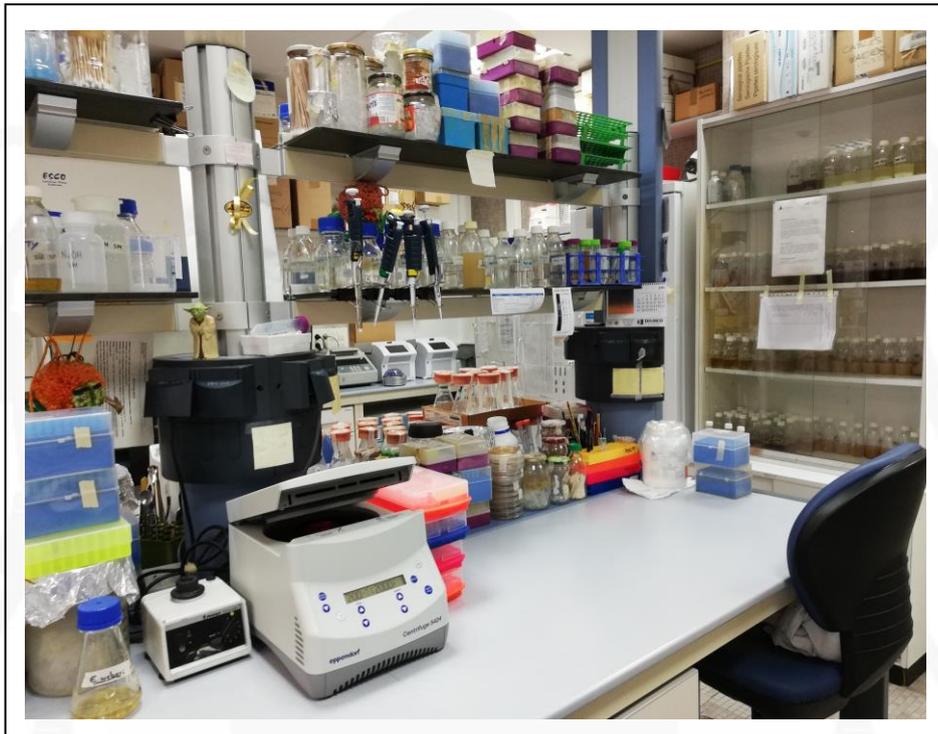


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Análisis de la expresión de un agrupamiento de genes de biosíntesis en *Rhodococcus spp.* y ensayos preliminares para la determinación del producto biosintético



Juan Alfonso Linares García

Área de Microbiología

Departamento de Biología Funcional

Julio de 2020



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



RESUMEN

Rhodococcus es un género bacteriano perteneciente al filo Actinobacteria, que se caracteriza por presentar en su genoma un gran número de agrupaciones génicas para la biosíntesis de productos naturales (antibióticos, antitumorales, etc). El objetivo de este TFG es determinar las condiciones de cultivo que activan los promotores que controlan la expresión de dos agrupamientos génicos (NRPS-2 y NRPS-20), que posiblemente son responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios de naturaleza peptídica en *Rhodococcus jostii* RHA1. Para ello, se ha procedido al análisis bioinformático del genoma de *R. jostii* RHA1 mediante el programa *antiSMASH*, con el fin de identificar sus diferentes clústeres de biosíntesis y los posibles tipos de metabolitos derivados. Se han amplificado por PCR las regiones promotoras de tres genes (dos del agrupamiento 2 y uno del 20) del genoma de *R. jostii* RHA1, y se han clonado en el vector pOJ260indC, que porta el gen (sin promotor) de la indigoidina, un pigmento azul. La baja similitud de los clústeres seleccionados con otros previamente descritos en la base de datos de *MiBIG* sugiere la posibilidad de encontrar nuevos compuestos, quizás con bioactividades interesantes. Se planifica y describe la continuación con el plan de trabajo, paralizado por la pandemia de la COVID-19, evaluando la activación de los promotores mediante la expresión del gen de la indigoidina. Mediante HPLC de extractos de la cepa silvestre y mutantes para el clúster de biosíntesis, se persigue detectar picos de cromatografía, asociados a compuestos novedosos, por desreplicación. En el caso de obtener resultados prometedores, se aislaría el metabolito mediante HPLC preparativa, se determinaría su masa molecular por HPLC-MS y se elucidaría su estructura por RMN. Finalmente, realizando bioensayos, se caracterizaría su posible actividad biológica.

ABSTRACT

Rhodococcus is a bacterial genus belonging to the *Actinobacteria* phylum, which is known to have in its genome a large number of gene groups for the biosynthesis of natural products (antibiotics, anti-tumors, etc). The objective of this GFR is to determine the culture conditions that activate the promoters that control the expression of two gene groups (NRPS-2 and NRPS-20), which are possibly responsible for the biosynthesis of secondary metabolites of a peptide nature in *Rhodococcus jostii* RHA1. For this, the bioinformatic analysis of the *R. jostii* RHA1 genome was made using the *antiSMASH* program, in order to predict its different biosynthesis clusters and the possible types of derived metabolites. The promoter regions of three genes (two from cluster 2 and one from 20) of the *R. jostii* RHA1 genome have been amplified by PCR and cloned into the vector pOJ260indC, which carries the gene (without promoter) of the indigoidin, a blue pigment. The low similarity of the selected clusters with others previously described in the *MiBIG* database suggests the possibility of finding new compounds, perhaps with interesting bioactivities. It is described the steps to follow with the work plan, paralyzed by the COVID-19 pandemic, evaluating the activation of promoters through the expression of the indigoidin gene. By means of HPLC of extracts of the wild type and mutants strains for the biosynthesis cluster, it is sought to detect chromatographic peaks, associated with novel compounds, by dereplication. In case of promising results, the metabolite would be isolated by preparative HPLC, its molecular mass would be determined by HPLC-MS and its structure would be elucidated by NMR. Finally, by performing bioassays, its possible biological activity would be characterized.

Índice

1	Introducción	3
1.1	Antibióticos y Resistencias	3
1.2	Actinobacterias	4
1.3	El género <i>Rhodococcus</i>	6
1.4	Metabolismo secundario	7
1.5	Minería genómica	10
1.6	Objetivos	11
2	Metodología empleada	11
2.1	Cepas, medios y métodos de cultivo.....	11
2.2	Análisis bioinformático.....	12
2.3	Extracción de ADN genómico de <i>Rhodococcus jostii</i> <i>RHA1</i>	12
2.4	Amplificación de los fragmentos de interés	12
2.5	Electroforesis en gel de agarosa	14
2.6	Purificación de los productos de PCR a partir de bandas de gel	14
2.7	Vector plasmídico y construcción	14
2.8	Digestión con enzimas de restricción	15
2.9	Purificación de las digestiones	15
2.10	Ligación	15
2.11	Transformación	15
2.12	Extracción del DNA plasmídico “Mini-prep.”	16
3	Resultados.....	16
4	Discusión y conclusiones	19
5	Bibliografía.....	23

Anexos

1 Introducción

1.1 Antibióticos y Resistencias

Desde el descubrimiento en 1928 de la penicilina por Alexander Fleming, los antibióticos han constituido una de las mayores revoluciones de la medicina moderna. A partir de este hito, se han descrito diversas familias de antibióticos durante todo el siglo XX, por ejemplo, las sulfonamidas, que fueron descubiertas en el año 1937, o la estreptomicina, que fue introducida en 1944 para el tratamiento de la tuberculosis (Davies et al., 2010). Sin embargo, la revolución en el descubrimiento de antibióticos tuvo lugar a mediados del siglo pasado, en lo que se conoce por el término de *edad de oro del descubrimiento de antibióticos* (Hutchings et al., 2019). En el periodo de los años 1945 a 1978, se caracterizaron la inmensa mayoría de estos compuestos bioactivos (glucopéptidos, macrólidos, cicloserinas, tuberocinomicinas, polimixinas, cefalosporinas), muchos de los cuales se siguen empleando en la actualidad. Además, el 55% de estos fármacos fueron aislados y obtenidos de microorganismos del género *Streptomyces* (Embley et al., 1994). Estos hallazgos permitieron tratar muchas enfermedades que eran mortales y altamente peligrosas, como la sífilis, la tuberculosis y la lepra, provocando un descenso en la mortalidad causada por enfermedades infecciosas en los países con acceso a antibióticos (Parida et al., 2015).

No obstante, paralelamente al descubrimiento y la aplicación de los antibióticos, aparecen cepas de patógenos resistentes a los mismos. En un ambiente natural, sin presión selectiva, la adquisición de resistencias, ya fuese por mutación o transferencia horizontal, no supondría beneficio para el patógeno. A pesar de que tendría, en algunos casos y siempre y cuando se transfiriese el clúster completo, la capacidad de producir un compuesto bioactivo, el coste energético que supondría para la célula provocaría que no fuese competitiva frente a otras cepas no resistentes del patógeno, que, al no generar el compuesto, dedican su metabolismo exclusivamente a la proliferación. Sin embargo, se ha constatado un aumento progresivo de los eventos de infección por cepas resistentes con el avance del siglo XX (**Figura 1**). Este fenómeno se ha debido al empleo excesivo de estos fármacos, catalizado por prescripciones médicas inadecuadas o por su desmedido uso en la ganadería; por ejemplo, la monensina, además de ser un antibiótico, se ha empleado masivamente por su capacidad de engorde de rumiantes (Vendramini et. al., 2018).

Algunas bacterias han conseguido incluso desarrollar resistencias frente a todos los antibióticos disponibles en el mercado. Se trata de las bacterias multirresistentes, también conocidas como superbacterias, causantes del incremento de mortalidad por enfermedades infecciosas en los últimos años en los países más desarrollados económicamente. Además de presentar una mayor virulencia y transmisibilidad, en muchos casos asociada a infecciones de carácter nosocomial, preocupa la aparición de superbacterias resistentes a los antibióticos de último recurso (Kern, 2018). Esto es

evidente en el grupo de antibióticos denominados β -lactámicos (como las penicilinas), para los que se ha observado un aumento de la producción de β -lactamasas, hidrolasas capaces de inactivar penicilinas por desorganización del anillo penicilánico, lo que se ha relacionado con la resistencia y la transmisibilidad de cepas de patógenos (Davies et al., 2010).

