



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**“Identificación y caracterización de agrupamientos de
genes de biosíntesis de compuestos derivados de
hidroxibenzoatos en *Streptomyces*”**

Doctorando:

María Soledad González Moreno

Oviedo, noviembre 2024



Universidad de Oviedo

Departamento de Biología Funcional

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**“Identificación y caracterización de agrupamientos de
genes de biosíntesis de compuestos derivados de
hidroxibenzoatos en *Streptomyces*”**

Doctorando:

María Soledad González Moreno

Directora:

Dr. María del Carmen Méndez Fernández

Oviedo, noviembre 2024



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Identificación y caracterización de agrupamientos de genes de biosíntesis de compuestos derivados de hidroxibenzoatos en <i>Streptomyces</i> .	Inglés: Identification and characterization of BGCs of biosynthesis genes of compounds derived from hydroxybenzoates in <i>Streptomyces</i> .
2.- Autor	
Nombre: María Soledad González Moreno	
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El aumento de la prevalencia de las bacterias multirresistentes o la inespecificidad de fármacos en el tratamiento del cáncer son algunas de las razones por las que el desarrollo de nuevos fármacos es una necesidad apremiante. Muchos de los compuestos bioactivos utilizados como fármacos son de origen natural y un gran porcentaje de estos compuestos son producidos por el género de bacterias *Streptomyces*. En los últimos años la secuenciación de los genomas de estas bacterias ha revelado que poseen un potencial mayor del esperado como productores de compuestos bioactivos, lo que ha llevado a utilizar la minería genómica como estrategia bioinformática para identificar agrupaciones de genes de biosíntesis (BGCs) que codifiquen nuevos compuestos. Esta estrategia permite localizar BGCs desconocidos (crípticos) que en muchas ocasiones se encuentran silenciosos en condiciones de cultivo de laboratorio estándar, por lo que se requiere de la ingeniería genética para su activación. Muchos de los compuestos codificados por estos BGCs se sintetizan a partir de proteínas multimodulares denominadas Sintetasas de Péptidos No Ribosomales (NRPS) o Policétidos Sintetasas (PKS), dando péptidos no ribosomales o policétidos, respectivamente. La síntesis de estos compuestos parte de *building blocks* que son reconocidos por las NRPS y PKS. Uno de estos *building blocks* es el salicilato, resultante de la actividad de la enzima Salicilato Sintasa. La búsqueda de BGCs portadores de un gen que codifique dicha enzima podría resultar en la localización de compuestos que contenga en su estructura la molécula de salicilato.

Mediante la búsqueda de genes codificadores de Salicilato Sintasa se han identificado nueve genes de este tipo en siete cepas de *Streptomyces* que pertenecen a nueve BGCs. Gracias al programa bioinformático antiSMASH se han caracterizado estos BGCs, ocho de ellos codifican compuestos conocidos: micemicina, caboxamicina y coelibactina. El BGC restante perteneciente a *S. glaucescens* GLA.O. Se han realizado estudios de homologías de los diferentes productos proteicos de los genes de este BGC y se han estudiado sus genes codificantes de NRPS, obteniéndose los dominios y la especificidad de sustrato de dichos genes. Se han generado diferentes cepas recombinantes en genes del BGC, mutantes en genes estructurales, cepas con genes reguladores



modificados y cepas con la inserción de un promotor fuerte para activar el BGC. Algunas de las cepas con reguladores modificados, con un regulador LuxR expresado o un regulador TetR eliminado, han mostrado la producción de un grupo compuestos de la misma familia (2-11) que no se producen en la cepa silvestre, mientras que uno de los mutantes en los genes codificadores de NRPS ha perdido la producción de seis compuestos (D03-D07). Los compuestos identificados no han podido ser relacionados por sus estructuras y/o fórmulas moleculares con el BGC estudiado. En base al análisis bioinformático del BGC 8, se ha propuesto una ruta de biosíntesis para el compuesto codificado por dicho BGC. Por otro lado, en el curso del trabajo realizado con *S. glaucescens* se ha detectado la actividad del BGC 13 que codifica desferoxaminas en los medios SM10 y R5A. así como del BGC 20 que codifica tetracenomicina en la mayoría de los medios de cultivo, observando que en los medios M4, SM5, SM10, SM30 y SV2 la producción se ve afectada positivamente por la expresión de un regulador global *afsR*.

