se podría determinar si el metabolito es activo o no frente a un determinado microorganismo, en función del resultado del antibiograma [41, 43]. Tiene como ventajas ser un método sencillo, rápido y de fácil interpretación de los resultados, mientras que presenta el inconveniente de no permitir calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja de un determinado compuesto que consigue inhibir el crecimiento del microorganismo que se esté analizando [43]. En este sentido, para superar ese inconveniente existe otra técnica básica y también muy empleada frecuentemente. Se trata de la microdilución, la cual se realiza en una placa de microtitulación de 96 pocillos, donde se hacen diluciones seriadas del agente antimicrobiano en medio de cultivo líquido. A continuación, se inocula el pocillo con el microorganismo correspondiente y se somete a un período de incubación, tras el cual, para la determinación de la CMI, se emplean métodos colorimétricos como el ensayo MTT o el XTT [43, 44]. Si lo que se desea es hacer un análisis más profundo que nos permita además determinar otras características, como por ejemplo obtener información adicional sobre la interacción entre el agente antimicrobiano y la cepa, o saber si es un agente bactericida o bacteriostático, una técnica utilizada frecuentemente es el ensayo cinético

de tiempo-muerte. Para ello, se dispone de varios tubos que contienen el microorganismo a ensayar inoculado en medio líquido, a cada uno de los cuales se añade una concentración diferente del agente antimicrobiano, y se incuban. A diferentes tiempos se toman alícuotas que luego se siembran en placa y se hace la cuantificación de las UFC presentes. Se puede de esta manera comparar las UFC de las diferentes alícuotas correspondientes a diferentes concentraciones del agente a ensayar y a diferentes tiempos de incubación para ver si hay un efecto antimicrobiano dependiente de la concentración o del tiempo [43, 44]. En el caso de ensayos con líneas celulares tumorales se emplean métodos colorimétricos, como el ensayo con sulforodamina B (SRB), la cual es un colorante fluorescente que se une a las proteínas y de esta manera permite determinar la densidad celular [24].

Tras realizar todos estos análisis tendríamos una buena caracterización de las titanmicinas, tanto a nivel molecular como funcional. No obstante, puede ocurrir que no presenten actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos o líneas celulares tumorales y por tanto que no pueda emplearse en el campo de la medicina. Hay que tener en cuenta que los metabolitos secundarios producidos de forma natural por un determinado microorganismo tienen como objetivo realizar una función que sea útil para ese organismo productor y, por lo tanto, pueden no encontrarse optimizados para su aplicación como fármacos clínicos. En este sentido, una de las estrategias que puede llevarse a cabo es emplear la ingeniería genética para modificar la estructura de ese compuesto, intentando con ello su optimización para interactuar con los sistemas biológicos y receptores. Esta estrategia ya ha sido aplicada para algunos policétidos, ya que en el caso de estos compuestos su estructura, tal y como se comentó en la introducción, está determinada por los módulos de las PKS, de manera que si se aplica ingeniería genética para modificar dichos módulos el producto final resultante tendrá una estructura distinta y una posible funcionalidad diferente. Se tendrían que volver a realizar entonces ensayos de actividad del compuesto modificado. El inconveniente que presenta este enfoque es que requiere mucho tiempo y trabajo, y no es posible asegurar que el nuevo compuesto generado presente actividad antimicrobiana o antitumoral [45].

En el caso de que la producción de titanmicinas no se viese afectada por las modificaciones realizadas no se observarían diferencias entre el cromatograma de la cepa modificada y la nativa, de manera que no se habría alcanzado el objetivo del estudio. Esto podría deberse a la existencia de mecanismos de regulación interna en el microorganismo, que impidan que las manipulaciones genéticas realizadas tengan el efecto esperado. Una solución sería volver a aplicar una nueva estrategia de ingeniería metabólica, pero en este caso poniendo como objetivo a manipular genéticamente los genes que codifiquen reguladores, tanto activadores como represores. En el caso del clúster 21 de la cepa *Streptomyces sp.* CS227, están presentes varios reguladores de diferentes clases, como, por ejemplo, los reguladores positivos de la familia SARP que generalmente actúan al final de la cascada de transducción de la señal y activan directamente la