Por todo lo anterior, es necesario más que nunca la investigación para caracterizar nuevas cepas productoras de compuestos bioactivos novedales que permitan, con un uso racional de los mismos, combatir las infecciones por bacterias multirresistentes.

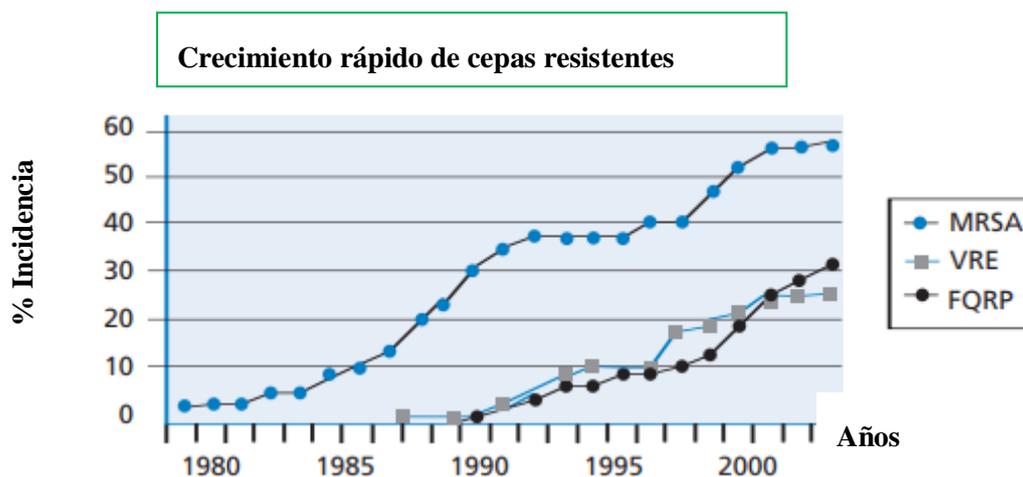


Figura 1. Este gráfico muestra el aumento en las tasas de resistencia para tres bacterias: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina (VRE) y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a fluoroquinolona (FQRP). Adaptado de The Infectious Diseases Society of America, 2004.

Otras bacterias multirresistentes nosocomiales son *Pseudomonas aeruginosa* que se ha convertido en una amenaza para los pacientes con fibrosis quística (Horrevorts et al., 1990), *Staphylococcus aureus*, que causa infecciones oportunistas o del anaerobio *Clostridium difficile* que es productor de toxinas y causante de infecciones intestinales (Kelly y LaMont, 2008).

1.2 Actinobacterias

El filo *Actinobacteria*, conocido como actinomicetos, está compuesto por bacterias Gram-positivas, cuya principal característica es su alto contenido genómico en citosina y guanina (más del 55%) (Doroghazi y Metcalf, 2013). Este filo bacteriano es un grupo muy diverso y presenta importancia en términos ecológicos, clínicos e industriales. Ha sido estudiado tanto por enfermedades que puede causar en nuestro organismo (como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los agentes infecciosos más mortales en el mundo), como por los antibióticos y productos farmacéuticos que nos pueden ofrecer de forma natural. El ejemplo arquetípico de ello es el género *Streptomyces*, uno de los principales productores de metabolitos bioactivos, o el género *Corynebacterium*, al que

pertenecen tanto bacterias patógenas como algunas de las mayores productoras de *L*-aminoácidos (Anteneh et. al., 2019).

Los actinomicetos se aíslan comúnmente en el suelo y en hospedadores animales, no obstante, también se han aislado en medios marinos. Respecto a la diversidad genómica de los actinomicetos, se ha constatado que los patógenos que sobreviven en nichos concretos tienden a la reducción de su genoma, mientras que las bacterias que habitan en el suelo (*Streptomyces*, *Rhodococcus*), presentan un genoma mayor, que le permite la aclimatación y la respuesta a condiciones más cambiantes (Barka et al., 2015).

Los actinomicetos, a lo largo de la historia, han sido uno de los filos pioneros para el aislamiento y caracterización de productos naturales, también denominados metabolitos secundarios (Jakubiec-Krzesniak et al., 2018). Estos compuestos tienen una utilización muy extensa en la industria, desde antifúngicos, antimicrobianos, antiparasitarios, antineoplásicos, hasta promotores del crecimiento de las plantas o herbicidas. Ejemplos de moléculas bioactivas producidas por géneros de actinobacterias y sus actividades se encuentran en la **Tabla S1** (ver Anexo).

Los antibióticos producidos por las actinobacterias son muy diversos. Actinomicina, estreptomycinina y estreptotricina fueron los primeros en ser descubiertos, ya que estas moléculas se producen con mayor frecuencia respecto a otros antibióticos (Barka et al., 2015). Otros compuestos son los macrotetrólidos producidos por *Streptomyces spp.* que son efectivos contra los ácaros, helmintos e insectos, o la ivermectina producida por *Streptomyces avermitilis*, uno de los primeros fármacos para el tratamiento y prevención de las parasitosis externas e internas en perros, gatos y caballos (Omura y Crump, 2014).

Algunos antifúngicos y bactericidas también son originados a partir del filo *Actinobacteria*, como la kasugamicina secretada por *Streptomyces kasugaensis*, que actúa como un inhibidor en la biosíntesis de proteínas en microorganismos, por lo que ha sido comúnmente utilizado en las plantaciones de arroz para controlar las infecciones causadas por *Pseudomonas* (Umezawa et al., 1965). Las polioxinas B y D aisladas de *Streptomyces cacaoi* se utilizan principalmente para controlar patógenos fúngicos en vegetales, interfiriendo con la pared celular de los hongos e inhibiendo la quitina sintasa (Endo y Misato, 1969).

La variedad de compuestos bioactivos naturales que han sido generados por actinomicetos es notoria, y se espera el descubrimiento futuro de nuevos compuestos por medio de la activación de rutas de biosíntesis que permanecen silenciosas o crípticas, esto es, aquellos que en condiciones de cultivo en laboratorio, su producción se encuentra reprimida por la bacteria productora.

1.3 El género *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus* se encuentra catalogado taxonómicamente dentro del filo *Actinobacteria* o actinomicetos. Se trata de bacterias Gram-positivas, aeróbicas, catalasa positivas, resistentes a ácidos débiles y de carácter inmóvil. Una de sus principales características es la utilización de diferentes fuentes de carbono y la acumulación de triacilglicéridos (TAG), cuando es escasa la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo (Ceniceros et al., 2017). Presentan un ciclo de vida complejo, y pueden presentar hifas aéreas dispersas, ramificadas o filamentosas, que se unen y se proyectan verticalmente (Barka et al., 2015).

Los microorganismos del género *Rhodococcus* contienen ácidos micólicos en su pared celular y disponen de una alta capacidad para degradar compuestos orgánicos, lo que explica por qué ha sido posible aislarlos en ambientes químicos muy contaminados. También pueden encontrarse en forma saprófita de vida libre, como patógenos de animales (un ejemplo de ello es *Rhodococcus equi*) y patógenos de plantas, como es el caso de *Rhodococcus fascians*. Aunque es un género bacteriano conocido clásicamente por pervivir en ambientes contaminados, su aprovechamiento como fuente de compuestos bioactivos es mucho más actual, conforme se iban secuenciando diferentes partes de su genoma y se comprobaba la presencia de posibles clústeres de biosíntesis de metabolitos secundarios (Elsayed et al., 2017).

Los primeros compuestos antimicrobianos aislados de *Rhodococcus*, fueron cinco tetrapéptidos cíclicos, presentando una actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformis*. Estos compuestos se denominaron rodopeptina C1, C2, C3, C4 y B5, aislados de *Rhodococcus sp.* Mer-N1033, en una muestra del suelo tomada en el monte Hayachine, en Japón (Chiba et al. 1999).

En 2007, Iwatsuki y colaboradores, descubrieron dos péptidos antimicrobianos, a los que denominaron lariatinas A y B, producidas por *Rhodococcus jostii* K01-B0171 que se aislaron de una muestra de suelo en Yunnan, China. Ambas lariatinas presentaban propiedades antimicobacterianas contra *Mycobacterium smegmatis*, y, además, la lariatina A era capaz de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Iwatsuki et al., 2007).

En 2008, Kitagawa y Tamura, investigaron en cepas de *Rhodococcus* e identificaron tres clases de antibióticos, que clasificaron según su espectro de acción: el grupo I presentó actividad antibiótica contra un gran espectro de Gram-positivas; el grupo II, principalmente, contra el propio género *Rhodococcus* y algunos otros Gram-positivos; y el grupo III, particularmente contra *R. erythropolis* (Kitagawa y Tamura, 2008).

También se aisló la aurachina en *R. erythropolis* JCM 6824, que tiene capacidad para inhibir el crecimiento de un rango amplio de microorganismos Gram-positivos, y otras cuatro aurachinas:

aurachina Q (1), aurachina D (2), aurachina R (3) y aurachina C (4), activas también frente a Gram-positivas (Nachtigall et al., 2010).

En 2008, Kurosawa et al. aislaron dos nuevos compuestos, rhodostreptomycina A y B (biológicamente más activa), en *Rhodococcus fascians* 307CO, después de una transferencia horizontal de genes desde *Streptomyces*. Las rhodostreptomycinas eran activas frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Kurosawa et al., 2008).

A nivel industrial, el género *Rhodococcus* es capaz de producir ácidos grasos Omega-3 (*R. opacus* PD630), debido a su capacidad de acumular hasta el 87% de su peso seco celular como ácidos grasos (Blakie, 2015). También es capaz de generar pigmentos carotenoides con actividad antioxidante, sideróforos con capacidad quelante del hierro, como la rhodobactina o la rodoquelina (aislado en *R. jostii* RHA1), acrilamida y ácido acrílico (McLeod et al., 2006).

Asimismo, por su presencia en ambientes contaminados, son capaces de degradar una variedad de compuestos xenobióticos y orgánicos, por lo que se pueden emplear para la producción de biofloculantes, biosurfactantes y en técnicas de biorremediación (Finnerty, 1992).