RESUMEN (en Inglés)

The increasing prevalence of multi-resistant bacteria or the non-specificity of drugs in the treatment of cancer are some of the reasons why the development of new drugs is an urgent need. Many of the bioactive compounds used as drugs are natural products and a large percentage of these compounds are produced by the bacteria genus *Streptomyces*. In recent years, the sequencing of the genomes of these bacteria revealed the greater potential as producers of bioactive compounds than expected, which has led to the use of genomic mining and bioinformatics strategy to identify new compounds encoded by biosynthesis gene clusters (BGCs). This strategy allows the location of unknown (cryptic) BGCs that are often silent under standard laboratory culture conditions, so genetic engineering is required for their activation. Many of the compounds encoded by these BGCs are synthesized from multimodular proteins called Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS) or Polyketide Synthases (PKS), giving non-ribosomal peptides or polyketides, respectively. The synthesis of these compounds begins from building blocks recognized by NRPS and PKS. One of these building blocks is salicylate, resulting from the activity of the enzyme Salicylate Synthase. BGC screening for a gene encoding this enzyme could result in a compound containing the salicylate molecule in its structure.

Search of genes encoding salicylate synthase allowed the identification of nine of these type genes in seven *Streptomyces* strains corresponding to nine BGCs. Using the antiSMASH bioinformatics program, these BGCs have been characterized, eight of them encode known compounds: mycemycin, caboxamycin and coelibactin. The last one BGC belongs to *S. glaucescens* GLA.O. Homology studies of the BGC genes have been carried out and their NRPS-encoding genes have been studied, obtaining their domains and substrate specificity. Different recombinant strains of BGC genes have been generated, mutants of structural genes, strains with modified regulatory genes and strains with the insertion of a strong promoter to activate the BGC. Some of the strains with modified regulators, with an expressed LuxR regulator or a deleted TetR regulator, have shown the production of the same family group compounds (2-11) that are not produced in the wild strain, while one of the



Universidad de Oviedo

mutants in the NRPS coding genes lost the production of six compounds (D03-D07). The identified compounds could not be related by their structures and/or molecular formulas with the BGC studied. Based on the bioinformatics analysis of BGC 8, a biosynthetic route for the compound encoded by this BGC has been proposed. On the other hand, during this work with *S. glaucescens*, the activity of BGC 13 encoding desferrioxamines has been detected in SM10 and R5A media, as well as BGC 20 encoding tetracenomycin in most of the culture media, observing that in M4, SM5, SM10, SM30 and SV2 media, production is positively affected by the expression of a global regulator *afsR*.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias al contrato predoctoral financiado por la ayuda PRE2018-086992 asociada al proyecto BIO2017-82462-R del Ministerio Español de Ciencia e Innovación.

ÍNDICE





I. Introducción.....	17
1. Actinobacterias	17
1.1. Género <i>Streptomyces</i>	17
1.1.1. Ciclo de vida.....	18
1.1.2. <i>Streptomyces</i> como productor de metabolitos secundarios	20
1.1.2.1. Las agrupaciones de genes de biosíntesis.....	23
1.1.2.1.1. Péptidos sintetasa no ribosomales (NRPS)	24
1.1.2.1.2. Policétido sintasa (PKS)	27
2. Necesidad de nuevos compuestos naturales y bioactivos.....	29
2.1. Exploración de nuevos nichos	32
2.2. Modificación de las condiciones de cultivo y co-cultivos.....	34
2.3. Minería genómica	34
2.3.1. Activación de BGCs	37
2.3.2. Identificación de compuestos codificados por BGCs.....	39
2.4. Biosíntesis combinatoria.....	39
2.5. Búsqueda de diversidad estructural en los compuestos naturales	41
2.5.1. El salicilato como <i>building block</i>	41
II. OBJETIVOS	47
III. Materiales y Métodos	51
1. Microorganismos	51
2. Métodos microbiológicos	53
2.1. Soluciones utilizadas	53
2.2. Antibióticos.....	53
2.3. Medios de cultivo	53
2.3.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	54
2.3.1. Medios de cultivo para bioensayos.....	54
2.3.2. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	54
2.4. Obtención de <i>stock</i> celulares	58
2.5. Condiciones de cultivo	58
2.5.1. Condiciones de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	58
2.5.2. Condiciones de cultivo para <i>Streptomyces</i>	59
3. Aislamiento de ADN.....	59



4. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.....	59
4.1. Polimerasa <i>DreamTaq</i> : PCR de cribado y comprobaciones.....	60
4.2. Polimerasa <i>Herculasa</i> : amplificación de ADN para construcciones	60
4.3. Polimerasas <i>Terra</i> y <i>Platinum</i> : comprobación de transconjugantes de <i>Streptomyces</i>	61
5. Manipulación <i>in vitro</i> del ADN	62
5.1. Vectores utilizados	62
5.2. Digestión enzimática del ADN	62
5.2.1. Desfosforilación de extremos 5' de ADN	63
5.3. Ligación de ADN.....	63
5.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	63
5.4.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	64
6. Transformación de ADN plasmídico	64
6.1. Preparación y transformación de células <i>E. coli</i> DH10B	64
6.2. Preparación y transformación de células <i>E. coli</i> ET12567.....	64
7. Conjugación intergenérica de <i>Streptomyces</i>	65
8. Secuenciación de ADN	65
9. Diseño de oligonucleótidos.....	66
10. Generación de construcciones plasmídicas para cepas mutantes	70
10.1. Generación del plásmido pCR-Blunt-cs_ssfH-1	71
10.2. Generación de mutantes.....	72
10.2.1. Construcción de plásmidos para la disrupción de genes	73
10.2.1.1. Plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1	74
10.2.2. Plásmidos para la eliminación de genes	75
10.2.2.1. Generación de pHZ- Δ X en tres pasos: Método Convencional	76
10.2.2.1.1. pHZ- Δ orf12	77
10.2.2.2. Generación de pHZ- Δ X en un paso: Método de Gibson.....	79
10.2.2.2.1. pHZ- Δ contig362.....	81
10.2.2.2.2. pHZ- Δ orf14	82
10.2.2.2.3. pHZ- Δ orf23-24.....	84



10.2.2.2.4. pHZ- Δ orf36	85
10.3. Vectores para la sobreexpresión de genes	87
10.3.1. Sobreexpresión de genes con el vector pSET152ETc	87
10.3.1.1. pSETETc-orf11	89
10.3.1.2. pSETETc-orf29	90
10.3.2. Sobreexpresión de genes con el vector pOJ260*P	91
10.3.2.1. pOJ260*p-Eorf24	92
10.3.2.1. pOJ260*p-Eorf33	93
11. Extracción de compuestos producidos por <i>Streptomyces</i>	94
11.1. Extracción de compuestos en medio líquido	94
11.2. Extracción de compuestos de medio sólido	95
12. Análisis de compuestos producidos por <i>Streptomyces</i>	95
12.1. Análisis por UPLC	95
12.2. Desreplicación de extractos	95
13. Purificación de compuestos	96
13.1. Purificación de compuestos en medio líquido	96
13.2. Semi-purificación de compuestos en medio sólido	98
14. Ensayos de bioactividad	99
IV. Resultados	103
1. Búsqueda de genes codificantes de Salicilato Sintasa	103
1.1. Identificación de aminoácidos conservados en proteínas tipo SsfH.....	103
1.1.1. Amplificación por PCR de genes codificantes para Salicilato Sintasa ...	104
1.2. Búsqueda bioinformática de genes codificantes para Salicilato Sintasa ...	104
2. Análisis de las cepas <i>Streptomyces sp.</i> CS113, <i>Streptomyces sp.</i> CS159, <i>Streptomyces lividans</i> TK24 y <i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352	105
2.1. Análisis bioinformático.....	105
2.1.1. <i>Streptomyces sp.</i> CS113	105
2.1.2. <i>Streptomyces sp.</i> CS159.....	106
2.1.3. <i>Streptomyces lividans</i> TK24	107
2.1.1. <i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352.....	108
2.2. Identificación de los BGCs con genes tipo <i>ssfH</i>	110
3. Análisis de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> NTK937.....	114



3.1. Análisis bioinformático de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> NTK937.....	114
3.2. Identificación del BGC con un gen tipo <i>ssfH</i> en <i>Streptomyces sp.</i> NTK937	115
4. Análisis de la <i>Streptomyces sp.</i> CS123	117
4.1. Análisis bioinformático de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> CS123	117
4.2. Identificación de BGCs con un gen tipo <i>ssfH</i> en <i>Streptomyces sp.</i> CS123	118
4.3. Generación del mutante Δ CS_ <i>ssfH</i> -1.....	119
4.3.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ cs_ <i>ssfH</i> -1.....	120
4.3.2. Reanálisis de la secuencia del gen cs_ <i>ssfH</i> -1 y su localización en un BGC de micemicinas	122
4.4. Generación del mutante Δ 362	123
4.4.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ 362.....	125
4.4.2. Análisis del contig 362.....	125
5. Análisis de <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	129
5.1. Análisis bioinformático de la cepa <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	129
5.2. Identificación del BGC con un gen tipo <i>ssfH</i> en <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	130
5.3. BGC 8 de cepa <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	130
5.3.1. Análisis de las NRPS del BGC 8	133
5.3.2. Análisis de homologías del BGC 8.....	138
5.4. Cepas mutantes en el BGC 8 de <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O.....	142
5.4.1. Mutante en genes estructurales	142
5.4.1.1. Generación del mutante Δ orf12g	142
5.4.1.1.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf12g.....	143
5.4.1.2. Generación del mutante Δ orf14g	146
5.4.1.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf14g.....	147
5.4.1.3. Generación del mutante Δ orf23-24g	147
5.4.1.3.1. Cultivos líquidos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf23-24g	149