transcripción de los genes biosintéticos, o los reguladores negativos de la familia TetR que bloquean la transcripción. En el caso de activadores podría abordarse su sobreexpresión, expresando el gen codificante bajo el control del promotor *ermE***p*. En el caso de los represores se podría emplear el sistema CRISPR-Cas9, en el cual se emplearía una molécula de ARN guía (ARNg) que mediante complementariedad de bases hibridaría con alguna región del gen diana (el codificante del represor), y que a su vez actuaría como guía de la endonucleasa Cas9, la cual causaría una ruptura de doble cadena en el ADN en dicha posición, que sería reparada mediante una recombinación homóloga con las secuencias flanqueantes del gen diana. Los genes codificantes de estos elementos (ARNg, nucleasa Cas9 y regiones homólogas) se encontrarían en un plásmido que sería introducido en la cepa de *Streptomyces* en estudio. De esta manera se conseguiría eliminar el gen codificante del represor (*knock-out*) [46].

Otra posible explicación a una eventual ausencia de incremento en la producción de titanmicinas podría ser que con la sobreexpresión de los genes *ovmGIH*, *pgm* y *tit35* sí se consiga incrementar la disponibilidad intracelular de precursores pero que debido a la existencia de rutas competitivas no se consiga desviar el flujo metabólico hacia la vía de producción de los compuestos en estudio. Mediante el análisis bioinformático del genoma de la cepa *Streptomyces* sp. CS227 empleando antiSMASH, se observa que la principal ruta competitiva es la de biosíntesis de la candicidinas cuyo clúster biosintético es el 20 [24]. Estos compuestos son macrólidos glicosilados y para su biosíntesis se necesitan, al igual que para la síntesis de titanmicinas, malonil-CoA, metilmalonil-CoA, etilmalonil-CoA y glucosa-1-fosfato, esta última para la síntesis del azúcar que decora a las candicidinas. La solución para este inconveniente sería inactivar los genes implicados en la síntesis de candicidinas, empleando una estrategia como la comentada anteriormente.

Analizando el clúster biosintético de titanmicinas se observa que está presente un gen que codifica para una metiltransferasa de ARNr 16S dependiente de S-adenosilmetionina (SAM) ya que posee un motivo de unión a SAM. Se han realizado estudios en los que mediante una mutación en el gen codificante de esta enzima se consigue incrementar la producción de policétidos. Esta sería una manipulación relacionada con el enfoque de conseguir incrementos de producción mediante el aumento de resistencia a antibióticos mediante mutaciones en genes codificantes de proteínas ribosomales [20, 47]. Este tipo de aproximación se ha realizado con éxito en la producción de actinohordina. La mutación en el gen codificante de la metiltransferasa se trataría de una inserción que determinaría la aparición de codones de parada tras dicha inserción y causaría resistencia de bajo nivel a estreptomycin, al mismo tiempo que se incrementarían los niveles de producción del metabolito. En cepas de *S. coelicolor* alteradas de este modo se confirmó que dicha mutación era la causante del aumento de producción de actinohordina al introducir en la cepa mutada un plásmido portando el gen nativo y observando que se perdía la

resistencia a estreptomicina y el incremento de producción conseguidos con la mutación. Por lo tanto, podría intentarse emplear un enfoque de este tipo con la cepa productora de titanmicinas, dada la presencia del gen codificante de dicha enzima en el clúster de biosíntesis [47].

Finalmente, otra estrategia que podría abordarse de cara a incrementar la producción de estos compuestos sería la expresión del clúster de biosíntesis de forma heteróloga en otras cepas que sean más fáciles de manipular genéticamente (*S. coelicor* A3(2), *S. lividans* TK21, *S. albus* J1074) o cepas industriales genéticamente modificadas para conseguir incrementos de producción de determinados compuestos, como *S. ambofaciens* para el caso de los macrólidos. Estas estrategias han permitido alcanzar incrementos de producción de diversos metabolitos [48]. En el caso de titanmicinas esta estrategia sería muy complicada ya que el clúster de biosíntesis tiene un tamaño de aproximadamente 200 kb, lo cual dificulta su clonación ya que sería necesario clonarlos en cromosomas artificiales bacterianos (BACs) y debido al gran tamaño de estas construcciones su manipulación sería asimismo más compleja [49].