1.4 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios, también conocidos como metabolitos especializados, son moléculas que no resultan esenciales para la reproducción ni el crecimiento del organismo que las produce, pero que les ofrece una ventaja de supervivencia (Davies, 2013).

Los metabolitos secundarios se clasifican según su origen biosintético (O'Connor, 2015):

- Los metabolitos peptídicos se biosintetizan a través de ribosomas (RiPPs del inglés *ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*) o sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés *non-ribosomal peptide synthetase*).
- Los policétidos son polímeros que se sintetizan por medio de las policétido sintasas (PKS, *Polyketide Synthase*, por sus siglas en inglés), a partir de la condensación tipo Claisen de precursores de acetyl-CoA.
- Los terpenos derivan de precursores de cinco átomos de carbono (dimetilalilpirofosfato [DMAPP] e isopentilpirofosfato [IPP]), y se clasifican en función de las unidades de isopreno de las que constan.
- Los alcaloides abarcan un amplio espectro de metabolitos caracterizados por la presencia de un átomo de nitrógeno.
- Algunos carbohidratos y sacáridos se encuentran enlazados al esqueleto carbonado de otros metabolitos secundarios, aportando distinta funcionalidad.

En el complejo genoma de *Rhodococcus* (y otros actinomicetos), los genes encargados de la biosíntesis de compuestos bioactivos no están dispersos, sino que suelen encontrarse próximos, formando agrupamientos o clústeres génicos. Los dos tipos más frecuentes de clústeres son aquellos que incluyen a policétido sintasas (PKS) y/o sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Wang et al., 2014).

Las NRPS son enzimas multimodulares que se encargan de sintetizar péptidos bioactivos de estructuras químicas variadas. El dominio de activación (A) selecciona el aminoácido (activación por adenilación); por su parte, la proteína transportadora de péptidos (PCP) une dicho aminoácido y la conduce al dominio de condensación (C), que forma enlaces peptídicos entre el aminoácido y el esqueleto peptídico presente en el siguiente módulo. Existe un dominio final tioesterasa (TE) que libera el péptido definitivo por hidrólisis. Además, pueden existir otros dominios complementarios que catalizan reacciones de epimerización, oxidación, reducción, metilación, formilación o halogenación. Las NRPS se pueden clasificar en tres categorías en función de la estrategia de síntesis: Tipo A (lineal), Tipo B (iterativo), Tipo C (no lineal) (**Figura 2**) (Hur et al., 2012). En este trabajo, las NRPS serán objeto de estudio.

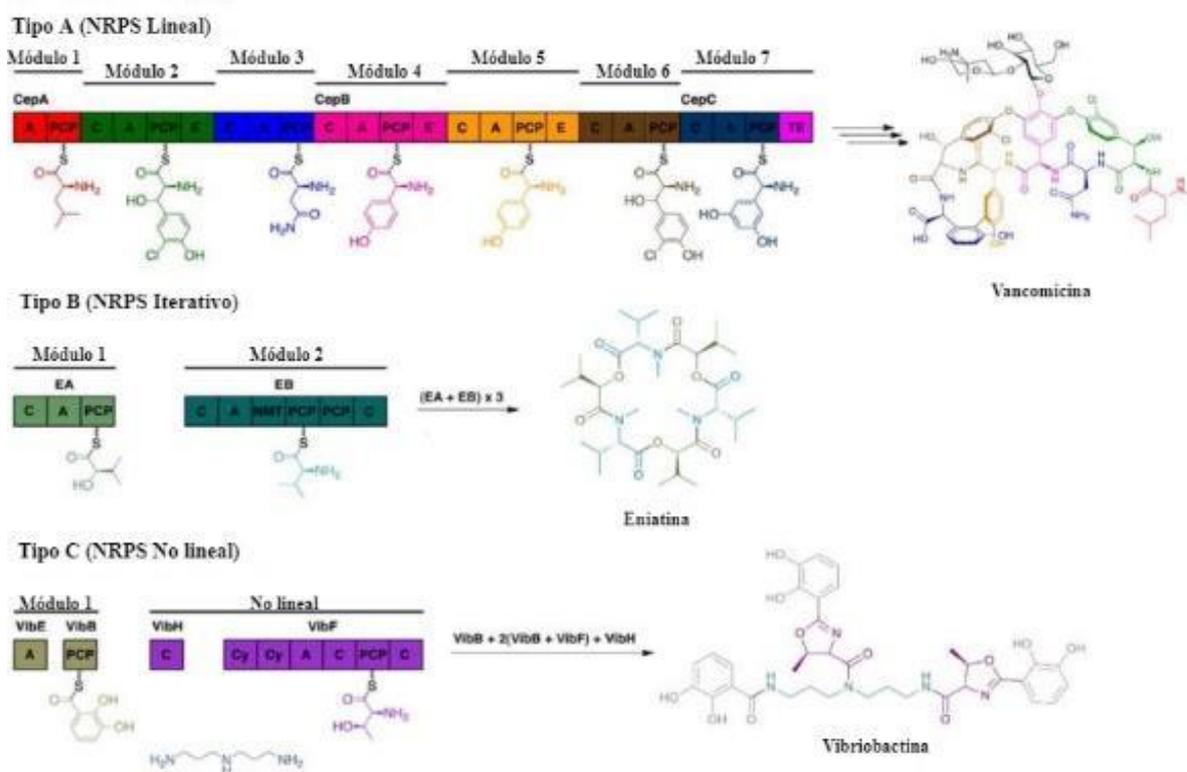
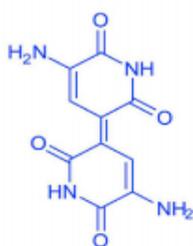


Figura 2. Tipos de NRPS en función de su estrategia de síntesis, NRPS lineal (Tipo A), NRPS iterativo (Tipo B), NRPS no lineal (Tipo C). Principales dominios activación (A), proteína transportadora de péptidos (PCP), condensación (C), tioesterasa (TE) (Hur et al., 2012).

Algunos ejemplos de péptidos bioactivos derivados de NRPS son: vancomicina, bacitracina, fengicina, vibriobactina, daptomicina, ciclosporina A, siringomicina E, balhimicina, ... Además, las NRPS pueden generar otros tipos de péptidos que actúan como sideróforos y pigmentos, como es el caso de la indigoidina, sintetizada por una NRPS que reconoce selectivamente a L-glutamina como sustrato iniciador (Kong et al. 2019). Se trata de un pigmento azul producido por *Corynebacterium insidiosum*, *Pseudomonas indigofera*, *Arthrobacter atrocyaneus*, *Arthrobacter polychromogenes* y *Vogesella indigofera*. (**Figura 3**) (Kong et al., 2019). Fue encontrado por primera vez en *Pseudomonas indigofera* en 1939 (Starr et al., 1966). Olano y colaboradores expresaron el clúster NRPS de carácter silencioso/crítico responsable de la producción de la indigoidina (Olano et al., 2014), a través de la inserción de un promotor fuerte y constitutivo, en *Streptomyces albus* J1074. Su posterior uso en biología sintética como gen informador ha permitido evaluar la capacidad de activación de los promotores bajo diferentes condiciones experimentales.



Indigoidina

Figura 3. Estructura química del pigmento azul indigoidina (Kong et al., 2019).

Las PKS son enzimas multimodulares que catalizan la condensación Claisen de precursores de acetil-CoA, para formar policétidos de estructuras variadas y complejas. Se cree que derivan de las sintasas de ácidos grasos por la homología de ciertas enzimas y por qué usan los mismos sustratos de partida (McDaniel, 2005). Cada módulo presenta tres dominios básicos, cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT) y proteína transportadora de acilos (ACP), con un dominio adicional tioesterasa (TE), en el último módulo de elongación, similar al caso de las NRPS. Nuevamente, pueden existir dominios auxiliares, como cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa (ER) (Schwarzer y Marahiel, 2001). Se han descrito varias clases de PKS: Tipo I (multimodulares y no iterativas, como la que sintetizan eritromicina), Tipo I iterativas (sintetizan policétidos aromáticos), Tipo II (un solo módulo, generan policétidos aromáticos), Tipo III o chalcon sintasas (homodiméricas e iterativas). Finalmente, señalar que existen clústeres híbridos NRPS-PKS, que generan moléculas híbridas, como tiazoles.

1.5 Minería genómica

La aparición de bacterias multirresistentes y la falta de nuevos descubrimientos ha generado en los últimos años una necesidad acuciante de nuevos compuestos bioactivos. Los métodos clásicos de búsqueda (identificación de genes de resistencia, clonaje mutacional, expresión de agrupaciones génicas, detección de actividades enzimáticas, aproximaciones basadas en homología) se han mostrado lentos o complejos para esta tarea, por lo que han tenido que ser complementados mediante técnicas bioinformáticas que estudian el genoma a nivel global (Cano-Prieto et al., 2015).

La minería genómica es una técnica que predice e identifica clústeres biosintéticos a partir de la secuenciación del genoma del organismo de interés. Esto permite partir del genoma completo y buscar similitudes con bases de datos previas que contienen clústeres de biosíntesis de otros compuestos bioactivos (Olano et al., 2014).

En los inicios, se procedía a la identificación de enzimas biosintéticos utilizando algoritmos de alineamiento local, como *nBLAST*, *pBLAST* o *PSI-BLAST*. Mediante la utilización de *MultiGeneBlast*, fue posible la identificación de homólogos de módulos multigénicos típicos de operones y agrupamientos de genes. Su algoritmo es la base del software *antiSMASH*. Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación genómica automatizada, la minería genómica toma protagonismo, al implementarse diversos algoritmos de alineamiento para el análisis de genomas completos de cepas específicas o, incluso, de múltiples cepas de la misma especie (minería pangenómica). Asimismo, el software de minería genómica emplea bases de datos que resultan capaces de vincular los metabolitos bioactivos a los clústeres sintéticos. Los investigadores depositan sus resultados en estas bases de datos, lo que permite desarrollar herramientas de análisis comparativo e integral, así como ampliar la diversidad del conocimiento que ha sido adquirido (Weber y Kim, 2016).