5.4.1.3.2. Cultivos sólidos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf23-24g	149
5.4.2. Cepas con expresión constitutiva.....	152
5.4.2.1. Generación de la cepa Eorf24g.....	152
5.4.2.1.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa Eorf24g	153
5.4.2.2. Generación de la cepa Eorf33g.....	154
5.4.2.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa Eorf33g	155
5.4.3. Cepas con genes reguladores sobreexpresados y/o mutados (orf11, orf29 y orf36).....	156
5.4.3.1. Generación de la cepa +orf11g	156
5.4.3.1.1. Generación de la cepa Δ orf12g+orf11g.....	158
5.4.3.1.2. Cultivos y perfiles metabólicos de las cepas sobreexpresando el regulador SARP <i>orf11</i>	159
5.4.3.2. Eliminación del regulador TetR; generación del mutante Δ orf36g....	161
5.4.3.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf36g.....	162
5.4.3.3. Sobreexpresión del regulador LuxR: generación de la cepa +orf29g..	164
5.4.3.3.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa +orf29g.....	165
5.4.3.4. Sobreexpresión del regulador LuxR en el mutante Δ orf36g: generación de la cepa Δ orf36g+orf29g.....	167
5.4.3.4.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa Δ orf36g+orf29g.....	167
5.5. Purificación y caracterización química de los compuestos 1-4	169
5.6. Bioensayo de la actividad biológica del compuesto UO-188.....	170
5.7. Desreplicación de extractos de etanol de cultivos del mutante Δ orf36g..	171
5.8. Metabolitos producidos por <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O.....	173
5.8.1. Compuestos conocidos identificados por desreplicación en <i>S. glaucescens</i> GLA.O	173
5.8.2. Compuestos desconocidos identificados por desreplicación en <i>S. glaucescens</i> GLA.O.....	178
5.9. Variaciones la producción de tetracenomicina C.....	179
V. DISCUSIÓN.....	185



VI. Conclusiones.....	205
VII. Referencias.....	209
VIII. Anexos	233



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	19
Figura 2.	21
Figura 3.	22
Figura 4.	26
Figura 5.	28
Figura 6.	29
Figura 7.	33
Figura 8.	42
Figura 9.	43
Figura 10.	71
Figura 11.	72
Figura 12.	73
Figura 13.	74
Figura 14.	75
Figura 15.	77
Figura 16.	78
Figura 17.	80
Figura 18.	82
Figura 19.	83
Figura 20.	85
Figura 21.	86
Figura 22.	88
Figura 23.	89
Figura 24.	90
Figura 25.	92
Figura 26.	93
Figura 27.	94
Figura 28.	103
Figura 29.	112
Figura 30.	114



Figura 31.	116
Figura 32.	120
Figura 33.	121
Figura 34.	123
Figura 35.	124
Figura 36.	125
Figura 37.	127
Figura 38.	131
Figura 39.	134
Figura 40.	141
Figura 41.	143
Figura 42.	145
Figura 43.	146
Figura 44.	147
Figura 45.	148
Figura 46.	149
Figura 47.	150
Figura 48.	151
Figura 49.	153
Figura 50.	154
Figura 51.	155
Figura 52.	156
Figura 53.	158
Figura 54.	159
Figura 55.	160
Figura 56.	162
Figura 57.	163
Figura 58.	164
Figura 59.	165
Figura 60.	166
Figura 61.	167
Figura 62.	168



Figura 63.	168
Figura 64.	169
Figura 65.	170
Figura 66.	172
Figura 67.	174
Figura 68.	174
Figura 69.	175
Figura 70.	176
Figura 71.	176
Figura 72.	180
Figura 73.	181
Figura 74.	187
Figura 75.	191
Figura 76.	192
Figura 77.	195
Figura 78.	201