Además, estas estrategias de manipulación de rutas reguladoras y rutas competitivas también podrían emplearse en caso de que se cumpla el objetivo del estudio para tratar de incrementar aún más los niveles de producción de titanmicinas de cara a su producción a escala industrial.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se plantea el uso de la ingeniería metabólica para conseguir incrementar la producción de las titanmicinas en la cepa productora *Streptomyces* sp. CS227. Se puede concluir que los genes *ovmGIH*, *pgm* y *tit35* son claves en la síntesis de los precursores de las titanmicinas por lo que se establecieron como los objetivos de las manipulaciones genéticas a realizar. No obstante, no es posible extraer conclusiones acerca de si la sobreexpresión de dichos genes aumenta la producción ya que no se han podido realizar los análisis experimentales necesarios.

Para completar el estudio sería necesario llevar a cabo la determinación de la producción de las cepas modificadas generadas. En el caso de que la producción se vea incrementada, se podría realizar la elucidación estructural de las titanmicinas y llevar a cabo estudios para determinar su potencial como antibióticos, antifúngicos y antitumorales. En el caso de que no se consiguiese el aumento de producción, se podrían emplear aproximaciones similares a la manipulación de otros genes diana implicados en la biosíntesis de titanmicinas (p.e. reguladores y de resistencia) o participantes en procesos biosintéticos competidores.

De esta manera se podría concluir que la ingeniería metabólica es una herramienta muy potente en el estudio y descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos, lo cual es muy útil de cara a hacer frente al problema de la aparición de nuevas bacterias multirresistentes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 2005; 58(1):1-26.
- [2] Weber T., Charusanti P., Musiol-Kroll E.M., Jiang X., Tong Y., Kim H.U., Lee S.Y. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(1):15-26.
- [3] Palazzotto E., Tong Y., Lee S.Y., Weber T. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery. *Biotechnol Adv.* 2019; 1(37):107366.
- [4] Demain A.L., Sánchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot.* 2009; 62(1):5-16.
- [5] Bro C., Nielsen J. Impact of ‘ome’ analyses on inverse metabolic engineering. *Metab Eng.* 2004; 6(3):204-211.
- [6] Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci.* 1973; 70(11):3240-3244.
- [7] Bailey J.E. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 1991; 252(5013):1668-1675.
- [8] Stephanopoulos G., Vallino J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science.* 1991; 252(5013):1675-1681.
- [9] Woolston B.J., Edgar S., Stephanopoulos G. Metabolic engineering: past and future. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2013; 4:259-288.
- [10] Stephanopoulos G., Aristidou A.A., Nielsen J. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. 1ª Ed. San Diego:Academic Press; 1998.
- [11] Raab R.M., Tyo K., Stephanopoulos G. *Metabolic engineering*. En: Nielsen J., editor. *Biotechnology for the future, advances in biochemical engineering/biotechnology*. 1ª Ed. Berlín: Springer; 2005. p. 1-17.
- [12] Yang S.T., Liu X., Zhang Y. *Metabolic engineering: applications, methods and challenges*. En: Yang S.T., editor. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. 1ª Ed. Amsterdam: Elsevier; 2006. p.73-118.
- [13] Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., Jager V., Zarkrewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Web Server issue):339-346.
- [14] Olano C., Lombó F., Méndez C., Salas J.A. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng.* 2008; 10(5):281-292.

- [15] Chen Y., Smanski M.J., Shen B. Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 86(1):19-25.
- [16] Zabala D., Braña A.F., Flórez A.B., Salas J.A., Méndez C. Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metab Eng.* 2013; 20:187-197.
- [17] Kim S.Y., Lee J., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. *Biotechnol Bioeng.* 2015; 112(2):416-421.
- [18] Risdian C., Mozeff T., Wink J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms.* 2019; 7(5):124.
- [19] Weissman K.J. Genetic engineering of modular PKS: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology. *Nat Prod Rep.* 2016; 33(2):203-230.
- [20] 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., Salas J.A. Searching for glycosylated natural products in actinomycetes and identification of novel macrolactams and angucyclines. *Front Microbiol.* 2018; 9(39).
- [21] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166(4):557-580.
- [22] Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. *Practical Streptomyces genetics*. 1ª Ed. Norwich: The John Innes Foundation. 2000.
- [23] Zabala D., Braña A.F., Salas J.A., Méndez C. Increasing antibiotic production yields by favoring the biosynthesis of precursor metabolites glucose-1-phosphate and/or malonyl-CoA in *Streptomyces* producer strains. *J Antibiot.* 2015; 69(3):179-182.
- [24] Menéndez N., Nur-e-Alam M., Fischer C., Braña A.F., Salas J.A., Rohr J., Méndez C. Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(1):167-177.
- [25] Olano C., García I., González A., Rodríguez 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(3):242-256.
- [26] Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Müller M., Furchs G., Alber B.E. Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(25):10631-10636.