Algunos ejemplos de software bioinformático son: (a) *ClusterMine360*, que proporciona información de 290 grupos de genes responsables de más de 200 clústeres de biosíntesis (NRPS / PKS); (b) *Integrated Microbial Genomes-Atlas of Biosynthetic gene Clusters* (IMG-ABC), que permite localizar grupos de genes de metabolitos en el genoma; (c) *antiSMASH*, el software más utilizado en minería genómica de bacterias y hongos (Blin et al., 2019), puede detectar rápidamente todas las clases conocidas de grupos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios, proporcionar anotaciones funcionales NRPS / PKS detalladas y predecir la estructura química de los productos NRPS / PKS con mayor precisión que los métodos existentes (Medema et al., 2011). Otras herramientas son *MIBiG*, *NP. Searcher*, *ClustScan*, *NRSPredictor*, *ClusterFinder* y *Prediction Informatics for Secondary Metabolomes* (PRISM), que permiten la identificación de grupos de genes como NRPS, PKS o NRPS-PKS (Salwan y Sharma, 2020).

1.6 Objetivos

Los objetivos de este Trabajo Fin de Grado son:

- a) Análisis bioinformático mediante el software *antiSMASH* de clústeres de biosíntesis de metabolitos secundarios en el genoma de la cepa *Rhodococcus jostii* RHA1. Selección de posibles clústeres de biosíntesis de compuestos bioactivos desconocidos.
- b) Clonaje de los promotores de los clústeres NRPS-2 y NRPS-20 de *Rhodococcus jostii* RHA1.
- c) Evaluación de las condiciones de cultivo que favorecen la activación de los promotores de los clústeres NRPS-2 y NRPS-20, mediante la expresión del gen informador de la indigoidina.
- d) Aislamiento e identificación de posibles compuestos bioactivos novedosos de carácter peptídico derivados de la expresión de dichos clústeres.

2 Metodología empleada

2.1 Cepas, medios y métodos de cultivo

Rhodococcus jostii RHA1 es la cepa de partida utilizada en el trabajo (**Tabla 1**). Presenta uno de los genomas bacterianos más grandes que han sido secuenciados (9.702.737 pb), dispuesto en un cromosoma lineal y tres plásmidos lineales (pRHL1, pRHL2 y pRHL3) (McLeod et al., 2006).

Para la generación de masa celular para extracción de ADN genómico, *Rhodococcus jostii* RHA1 se creció en TSB sólido 4 días. La cepa de *Escherichia coli* DH5 α se utilizó como intermediaria en procesos de clonación. El medio 2TY fue utilizado tanto para cultivos sólidos como para cultivos líquidos, para cepas de *E. coli*. La composición de los medios de cultivo empleados se puede consultar en **Tabla S2** (ver Anexo).

Tabla 1. Cepas empleadas.

Nombre de la cepa	Descripción	Referencia
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Cepa silvestre	NCBI: txid101510
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Cepa de clonaje	NCBI, PRJNA205928
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 pOJ260indC	Cepa con el vector pOJ260indC, sin construir.	Este trabajo

2.2 Análisis bioinformático

El software *antiSMASH* se ha empleado para la identificación de clústeres de biosíntesis en el genoma de *Rhodococcus jostii* RHA1. Este software, aporta información sobre la estructura multimodular de los clústeres, los dominios que presentan, y la similitud con otros agrupamientos génicos presentes en la base de datos *MiBig* (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*).

Por su parte, el software *Clone Manager* se empleó para el diseño de cebadores específicos que amplifiquen las regiones promotoras de los genes de interés y para el cálculo de la longitud de los fragmentos de restricción derivados de la digestión con enzimas. En consecuencia, el diseño de cebadores que amplifican la región promotora de los clústeres hace posible la recombinación entre el genoma de *Rhodococcus* y el vector plasmídico (que se inserta en el genoma) (**Tabla S3**, ver anexo). Al añadir el sitio de corte de las enzimas BamHI o NotI al cebador directo y HindIII al reverso, se consigue que la amplificación por PCR genere un fragmento capaz de preservar la orientación con la que se debe introducir en el vector para la correcta expresión del gen testigo. Esto permite que la inserción en el genoma de *Rhodococcus* ocurra en el sentido correcto.

2.3 Extracción de ADN genómico de *Rhodococcus jostii* RHA1.

El ADN genómico de *R. jostii* RHA1 se extrajo siguiendo una modificación del protocolo descrito por De Almeida y colaboradores (2013). Se procede a recoger con un asa las células de una placa con el cultivo de la cepa crecida en TSA durante 3-4 días. Posteriormente se resuspenden en 400µl del reactivo TE y se incuban a 80°C durante 20 minutos para matar a la bacteria. Las células se dejan enfriar a temperatura ambiente, se añaden 10µl de lisozima (100mg/ml) junto con la RNAsa, mezclándolo en un vórtex y se deja toda la noche a 37°C. Tras este tiempo se añaden 100µl de SDS al 10% conteniendo 5µl de proteinasa K, se mezcla en el vórtex y se incuba 10 minutos a 65°C. Después se añaden 750µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) 50% y fenol 50%, bajo una campana extractora de gases, se mezcla con vórtex y se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga. La solución acuosa se toma con la pipeta y se transfiere a un eppendorf donde el DNA se precipita con 0,6 volúmenes de isopropanol y se deja precipitando 30 minutos a 20°C. Finalmente, el DNA se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga a 4°C, se lava con etanol al 70%, se centrifuga 5 minutos en una microcentrífuga y se seca al aire el precipitado que posteriormente se resuspende en 100 µl de TE.

2.4 Amplificación de los fragmentos de interés

Para obtener las regiones promotoras de los tres genes de estudio (2 del NRPS-2 y 1 del NRPS-20), se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), una técnica de biología molecular

desarrollada en 1986 por Kary Mullis (Mullis et al., 1986), usando la enzima de alta fidelidad Herculase II (Agilent) y siguiendo el protocolo para fragmentos de 1 a 10 Kb, con un volumen final de 50 μ l (**Tabla 2**). Como las regiones promotoras no están siempre perfectamente definidas, se amplifica una región 2 kb anterior al codón de inicio de la traducción.

Tabla 2. Componentes y cantidades para amplificar por PCR fragmentos de ADN de 1-10 Kb.

Componente	Cantidad por reacción
Agua mili-Q	34 μ l
5x Buffer de reacción de la Herculase II	10 μ l
Mezcla de dNTP (25 Mm cada dNTP)	0,5 μ l
ADN de <i>Rhodococcus jostii</i>	0,5 μ l
DMSO	1,5 μ l
ADN polimerasa de la Herculase II	1 μ l
Cebador directo (10 μ M)	1,25 μ l
Cebador reverso (10 μ M)	1,25 μ l
Volúmen total	50 μ l

Después de ello se selecciona el programa de amplificación siguiente en el termociclador (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características del programa de amplificación por PCR para el termociclador.

Fase	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1. Desnaturalización	1	95	2 min
2.1 Desnaturalización	30	95	20 s
2.2 Anillamiento		69-78	20 s
2.3 Extensión		72	20 s
3. Extensión final	1	72	3 min
4. Enfriamiento	1	4	15 s

2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8 % con 2 μ l de RedSafe (INtRON Biotechnology). Se cargaron 25 μ l de cada PCR y se corrió 45 minutos a 90 mV. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se cortaron.

2.6 Purificación de los productos de PCR a partir de bandas de gel

Se utilizó el Kit GenJet Gel extraction (Thermo Scientific) de purificación en columna, para purificar el ADN de las bandas de agarosa. Se añade un volumen de 500 μ l de Binding Buffer a cada banda cortada, y se funde la agarosa a 60°C durante 10 minutos. Se transfiere la solución del gel a la columna de purificación del GeneJET Kit, se centrifuga durante 1 minuto a 13.850 rpm, y se descarta el eluido. Se añaden 700 μ l del tampón de lavado, se centrifuga durante 1 minuto, y se vuelve a descartar lo eluido. Nuevamente, se vuelve a centrifugar durante 1 minuto para remover los residuos de etanol del tampón de lavado, y se transfiere esa columna de purificación a un nuevo eppendorf. Se añaden 50 μ l de agua destilada justo en el centro de la columna de purificación y se centrifuga durante 1 minuto. Finalmente se elimina la columna de purificación del GeneJET.

2.7 Vector plasmídico y construcción

El vector escogido es el plásmido pOJ260indC, el cual contiene el gen responsable de la producción de la indigoidina (informador), sin promotor, y el gen de resistencia a la apramicina (selección) (Figura 4). Al no presentar origen de replicación en *Rhodococcus*, si el vector no se inserta en el genoma de la cepa por recombinación, se pierde.

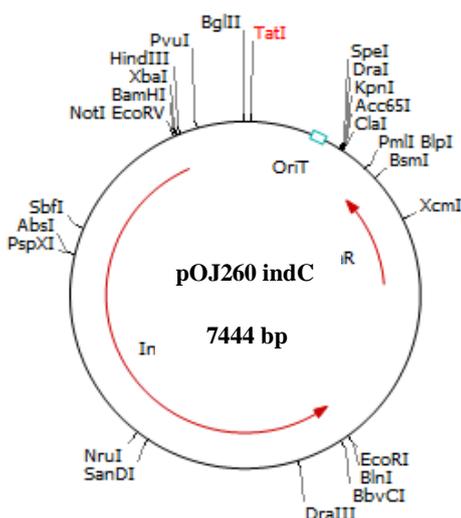


Figura 4. Mapa del plásmido pOJ260indC.

2.8 Digestión con enzimas de restricción

20.5 µl de cada producto de PCR purificado se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (para los promotores de los genes NRPS 2.2 y NRPS 20) o NotI y Hind III (para el promotor del gen NRPS 2.1) (Thermo scientific Fast Digest).

El vector pOJ260 (Bierman et al., 1992) conteniendo el gen que codifica la enzima de síntesis de la indigoidina (IndC) sin promotor, pOJ260IndC (Fernández de la Hoz, 2018) se digirió usando las enzimas correspondientes a cada producto de PCR. Se utilizó 1 µl de cada enzima y 2.5 µl del tampón de digestión 10x proporcionado con las enzimas. Se incubaron las mezclas 37°C durante 30 minutos.