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas de <i>Streptomyces</i> utilizadas para cribados de PCR	51
Tabla 2.	Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este estudio.....	52
Tabla 3.	Cepas de mutantes de <i>Streptomyces</i> generadas en este estudio.....	52
Tabla 4.	Antibióticos y concentraciones utilizadas para cada microorganismo	53
Tabla 5.	Condiciones de reacción para la polimerasa <i>DreamTaq</i>	60
Tabla 6.	Condiciones de reacción para la polimerasa <i>Herculasa</i>	61
Tabla 7.	Condiciones de reacción para la polimerasa <i>Terra</i>	61
Tabla 8.	Condiciones de reacción para la polimerasa <i>Platinum</i>	62
Tabla 9.	Vectores utilizados en el estudio.....	62
Tabla 10.	Oligonucleótidos utilizados para los cribados por PCR de genes <i>ssfH</i>	66
Tabla 11.	Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes.....	67
Tabla 12.	Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes con sobreexpresión	68
Tabla 13.	Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes en <i>Streptomyces sp.</i> CS123.....	68
Tabla 14.	Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes en <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O.....	69
Tabla 15.	Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes con sobreexpresión en <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O.....	69
Tabla 16.	Otros oligonucleótidos utilizados	70
Tabla 17.	Plásmidos utilizados para la generación de cepas mutantes en la cepa <i>Streptomyces sp.</i> CS123.....	70
Tabla 18.	Plásmidos utilizados para la generación de cepas mutantes en genes del BGC 8 en la cepa <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	70
Tabla 19.	Plásmidos utilizados para la generación de cepas con sobreexpresión de genes del BGC 8 en la cepa <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O.....	71
Tabla 20.	Programa de purificación específico para los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190	97
Tabla 21.	Programa de semi-purificación específico para las fracciones.....	99
Tabla 22.	BGCs identificados en <i>Streptomyces sp.</i> CS113	105



Tabla 23.	BGCs identificados en <i>Streptomyces sp.</i> CS159	106
Tabla 24.	BGCs identificados en <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	108
Tabla 25.	BGCs identificados en <i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352	109
Tabla 26.	Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de coelibactina en <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) y las de los BGCs de coelibactina identificados en <i>Streptomyces sp.</i> CS113, <i>Streptomyces sp.</i> CS159, <i>Streptomyces lividans</i> TK24 y <i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352.....	111
Tabla 27.	Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de micemicinas A, B y C de <i>Streptomyces olivaceus</i> FXJ8.012 y las del BGC 12 identificado en <i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352.....	113
Tabla 28.	BGCs identificados en <i>Streptomyces sp.</i> NTK937	115
Tabla 29.	Tabla de proteínas que componen el BGC responsable de la producción de caboxamicina en <i>Streptomyces sp.</i> NTK937	116
Tabla 30.	BGCs identificados en <i>Streptomyces sp.</i> CS123	117
Tabla 31.	Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de micemicinas A, B y C de <i>Streptomyces olivaceus</i> FXJ8.012 y las del BGC 4 detectado en el contig 9 de <i>Streptomyces sp.</i> CS123.....	122
Tabla 32.	Identificación en ocho cepas de <i>Streptomyces</i> de las proteínas homólogos a los productos codificados por los genes del contig 362.....	128
Tabla 33.	BGCs identificados en <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	129
Tabla 34.	Tabla de genes del BGC 8 de <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	131
Tabla 35.	Motivos conservados de los dominios A de las NRPS del BGC 8	135
Tabla 36.	Binding pocket de los dominios A de las NRPS del BGC 8	136
Tabla 37.	Secuencias conservadas en los dominios C, Cy, cMT, PCP y TE del BGC 8	138
Tabla 38.	Comparación de los productos génicos del BGC 8 de <i>Streptomyces glaucescens</i> con otras cepas de <i>Streptomyces</i>	140
Tabla 39.	Características de los compuestos diferenciales detectados.....	151
Tabla 40.	Genes homólogos detectados en <i>Streptomyces glaucescens</i> para los genes del BGC de pentalenolactona de <i>Streptomyces arenae</i> TU469.....	178
Tabla 41.	Compuestos desconocidos producidos por <i>Streptomyces glaucescens</i> detectados por desreplicación.....	179
Tabla 42.	Otras cepas del estudio de homologías del BGC 8 de <i>S. glaucescens</i>	233