- [27] Metsä-Ketelä M., Niemi J., Mäntsälä P., Schneider G. Anthracycline biosynthesis: genes, enzymes and mechanisms. En: Krohn K., editor. Anthracycline Chemistry and Biology I: biological occurrence and biosynthesis, synthesis and chemistry. 1ª Ed. Berlín: Springer; 2008. p. 101-142.
- [28] Pinu F.R., Villas-Boas S.G. Extracellular microbial metabolomics: the state of the art. *Metabolites*. 2017; 7(3):43.
- [29] Pinu F.R., Villas-Boas S.G., Aggio R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols. *Metabolites*. 2017; 7(4):53.
- [30] Arasu M.V., Rejinienmon T.S., Al-Dhabi N.A., Dhraipanduyan V., Agastian P., Huxley V.A.J., Song C.E., Choi K.C. *In vitro* antimicrobial potential of organic solvent extract of novel actinomycetes isolated from forest soil. *Afr J Biotechnol*. 2014; 13(18):1891-1897.
- [31] Swartz M.E. Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction. *Lc Gc North America*. 2005; 23(5):8-14.
- [32] The promise of small particles. Disponible en: https://www.waters.com/waters/en_US/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en_US (Consultado: 19/05/2020).
- [33] Rao M., Feng L., Ruan L., Ge M., Sheng X. UPLC-MS-Based metabolomic study of *Streptomyces* strain HCCB10043 under different pH conditions reveals important pathways affecting the biosynthesis of A21978C compounds. *Anal Lett*. 2013; 46(15):2305-2318.
- [34] Cazorla-Reyes R., Romero-González R., Frenich A.G., Martínez Vidal J.L., Rodríguez Maresca M.A. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2014. *J Pharm Biomed Anal*; 89: 203-212.
- [35] Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Columns. Disponible en: https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/acquity_uplc_columns_brochure_7200114_0en.pdf (Consultado: 19/05/2020).
- [36] Kameník Z., Hadacek F., Marečková M., Ulanova D., Chobot V., Plháčková K., Olšovská J. Ultra-high-performance liquid chromatography fingerprinting method for chemical screening of metabolites in cultivation broth. *J Chromat A*. 2010; 1217(51):8016-8025.
- [37] The role of methanol and acetonitrile as organic modifiers in reversed-phase liquid chromatography. Disponible en: <https://www.chromatographytoday.com/article/help-desk/63/advanced-chromatography-technologies/the-role-of-methanol-and-acetonitrile-as-organic-modifiers-in-reversed-phase-liquid-chromatography/2507> (Consultado: 20/05/2020).

- [38] Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 2D. Disponible en: http://espectroscopico.weebly.com/uploads/1/7/6/6/17662713/2d_nmr.pdf (Consultado: 15/05/2020).
- [39] Flora D.O., Adeyemi A.I., George W.P. Antimethicilin resistance agents from marine actinomycetes from soil sediments of Lagos Lagoon. *J Coast Lif Med*. 2015; 3(3):193-198.
- [40] Sharma D., Kaur T., Chadha B.S., Manhas R.K. Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Trop J Pharm Res*. 2011;10(6):801-808.
- [41] Singh S., Kumar P., Gopalan N., Shrivastava B., Kuhad R.C., Chaudhary H.S. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2(2): 1147-1150.
- [42] Sengupta S., Pramanik A., Ghosh A., Bhattacharyya M. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiol*. 2015; 15:170.
- [43] Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal*. 2016; 6(2):71-79.
- [44] Appiah T., Boakye Y.D., Agyare C. Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017: 1-15.
- [45] Floss H.G. Combinatorial biosynthesis-potential and problems. *J Biotechnol*. 2006; 124(1):242-257.
- [46] Huang H., Zheng G., Jiang W., Hu H., Lu Y. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015; 47(4): 231-243.
- [47] Nishimura K., Hosaka T., Tokuyama S., Okamoto S., Ochi K. Mutations in rsmG, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*. 2007; 189(10):3876-3883.
- [48] Baltz R.H. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010; 37(8):759-772.
- [49] Bekiesch P., Basitta P., Apel A.P. Challenges in the heterologous production of antibiotics in *Streptomyces*. *Arch Pharm*. 2016; 349(8):594-601.