2.9 Purificación de las digestiones

Posteriormente a la digestión enzimática, se procede a la purificación mediante el GenJet PCR purification kit (Thermo Scientific). Se añade cada inserto y su respectivo vector digerido con las mismas enzimas en columnas de purificación independientes y se centrifuga 1 minuto a 13.850 rpm. Se descarta el eluido. Se añaden 700 µl del Buffer de lavado a la columna de purificación y se centrifuga 1 minuto a 13.850 rpm volviendo a descartar el eluido. Nuevamente se centrifuga 1 minuto a 13.850 rpm, eliminando el eluido, se transfiere a un Eppendorf y se añade 20 µl de agua Mili-Q. Se centrifuga 1 minuto a 13.850 rpm y se retira la columna de purificación.

2.10 Ligación

La ligación se produce para que el producto de PCR (regiones promotoras) se inserte en el vector. Se prepara un volumen de 30 µl, entre los 20 µl del inserto y los 10 µl del vector, junto con 7,5 µl de buffer y 1 µl de la T4 DNA ligasa.

2.11 Transformación

El producto de la ligación se transformó mediante choque térmico en *Escherichia coli* DH5α. A cada ligación se le añadieron 200 µl de células competentes de *E. coli* DH5α previamente descongeladas en hielo.

Introducimos el Eppendorf con la mezcla de la ligación y las células competentes en hielo durante 30 segundos. Tras estos 30 minutos en el hielo la muestra se introduce 30 segundos en el baño previamente preparado a 42°C, y se vuelve a trasladar rápidamente al hielo. Finalmente, se añade 1 mL del medio 2TY, y se incuba durante 1 hora a 37°C en agitación. Después se plaqueó en 2TY sólido con apramicina (4 µl de 50 µg/ml). Tras 16-20 h, se seleccionaron 5 colonias y, se inocularon en 1 ml de 2TY con apramicina a (50 µg/ml) con agitación a 37°C toda la noche.

2.12 Extracción del DNA plasmídico “Mini-prep.”

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante lisis alcalina. Para ello se prepararon tres soluciones. 1 mL de cada cultivo de *E. coli* DH5 α transformadas se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de la solución I (Glucosa 1M, EDTA 0,5M y Tris-HCl 1M). Tras mezclarlos usando un vórtex se añaden 200 μ l de la solución II (NaOH 1M y SDS 10%), se mezcla bien y se deja reposar 2 minutos en hielo. Después se añaden 150 μ l de la solución III (Acetato de potasio 5M y ácido acético glacial) se mezcla y se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 rpm. Se traspara el sobrenadante a un Eppendorf limpio, y se vierte 400 μ l de isopropanol, dejándolo 20 minutos a una temperatura de -20°C. Después se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm y se descarta el sobrenadante, para continuar con la adición de 100 μ l de etanol al 70%, y se mezcla bien. Para finalizar se centrifuga de nuevo durante 1 minuto a 12.000 rpm, retira el sobrenadante y se deja secar el pellet en 50 μ l de agua mili-Q.

3 Resultados

Tras el análisis bioinformático del genoma de *R. jostii* RHA1 mediante el programa *antiSMASH*, se han identificado 22 posibles clústeres de síntesis de compuestos bioactivos, de los cuales un 73% son de tipo NRPS (**Tabla 4**). También se han definido dos agrupamientos génicos de PKS tipo I, dos de síntesis de terpenos, uno de ectoína y otro de butirolactona. Excluyendo los clústeres 6, 8 y 15, la mayoría de los agrupamientos presentan una similitud (homología) muy reducida con otros clústeres previamente descritos.

Al mismo tiempo, la baja probabilidad de que los clústeres identificados produzcan compuestos bioactivos previamente descritos es un punto de partida muy interesante para lograr un descubrimiento de metabolitos novedosos de interés farmacológico. En este trabajo, se ha procedido al clonaje de los promotores de dos genes del clúster 2 y uno del clúster 20, ambos de tipo NRPS, por lo que se espera que estén involucrados en la biosíntesis de compuestos peptídicos (**Tabla 4**). El clúster 2 presenta una similitud del 12% con la *Oxazolomicina B* (antibiótico), y el agrupamiento 20, una similaridad del 5% con la *Fluvirucina B2* (antiviral). Nuevamente, los escasos porcentajes hacen poco probable que sean los compuestos realmente sintetizados por las agrupaciones génicas seleccionadas para realizar este trabajo, e indican más bien la posibilidad de que los compuestos sintetizados por los clústeres sean nuevos y, por tanto, de interés.

Tabla 4. Análisis bioinformático mediante antiSMASH del genoma de *R. jostii* RHA1. Tipos de clústeres, NRPS (en verde fosforito), T1PKS (Policétido sintasas de tipo 1, en naranja), terpenos (en morado), butirolactonas (en gris), ectoína (en verde pálido), bacteriocina (en azul), localización genómica y similitud a otros compuestos bioactivos. Se muestra el grado de homología en similaridad con un código de colores: rojo similaridad menor al 50%, naranja mayor que 50% y menor que 100%, y en verde el 100%.

Clúster	Tipo	Desde	Hasta	Compuesto sintetizado	Similaridad
Clúster 1	NRPS	56.936	100.463		-
Clúster 2	NRPS	125.574	222.790	Oxazolomicina B	12%
Clúster 3	NRPS	257.753	326.796	Leinamicina	4%
Clúster 4	NRPS	475.075	534.362	Cloromixamida	6%
Clúster 5	Terpeno	1.171.506	1.192.242	Isorenierateno	42%
Clúster 6	Ectoína	1.374.291	1.384.689	Ectoína	75%
Clúster 7	NRPS	2.297.421	2.364.003	Divergolida A/B/C/D	6%
Clúster 8	NRPS	2.412.531	2.470.165	Rodoquelina	100%
Clúster 9	NRPS, bacteriocina	2.512.631	2.565.797	Coelimicina P1	8%
Clúster 10	NRPS	2.623.411	2.666.007		-
Clúster 11	T1PKS	4.251.125	4.294.619		-
Clúster 12	T1PKS	4.424.144	4.474.727	Tetrocarcina A	8%
Clúster 13	Similar a NRPS	4.596.666	4.639.049		-
Clúster 14	Butirolactona	4.860.276	4.871.223	Herboxidieno	5%
Clúster 15	NRPS	4.951.636	4.871.223	Eritroquelina	57%
Clúster 16	NRPS	5.374.962	5.459.651	Atratamicina	5%
Clúster 17	NRPS	5.761.830	5.898.295	Glicopéptido y lípido	5%
Clúster 18	NRPS	6.532.351	6.639.308	Fengicina	20%
Clúster 19	NRPS	6.756.402	6.814.647	Sch-47554/Sch-47555	3%
Clúster 20	NRPS	7.139.552	7.196.042	Fluvirucina B2	5%

Clúster 21	Similar a NRPS	7.511.273	7.553.894	Auroramicina	2%
Clúster 22	Terpeno	7.699.104	7.720.252	SF2575	6%

En la **Figura 5**, se muestran las regiones de los clústeres 2 y 20, junto con sus diferentes módulos y dominios. Nótese que el agrupamiento 2 está integrado por dos genes que codifican dos NRPS, con sus respectivos módulos y dominios.

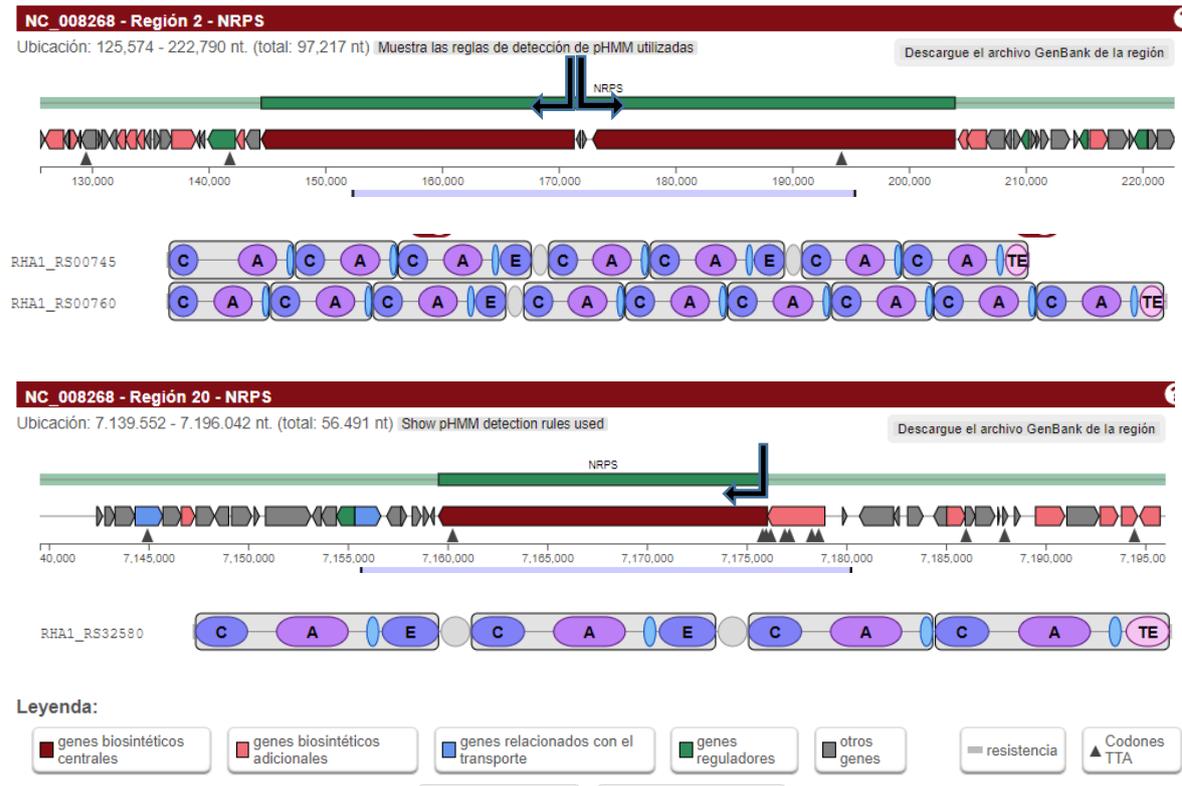


Figura 5. Estructura del clúster 2 (arriba) y el 20 (abajo) de *Rhodococcus jostii* RHA 1. Imágenes obtenidas del programa *antiSMASH*. C: Dominio de condensación, A: Dominio de activación, E: Dominio de Epimerización, TE: Dominio de tioesterasa, óvalo azul cian: proteína transportadora de péptidos (PCP). Con una flecha negra, se señalan los sitios concretos de los clústeres (regiones promotoras) donde se insertan los vectores portadores del gen de la indigoidina.