I. INTRODUCCIÓN





I. INTRODUCCIÓN

1. Actinobacterias

Las Actinobacterias son un filo de bacterias Gram positivas cuyo genoma presenta un elevado contenido de CG. Su morfología es muy variada, llegando a verse formas filamentosas, cocáceas, en varilla o formando micelio y produciendo esporas (Wink *et al.*, 2017). Además se encuentran en una amplia variedad de hábitat, tanto terrestres como marinos, pasando por ambientes extremos, ya sean desiertos, fondos oceánicos, ambientes alcalinos o ácidos (Bull y Goodfellow, 2019; Hui *et al.*, 2021). Debido a su amplia distribución en la naturaleza, presentan un papel fundamental como organismos saprofiticos degradando los componentes del suelo y formando humus gracias a las enzimas extracelulares hidrolíticas que producen. Estas enzimas degradan diferentes polímeros típicos del suelo y procedentes de plantas muertas y materia animal y fúngica. De esta forma son de vital importancia para los ciclos biológicos de la materia orgánica (Barka *et al.*, 2016). Además, las actinobacterias son ampliamente reconocidas por la producción de compuestos naturales procedentes de su metabolismo secundario y que tienen gran importancia comercial y farmacológica (Barka *et al.*, 2016, Al-Shaibani *et al.*, 2021, Jose *et al.*, 2021). Este amplio y variado filo, según los análisis de 16S RNAr, se compone de seis clases: Rubrobacteria, Thermoleophilia, Coriobacteriia, Acidimicrobiia, Nitiliruptoria y Actinomycetia (Salam *et al.*, 2020).

1.1. Género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* se compone de bacterias aerobias y filamentosas que se encuentran dentro de la clase Actinomycetia del filo Actinobacteria. Es el género con mayor número de miembros de todo el filo Actinobacteria (Salam *et al.*, 2020). Es gracias a este género que las Actinobacterias son reconocidas por su capacidad productora de compuestos naturales, ya que el género *Streptomyces* es el mayor productor de estos compuestos (Donald *et al.*, 2022), y concretamente de metabolitos secundarios de uso farmacológico que actúan como agentes antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, antivirales o antiparasitarios (Demain y Sánchez, 2009; Mahajan y Balachandran, 2012; Procópio *et al.*, 2012). Sin embargo, no es solo en el ámbito clínico donde *Streptomyces* es de utilidad, sino también en al ámbito industrial. Así, *S. erumpens*, *S. limosus* y *S.*



hygroscopicus producen amilasas termoestables y/o acidófilas para las industrias papeleras, panaderas y de elaboración de cerveza, alcoholes industriales y de jarabes de maltosa (Wink *et al.*, 2017). También existen estudios con diferentes *Streptomyces* que auguran prometedoras aportaciones. Como por ejemplo, siendo productores de lactasas para las industrias textil y de tratamiento de teñidos; de poligalacturonasas para la industria textil y alimenticia; de celulasas termoestables para diferentes industrias; xilanasas inmovilizadas para la producción industrial de xilooligosacáridos con efectos prebióticos; de dextrasas alcalofílicas y termoestables para la industria azucarera, entre otras enzimas de interés industrial (Fernandes *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2008; Jang y Chen, 2003; Purushe *et al.*, 2012; Romero-Fernández *et al.*, 2018).

Estas bacterias son ubicuas y producen un característico olor a tierra, gracias a la producción del compuesto geosmina, cuya biosíntesis se encuentra altamente conservada (Hopwood, 2007). Además, presentan un ciclo de vida complejo en el que se generan hifas y producen esporas (Flärdh y Buttner, 2009). En su mayoría son bacterias inofensivas para el ser humano, a excepción de dos especies, *S. sudanensis* y *S. somaliensis*. Sin embargo, la infección por estas bacterias solo ha sido descrita en casos de inmunodeficiencia previa del paciente (Kapadia *et al.*, 2007). Aunque hay algunas especies de *Streptomyces* que son patógenas para plantas y animales, generalmente establecen relaciones de simbiosis tanto con animales, como con plantas y hongos (Hopwood, 2007). En estas simbiosis, el hospedador aprovecha la producción de metabolitos secundarios por parte de *Streptomyces* para favorecer su propio crecimiento o protegerse de posibles infecciones (Seipke *et al.*, 2012).

1.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Streptomyces* es un ciclo complejo en el que se forman distintos tipos de hifas y esporas. Cuando las esporas de *Streptomyces* se encuentran en un ambiente con condiciones favorables se produce la germinación de las mismas dando lugar al tubo germinativo. El tubo germinativo crece apicalmente y genera hifas ramificadas y compartimentadas que se nutren del sustrato en el que se encuentran. Estas hifas se denominan vegetativas o micelio sustrato (Flärdh y Buttner, 2009). Cuando las condiciones del medio se vuelven adversas, las hifas vegetativas comienzan un proceso de degradación autolítica a través de mecanismo celulares altamente regulados y que se