A continuación, se muestra el resultado de la amplificación por PCR de los tres promotores objeto de estudio. El tamaño observado de las bandas se ajusta a lo esperado, sobre 2Kb (**Figura 6**).

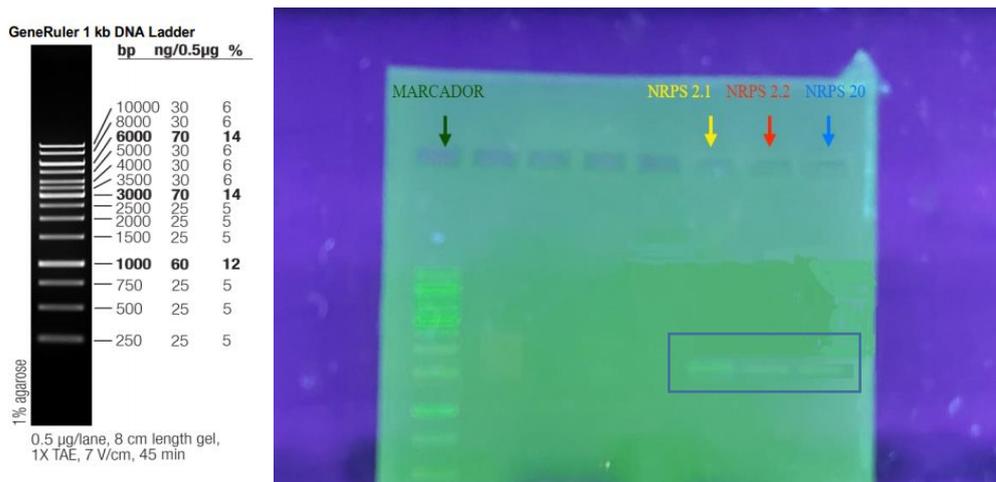


Figura 6. (A la derecha) Gel de electroforesis de las amplificaciones por PCR de los promotores de interés. Se muestran las calles donde se han cargado el promotor NRPS 2.1 (flecha amarilla), el promotor NRPS 2.2, (flecha roja), el promotor NRPS 20 (flecha azul) y el marcador de peso molecular (flecha verde). (A la izquierda) el marcador utilizado, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™).

4 Discusión y conclusiones

Con el desarrollo de las técnicas moleculares y bioinformáticas, como la secuenciación y los avances en minería genómica, ha sido posible el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de importancia clínica e industrial. Se ha constatado que existen decenas de clústeres de biosíntesis de compuestos bioactivos en el genoma de microorganismos del filo *Actinobacteria*, un número mayor que los metabolitos bioactivos obtenidos en condiciones de laboratorio. Este hecho se fundamenta en que la mayoría de esos agrupamientos crípticos (se desconoce el compuesto al que dan lugar) pueden estar silenciados bajo dichas condiciones experimentales, ya que se desconocen los factores ambientales que motivan su expresión. Este Trabajo Fin de Grado ha pretendido estudiar las condiciones de cultivo que favorecen la activación de los promotores de dos clústeres tipo NRPS del genoma de *R. jostii* RHA1, a partir de su clonación en plásmidos portadores del gen informador de la indigoidina. Desafortunadamente, la pandemia provocada por la **COVID-19** ha impedido la consecución de la metodología experimental propuesta, por lo que el plan de trabajo ha quedado incompleto. En vista de tan extraordinarias circunstancias, este apartado de discusión se centrará primordialmente en describir los experimentos que hubieran de seguir a los ya realizados en la sección de *Metodología empleada*, para la caracterización de los compuestos bioactivos derivados de dichos clústeres.

A partir de la purificación por “mini-prep” del vector plasmídico, es necesario comprobar que las construcciones obtenidas portan realmente el inserto que se quiere introducir en *R. jostii* RHA1.

Para ello, se recurre a la comprobación por digestión enzimática. Mediante el programa *Clone Manager*, se seleccionan aquellas enzimas de restricción que cortan el plásmido purificado tanto dentro del inserto como fuera del mismo, calculando los tamaños de los fragmentos esperados (**Tabla 5**). Con ello, se procede a la digestión del plásmido con diferentes enzimas de restricción, y se comprueba, mediante electroforesis en gel de agarosa, que los fragmentos generados presentan el tamaño predicho (siempre y cuando la inserción del fragmento de interés haya tenido lugar de forma adecuada).

Tabla 5. Comprobación enzimática mediante el *Clone Manager*, empleando enzimas conocidas y tamaños esperados.

Clúster	Enzima	Tamaño (Kb)
NRPS 2.1	EcoRV	8387
	Bam HI	1079
NRPS 2.2	NotI	8921
		514
NRPS 20	KpnI	7393
		2077

Otra forma clásica de comprobación de las construcciones es recurrir a la secuenciación del inserto del vector plasmídico. Mediante el empleo del programa *Clone Manager*, se pueden realizar alineamientos entre la secuencia teórica del inserto y el resultado de la secuenciación; si la homología es muy elevada (cercana al 100%), se puede concluir que el vector plasmídico porta el inserto de interés.

Cuando se ha asegurado que el vector plasmídico contiene el inserto de interés, se procede a su introducción en *Rhodococcus*. Existen diversos métodos para lograr una transformación del actinomiceto, pero los más habituales son la electroporación y la conjugación entre células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 y *R. jostii* RHA1. La electroporación consiste en aplicar un campo eléctrico, mediante pulsos de alto voltaje y duración instantánea, sobre un vial con células en suspensión de *R. jostii* RHA1. El choque eléctrico que se genera resulta suficiente para formar poros capaces de aumentar la permeabilidad de la pared y la membrana celular al paso del vector. Las bacterias

adecuadamente transformadas serán capaces de proliferar en un medio selectivo con apramicina, en detrimento de las no transformadas.

Por otra parte, el método de conjugación resulta más laborioso, aunque no es tan agresivo como la electroporación, que puede causar una alta mortalidad celular si no hay un ajuste óptimo de las condiciones del choque eléctrico. Primero, se transforman las células de *E. coli* **ET12567/pUZ8002** (el plásmido pUZ8002 confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y cloranfenicol) con la construcción verificada, ya sea por choque térmico o por electroporación. A continuación, se seleccionan en un medio con apramicina, kanamicina y cloranfenicol aquellos clones correctamente transformados con el plásmido, que serán resistentes a apramicina. Finalmente, se procede a realizar el protocolo de conjugación de *E. coli* **ET12567/pUZ8002** con *R. jostii* RHA1. Para ello, las células donadoras (*E. coli* **ET12567/pUZ8002**) se mezclan con las receptoras (*R. jostii* RHA1), siguiendo un ratio 2:1, y se distribuyen en una placa con medio 2TY para el crecimiento a 30°C durante la noche. A continuación, se cubren con 1 mL de agua Milli-Q con 0,5 mg de ácido nalidíxico y 1,25 mg de apramicina. Finalmente, se prosigue con la incubación a 30°C hasta la obtención de colonias (modificación del protocolo de Voeykova et al., 1998). Resulta vital conseguir una selección precisa de las células de *R. jostii* RHA1 que hayan conjugado sobre aquellas que no lo hayan hecho y sobre las bacterias *E. coli* **ET12567/pUZ8002**. Para ello, se emplea el medio selectivo con ácido nalidíxico (específico contra Gram-negativas como *E. coli*) y con apramicina (de modo que no proliferan las bacterias de *R. jostii* RHA1 que no hayan experimentado conjugación).

Aunque el proceso de selección haya sido exitoso, es imprescindible cerciorarse de que las cepas de *R. jostii* RHA1 presentan integrado el vector con el inserto en el sitio correcto del genoma. La recombinación es vital para asegurar una transformación estable de la cepa con el inserto. La comprobación se realiza mediante PCR utilizando cebadores específicos: uno de ellos hibrida con la región anterior al promotor (en el promotor es donde se produce la recombinación homóloga que permite la inserción del vector en el genoma), mientras que el otro cebador hibrida en la parte final del gen informador de la indigoidina. Como control negativo de la amplificación, se utiliza ADN de una cepa silvestre, en el que, al no haber el gen de la indigoidina, no debería haber amplificación alguna. Finalmente, se comprueban las bandas por electroforesis en gel de agarosa.

Si la comprobación confirma la correcta inserción del vector en el genoma, se procede a realizar ensayos de producción de indigoidina. Se pueden desarrollar tanto en medio líquido como en medio sólido. El objetivo es identificar en qué medios de cultivo se logra una mayor (o más temprana) producción de indigoidina, en tanto en cuanto a mayor producción de pigmento mayor expresión del clúster en el que está insertado en gen testigo. Paralelamente, se incluyen controles negativos (con la cepa silvestre) y positivos (que expresa constitutivamente el pigmento), lo que permite evaluar el grado de producción de indigoidina, de forma cualitativa o de manera cuantitativa. El análisis

cuantitativo exige la extracción de todo el pigmento producido por las células (tanto extracelular como intracelular) y la medida de su absorbancia a 615 nm, de la cual se obtiene la concentración de indigoidina a través de la correspondiente recta de calibrado (Chatterjee y Brown, 1981). Es frecuente esperar varios días a que el cultivo alcance la fase estacionaria (en la que se producen la mayoría de los compuestos bioactivos) para observar la producción del pigmento.

Si la expresión fuese favorable, se podría tener constancia de los medios que favorecen la activación del promotor. En caso contrario, habría que recurrir a otras estrategias para la activación de clústeres silenciosos. Una opción es emplear técnicas de ingeniería genética para expresar los genes de interés bajo el control promotores fuertes y constitutivos (Olano et al., 2014). Los genes SARP (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*) son una familia de activadores transcripcionales de la biosíntesis de antibióticos. Se han descrito estrategias de activación basadas en SARP, que involucran: (1) cepas de actinomicetos con genes SARP y motivos de unión a SARP en sus clústeres biosintéticos, (2) la introducción de vectores de expresión de genes SARP, (3) análisis comparativos entre cepas silvestres y recombinantes con genes SARP (Krause et al., 2020).

El siguiente paso consistiría en identificar los compuestos que podrían sintetizar los clústeres estudiados. Una técnica analítica fundamental es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que separa sustancias de la mezcla compleja de compuestos. Existen diferentes tipos de cromatografía, en función de la columna cromatográfica seleccionada, pero una de las más habituales es la cromatografía en fase reversa. Esta técnica analítica permite separar los compuestos químicos presentes en una muestra compleja en función de su afinidad por la columna cromatográfica, de carácter menos polar que la fase móvil. Los solutos que eluyen primero en el tiempo son aquellos más afines por la fase móvil (más polares), mientras que los últimos en eluir son aquellos que permanecen más retenidos en la fase estacionaria. Mediante un detector UV-visible, se detectan los picos de absorción asociados a cada uno de los compuestos que integran la mezcla completa.

La mutación de un gen del clúster permite inactivar su expresión. Así, comparando los cromatogramas obtenidos por HPLC de extractos de las cepas silvestres y mutantes en un medio de cultivo donde está activo el promotor (previamente determinado por la producción de indigoidina en él), se pueden identificar picos diferenciales, que se desreplican; es decir, se comparan con una base de datos para ver si el producto es conocido o no. Este compuesto puede estar ya descubierto o puede ser nuevo, en cuyo caso es necesario aislar, identificar y caracterizar el compuesto bioactivo novedoso. Para ello, a continuación, se procede a purificar el compuesto de interés por HPLC preparativa en las muestras complejas procedentes de los extractos celulares, recogiendo las fracciones asociadas a los picos de interés. Posteriormente, dicha fracción se analiza por HPLC-MS, en la cual se acopla la salida de la cromatografía a un espectrómetro de masas, para generar un espectro que permite determinar la masa del compuesto bioactivo. El último paso es la elucidación

estructural, la cual se desarrolla mediante resonancia magnética nuclear, técnica que permite determinar de forma absoluta la estructura de una sustancia con un altísimo grado de pureza.

Finalmente, si se obtiene una cantidad suficiente de compuesto bioactivo purificado, se procede a la realización de bioensayos (antibiogramas). Pueden desarrollarse frente a una amplia variedad de microorganismos (Gram-positivos/Gram-negativos), hongos, o incluso, parásitos, virus en cultivo y células eucariotas (tumoraes). Dichos ensayos funcionales permiten caracterizar la bioactividad del compuesto novedoso.

La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos en microorganismos constituye un campo de investigación actual y con un futuro muy amplio, que nos permitirá tratar enfermedades infecciosas e intentar disminuir la presencia de microorganismos multirresistentes. El estudio de clústeres de biosíntesis y sus mecanismos de regulación resulta clave para la obtención de nuevos compuestos como antibióticos, antitumorales, antifúngicos o antivirales, relevantes para la terapia clínica, la industria farmacéutica o para combatir plagas en cultivos vegetales. Es, por ello, imprescindible fomentar la investigación microbiológica aplicada, de la cual este TFG pretende ser una muestra. Con el progresivo avance de la tecnología, especialmente en el caso del software de análisis bioinformático, clave para este estudio, se espera poder descubrir nuevos compuestos dentro del genoma de diversos microorganismos, entre ellos *Rhodococcus*, ampliando el catálogo de compuestos bioactivos existentes. Apelar a la ciencia y a la responsabilidad ciudadana en el uso de estos fármacos será fundamental para garantizar un control eficaz de las enfermedades infecciosas y mitigar sus efectos en el futuro.

5 Bibliografía

1. Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837-837.
2. Anteneh, Y. S., & Franco, C. (2019). Whole Cell *Actinobacteria* as Biocatalysts. *Frontiers in microbiology*, 10, 77. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00077>
3. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
4. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W., & Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of applied microbiology*, 85(2), 195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>

5. Blakie B. (2015). Production of omega-3 fatty acids in *Rhodococcus opacus* PD630 Borom Blakie. (Tesis Doctoral). University of Otago, Dunedin, New Zealand.
6. Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., & Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
7. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., & Schonert, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90627-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90627-2)
8. Cano-Prieto, C., García-Salcedo, R., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A. F., Fiedler, H. P., Méndez, C., Salas, J. A., & Olano, C. (2015). Genome Mining of *Streptomyces* sp. Tü 6176: Characterization of the Nataxazole Biosynthesis Pathway. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 16(10), 1461–1473. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500153>
9. Cenicerós, A., Dijkhuizen, L., Petrusma, M., & Medema, M. H. (2017). Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus*. *BMC genomics*, 18(1), 593. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3966-1>
10. Chatterjee, A. K. & Brown, M. A. (1981). Chromosomal location of a gene (*ind*) that specifies production of the blue pigment indigoidine in *Erwinia chrysanthemi*. *Current Microbiology*, 6(5), 269-273. <https://doi.org/10.1007/BF01566875>
11. Chiba, H., Agematu, H., Kaneto, R., Terasawa, T., Sakai, K., Dobashi, K., & Yoshioka, T. (1999). Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from *Rhodococcus* sp. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 52(8), 695–699. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.695>
12. Corre, C., & Challis, G. L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural product reports*, 26(8), 977–986. <https://doi.org/10.1039/b713024b>

13. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
14. Davies J. (2013). Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of antibiotics*, 66(7), 361–364. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.61>
15. De Almeida, I. N., Da Silva Carvalho, W., Rossetti, M. L., Costa, E. R., & De Miranda, S. S. (2013). Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study. *BMC research notes*, 6, 561. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-561>
16. Doroghazi, J. R., & Metcalf, W. W. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC genomics*, 14, 611. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>
17. Elsayed, Y., Refaat, J., Abdelmohsen, U. R., & Fouad, M. A. (2017). The Genus *Rhodococcus* as a source of novel bioactive substances: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6(3), 83-92.
18. Embley, T. M., & Stackebrandt, E. (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 48, 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.001353>
19. Endo, A., & Misato, T. (1969). Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. *Biochemical and biophysical research communications*, 37(4), 718–722. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(69\)90870-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(69)90870-5)
20. Fernández de la Hoz, J. (2018). Activación de rutas de biosíntesis silenciosas en *Streptomyces albus* J1074. (Tesis doctoral) Universidad de Oviedo.
21. Finnerty W. R. (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual review of microbiology*, 46, 193–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001205>

22. Horrevorts, A. M., Borst, J., Puyk, R. J., De Ridder, R., Dzoljicdanilovic, G., Degener, J. E., Kerrebijn, K. F., & Michel, M. F. (1990). Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Journal of medical microbiology*, 31(2), 119–124. <https://doi.org/10.1099/00222615-31-2-119>
23. Hur, G. H., Vickery, C. R., & Burkart, M. D. (2012). Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Natural product reports*, 29(10), 1074–1098. <https://doi.org/10.1039/c2np20025b>
24. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
25. Iwatsuki, M., Uchida, R., Takakusagi, Y., Matsumoto, A., Jiang, C. L., Takahashi, Y., Arai, M., Kobayashi, S., Matsumoto, M., Inokoshi, J., Tomoda, H., & Omura, S. (2007). Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *The Journal of antibiotics*, 60(6), 357–363. <https://doi.org/10.1038/ja.2007.48>
26. Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., & Solecka, J. (2018). Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Polish journal of microbiology*, 67(3), 259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
27. Jones, A., & Goodfellow, M. (2012). Genus IV *Rhodococcus* (Zopf 1891) emend. Goodfellow, Alderson and Chun 1998a.
28. Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hooft, J., van Santen, J. A., Tracanna, V., Suarez Duran, H. G., Pascal Andreu, V., Selem-Mojica, N., Alanjary, M., Robinson, S. L., Lund, G., Epstein, S. C., Sisto, A. C., Charkoudian, L. K., Collemare, J., Linington, R. G., Weber, T., Medema, M. H. (2020). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic acids research*, 48(D1), D454–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>
29. Kelly, C.P., & LaMont, J. T. (2008). *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *The New England journal of medicine*, 359(18), 1932–1940. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707500>

30. Kern, W. V. (2018). Multiresistente Bakterien: Antibiotikaverordnung und Reserveantibiotika [Multiresistant Bacteria - Antibiotic Prescription and Antibiotics of Last Resort]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 143(9), 643–650. <https://doi.org/10.1055/s-0043-119958>
31. Kitagawa, W., & Tamura, T. (2008). Three Types of Antibiotics Produced from *Rhodococcus erythropolis* Strains. *Microbes and environments*, 23(2), 167–171. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.167>
32. Kong, L., Xu, G., Liu, X., Wang, J., Tang, Z., Cai, Y. S., Shen, K., Tao, W., Zheng, Y., Deng, Z., Price, N., & Chen, W. (2019). Divergent Biosynthesis of C-Nucleoside Minimycin and Indigoidine in Bacteria. *iScience*, 22, 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.037>
33. Krause, J., Handayani, I., Blin, K., Kulik, A., & Mast, Y. (2020). Disclosing the Potential of the SARP-Type Regulator PapR2 for the Activation of Antibiotic Gene Clusters in *Streptomyces*. *Frontiers in microbiology*, 11, 225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00225>
34. Kuhn, R., Starr, M. P., Kuhn, D. A., Bauer, H., & Knackmuss, H. J. (1965). Indigoidine and other bacterial pigments related to 3,3'-bypirimidil. *Archiv fur Mikrobiologie*, 51, 71–84. <https://doi.org/10.1007/BF00406851>
35. Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G., Lessard, P. A., Barbara, J. E., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2008). Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society*, 130(4), 1126–1127. <https://doi.org/10.1021/ja077821p>
36. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*--masters of catabolic versatility. *Current opinion in biotechnology*, 16(3), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.007>
37. McDaniel, R., Welch, M., & Hutchinson, C. R. (2005). Genetic approaches to polyketide antibiotics. *1. Chemical reviews*, 105(2), 543–558. <https://doi.org/10.1021/cr0301189>
38. McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., ...

- Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15582–15587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607048103>
39. Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
40. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
41. Nachtigall, J., Schneider, K., Nicholson, G., Goodfellow, M., Zinecker, H., Imhoff, J. F., Süßmuth, R. D., & Fiedler, H. P. (2010). Two new aurachins from *Rhodococcus* sp. Acta 2259. *The Journal of antibiotics*, 63(9), 567–569. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.79>
42. Ochi, K., & Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9>
43. O'Connor S. E. (2015). Engineering of Secondary Metabolism. *Annual review of genetics*, 49, 71–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092053>
44. Olano, C., García, I., González, A., Rodriguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A. F., Méndez, C., & Salas, J. A. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microbial biotechnology*, 7(3), 242–256. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12116>
45. Omura, S., & Crump, A. (2014). Ivermectin: panacea for resource-poor communities. *Trends in parasitology*, 30(9), 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.005>
46. Parida, S. K., Axelsson-Robertson, R., Rao, M. V., Singh, N., Master, I., Lutckii, A., Keshavjee, S., Andersson, J., Zumla, A., & Maeurer, M. (2015). Totally drug-resistant

- tuberculosis and adjunct therapies. *Journal of internal medicine*, 277(4), 388–405.
<https://doi.org/10.1111/joim.12264>
47. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological research*, 231, 126374.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
 48. Schwarzer, D., & Marahiel, M. A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Die Naturwissenschaften*, 88(3), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s001140100211>
 49. Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, P. C., & Mazmanian, S. K. (2014). Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell metabolism*, 20(5), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.016>
 50. Starr, M. P., Cosens, G., & Knackmuss, H. J. (1966). Formation of the blue pigment indigoidine by phytopathogenic erwinia. *Applied microbiology*, 14(6), 870–872.
 51. The Infectious Diseases Society of America (2004). Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates... A Public Health Crisis Brews. [Internet]. Consultado el 25 de junio de 2020. Disponible en: https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/policy--advocacy/current_topics_and_issues/antimicrobial_resistance/10x20/statements/070104-as-antibiotic-discovery-stagnates-a-public-health-crisis-brews.pdf
 52. Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1965). A new antibiotic, Kasugamicyn. *The Journal of antibiotics*, 18, 101–103.
 53. Vendramini, J., Moriel, P., Cooke, R. F., Arthington, J. D., da Silva, H. M., Piccolo, M. B., Sanchez, J., Gomes, V., & Mamede, P. A. (2018). Effects of monensin inclusion into increasing amount of concentrate on growth and physiological parameters of early-weaned beef calves consuming warm-season grasses. *Journal of animal science*, 96(12), 5112–5123.
<https://doi.org/10.1093/jas/sky374>
 54. Voeykova, T., Emelyanova, L., Tabakov, V., & Mkrtyumyan, N. (1998). Transfer of plasmid pTO1 from *Escherichia coli* to various representatives of the order *Actinomycetales* by intergeneric conjugation. *FEMS microbiology letters*, 162(1), 47–52.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12977.x>

55. Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., & Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9259–9264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401734111>

56. Weber, T., & Kim, H. U. (2016). The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synthetic and systems biotechnology*, 1(2), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2015.12.002>

6 Anexos

Tabla S1. Algunos compuestos bioactivos generados a partir de Actinomycetes Se pueden comprobar las distintas categorías como: antimicrobianos, antifúngicos, bioherbicidas, biopesticidas, antiparasitarios, antivirales, antitumorales, inmunoestimuladores e inmunosupresores.

Tipo de compuesto y especies productoras	Agente (s) bioactivo (s)
Productores de agentes antibacterianos	
<i>Verrucosispora spp.</i>	Abisomicina
<i>Streptomyces anulatus</i>	Actinomicinas
<i>Streptomyces canus</i>	Anfomicina
<i>Micromonospora spp.</i>	Antraciclina
<i>Streptomyces canus</i>	Aspartocinas
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Avermectina
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>Micromonospora spp.</i>	Clostomicinas
<i>Streptomyces griseus</i>	Cicloheximida
<i>Streptomyces orchidaceus</i>	Cicloserina
<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomicina
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromicina
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicina
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Higromicina

<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamicina
<i>Streptomyces kitasoensis</i>	Leucomicina
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomicina
<i>Marinispora spp.</i>	Marinomicina
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomicinas
<i>Micromonospora spp.</i>	Netamicina
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocina
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomicina
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxitetraciclina
<i>Streptomyces spp.</i>	Pristinamicina
<i>Streptomyces lindensis</i>	Retamicina
<i>Streptomyces mediterranei</i>	Rifamicina
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetina
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Espiramicina
<i>Streptomyces virginiae</i>	Estafilomicina
<i>Streptomyces endus</i>	Estendomicina
<i>Streptomyces lydicus</i>	Estreptolidigina
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Estreptotricina

<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetraciclina
<i>Micromonospora spp.</i>	Tiocoralina
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomicina

Productores de agentes antifúngicos	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Streptomyces anulatus</i>	Actinomicinas
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina B
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidina
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidina
<i>Streptomyces spp.</i>	Carboxamicina
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>Streptomyces padanus</i>	Fungicromina
<i>Streptomyces galbus</i>	Galbonólidos
<i>Streptomyces violaceusniger</i> YCED-9	Guanidilfungina
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Jadomicina
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Kasugamycina
<i>Streptomyces spp.</i>	Kitamicina
<i>Streptomyces natalensis</i>	Natamicina
<i>Streptomyces tendae</i>	Nikkomycina

<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Oligomicina
<i>Streptomyces humidus</i>	Fenilacetato
<i>Streptomyces cacaoi</i>	Polioxina B
<i>Streptomyces canus</i>	Resistomicina
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Estreptotricina
<i>Streptomyces canus</i>	Tetracenomicina
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencina
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Validamicina

Bioherbicidas / Biopesticidas	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Actinomadura spp.</i>	2,4-Dihidro-4- (β - d -ribofuranosil) -1, 2, 4 (3H) -triazol-3-ona (herbicida)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbimicina
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Ivermectina
<i>Streptomyces prasinus</i>	Prasinons
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosad (insecticida neurotóxico)

Productores de agentes antiparasitarios	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Avermectinas
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Prodiginina

<i>Streptomyces bottropensis</i>	Trioxacarcina
----------------------------------	---------------

Productores de agentes antivirales	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Streptomyces antibioticus</i>	9-β- d -Arabinofuranosyladénine
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Higromicina
<i>Streptomyces spp.</i>	Panosialinas

Productores de agentes antitumorales	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Micromonospora spp.</i>	Antraquinonas
<i>Asteroides nocardia</i>	Asterobactina
<i>Streptomyces spp.</i>	Borrelidina
<i>Micromonospora spp.</i>	Diazepinomicina
<i>Actinomadura spp.</i>	IB-00208
<i>Micromonospora spp.</i>	Complejo LL-E33288
<i>Micromonospora spp.</i>	Lomaiviticas
<i>Micromonospora spp.</i>	Lupinacidinas
<i>Thermoactinomyces spp.</i>	Mechercharmicina
<i>Marinospora spp.</i>	Marinomicina
<i>Salinispora tropica</i>	Salinosporamida

<i>Streptomyces peucetius</i>	Doxorrubicina (adriamicina)
<i>Streptomyces peucetius</i>	Daunorrubicina (daunomicina)
<i>Micromonospora spp.</i>	Tetrocarcin
<i>Micromonospora spp.</i>	Tiocoralina

Productores de agentes inmunoestimuladores	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Nocardia rubra</i>	Rubratina
<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Bestatina
<i>Kitasatospora kifunense</i>	FR-900494

Productores de agentes inmunosupresores	Agente (s) bioactivo (s)
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Brasilicardina
<i>Streptomyces filipinensis</i>	Higromicina
<i>Streptomyces filipinensis</i>	Pentalenolactone
<i>Streptomyces spp.</i>	l-Asparaginase
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	l-Glutaminase

Tabla S2. Medios de cultivo.

Medio de cultivo	Composición
TSB	<ul style="list-style-type: none">● 30 g de soja tratada con tripsina● Agua destilada hasta 1000 mL
TSA	<ul style="list-style-type: none">● 30 g de soja tratada con tripsina● Agua destilada hasta 1000 mL● 22 g/L de agar
2xTY (líquido)	<ul style="list-style-type: none">● Triptona: 16 g● NaCl: 5 g● Extracto de levadura: 10 g● Agua destilada hasta 1000 mL
2xTY (sólido)	<ul style="list-style-type: none">● Triptona: 16 g● NaCl: 5 g● Extracto de levadura: 10 g● Agua destilada hasta 1000 mL● 22 g/L de agar

Tabla S3. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las regiones promotoras de los genes de interés.

Nombre	Secuencia	Tm (°C) o temperatura de fusión	Tamaño (Kb)
Clúster 2 gen 1			2076
RHA 1 NRPS 2-1 FW NotI	ATATGCGGCCCGCCACCTT GTTCGTCCTCTTCC	78	
RHA 1 NRPS 2-1 Rv HindIII	ATATAAGCTTGTCGTGTCG CTCGCGTTG	71	
Clúster 2 gen 2			2034
RHA 1 NRPS 2-2 FW BamHI	ATATGGATCCCTCGTTCCC CCAGCGGGTAG	75	
RHA 1 NRPS 2-2 Rv HindIII	ATATAAGCTTCGCCGGACG GACAGTTCGAC	73	
Clúster 20			2067
RHA 1 NRPS 20 FW BamHI	ATATGGATCCCATCGTTT GCCCGGTTCTCG	73	
RHA 1 NRPS 20 Rv HindIII	ATATAAGCTTATCTGCAG GCGTCCGAGTTG	69	