asemejan a la muerte celular programada (Manteca *et al.*, 2006, Manteca y Sánchez, 2009). Es en este momento cuando coexisten células vivas en el denominado micelio joven o primario (MI) compartimentalizado y células muertas. Las células vivas (MI) dan lugar al micelio secundario (MII) multinucleado, que sufre un proceso de agrandamiento (Yagüe *et al.*, 2012). En los cultivos sólidos, como suele ser común en la naturaleza, el MII presenta dos fases. El MII de desarrollo temprano, que sigue correspondiéndose con el históricamente llamado micelio sustrato, y el MII de desarrollo tardío, en el que la hifa comienza a formar una capa hidrofóbica que la envuelve y protege de la desecación. Gracias a esta capa hidrofóbica, la hifa puede crecer fuera del sustrato, dando lugar al históricamente llamado micelio aéreo o reproductivo (Yagüe *et al.*, 2012). Finalmente, en este micelio reproductivo (MII tardío) se produce un nuevo proceso de muerte celular programada que permite la formación de cadenas de esporas, al generarse tabiques, conteniendo cada una de estas esporas una única copia del cromosoma. Dichas esporas son liberadas al medio para comenzar de nuevo el ciclo (Figura 1).

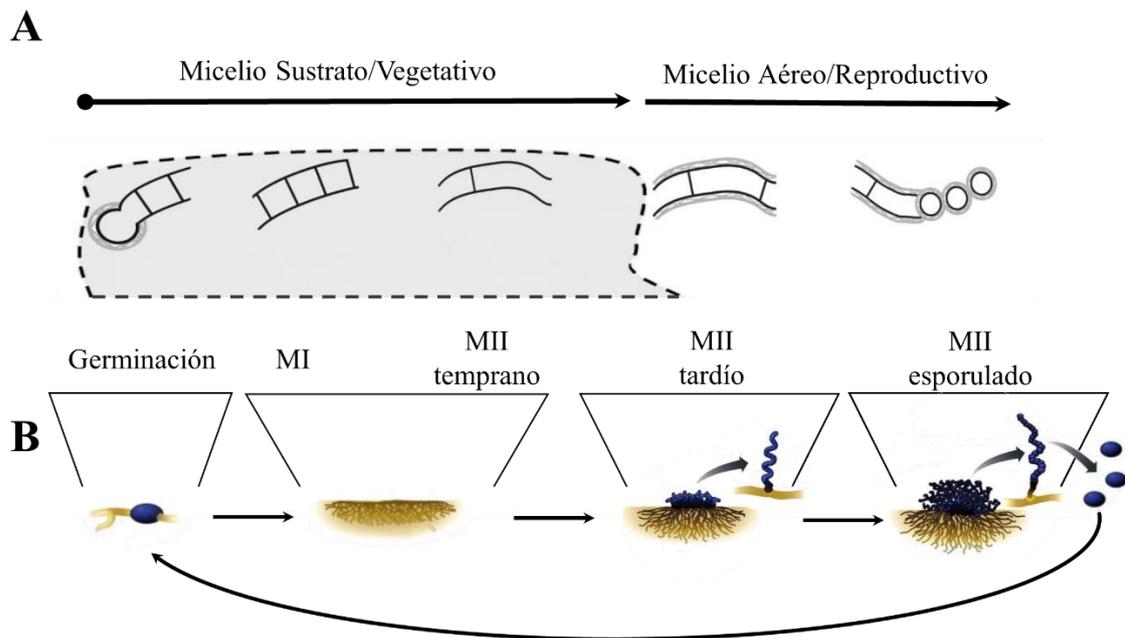


Figura 1. Esquemas ilustrativos del ciclo de vida de *Streptomyces*. **A:** Modificado de Yagüe *et al.*, (2012). **B:** Modificado de Slonczewski y Foster, (2013).

Mientras que en MI es predominante el metabolismo primario, en MII lo es el metabolismo secundario, con lo que es en esta fase cuando se producen el mayor número de metabolitos secundarios (Manteca *et al.*, 2008, Manteca *et al.*, 2010). Por otro lado,



cuando el cultivo se produce en líquido solo aparecen las fases MI y MII temprano, sin capa hidrofóbica, y generalmente no se produce la esporulación (Yagüe *et al.*, 2012).

1.1.2. Streptomyces como productor de metabolitos secundarios

Como se ha comentado anteriormente, *Streptomyces* es la mayor fuente bacteriana de producción de compuestos naturales (Donald *et al.*, 2022). Esto es gracias a la producción de metabolitos secundarios. Estos metabolitos son definidos como compuestos que no se consideran esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo. Sin embargo, los metabolitos secundarios, también denominados especiales (van Keulen y Dyson, 2014), tienen diferentes funciones como defensa, regulación y comunicación. Así, podemos encontrar metabolitos con función antibiótica que permiten que la bacteria compita con otros microorganismos con los que entra en contacto, ya sean o no del mismo género (Procópio *et al.*, 2012). También existen metabolitos secundarios que le permiten mantener una relación de mutuo beneficio con animales, plantas y hongos (Seipke *et al.*, 2012), y metabolitos secundarios que actúan como moléculas señalizadoras, reguladoras o de comunicación entre células para protegerse, por ejemplo, de infecciones virales (Liu y Kakeya, 2020).

Normalmente los metabolitos secundarios son biosintetizados gracias a las denominadas agrupaciones de genes de biosíntesis (BGCs). Los BGCs son un conjunto de genes que actúan de manera coordinada y que generalmente se encuentran agrupados y regulados por señales ambientales, regulación genética y/o señales internas (Olano *et al.*, 2011). La secuenciación del genoma de la especie modelo *Streptomyces coelicolor* A3(2) reveló un número superior del esperado de estos BGCs, puesto que el número de metabolitos secundarios producidos en condiciones de laboratorio por esta cepa es mucho menor (Bentley *et al.*, 2002). Posteriormente, con el aumento del número de genomas de *Streptomyces* secuenciados, se observó que esto era algo común en este género. El estudio de más de mil genomas de *Streptomyces* mostró un promedio de entre 35 y 40 BGCs por genoma (Belknap *et al.*, 2020) (Figura 2).

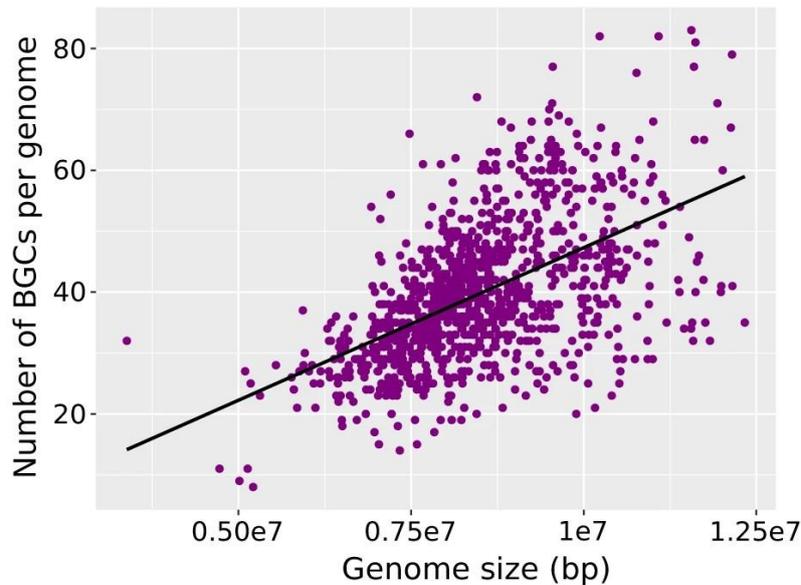


Figura 2. Relación entre el tamaño del genoma y el número de BGCs totales identificados por cada genoma (Belknap *et al.*, 2020).

Debido a esto, es razonable que el género *Streptomyces* sea el productor de más de dos tercios de los metabolitos secundarios de importancia médica y agrícola (Lee *et al.*, 2019; van Bergeijk *et al.*, 2020). Así, desde que hace 80 años se descubriera la estreptomicina, el primer antibiótico conocido producido por *Streptomyces*, se han descubierto muchos otros compuestos con actividad antibacteriana producidos por estas bacterias, como el cloranfenicol, la oleandomicina, las tetraciclinas, la lincomicina y la daptomicina, entre muchos otros. Así como compuestos antiparásitarios, como las avermectinas y las milbemicinas; compuestos antifúngicos como la anfotericina B y la nistatina; antitumorales como los diferentes compuestos del grupo de las antraciclinas; y los compuestos inmunosupresoras FK506 y rapamicina (Demain y Sánchez, 2009; Mahajan y Balachandran, 2012; Procópio *et al.*, 2012; Wink *et al.*, 2017). Muchos de estos metabolitos secundarios bioactivos aún son usados en clínica (Figura 3).

Tras el descubrimiento de estos metabolitos, el número de compuestos producidos por *Streptomyces* ha seguido creciendo, revelando no solo nuevos compuestos, sino variaciones de algunos ya descritos que pueden presentar una mejora de la bioactividad del compuesto original. Por ejemplo, los antibióticos formicamicinas y streptovermicinas, son modificaciones de las fansamicinas con mayor actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y a *Enterococci* resistente a vancomicina (VRE) (Qin *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020). Gracias



a las diferentes estrategias disponibles para el descubrimiento de nuevos compuestos y a la versatilidad del metabolismo secundario del género *Streptomyces*, actualmente se siguen obteniendo derivados de compuestos existentes y nuevos compuestos en este género de bacterias (Alam *et al.*, 2022, Chen *et al.*, 2021; Donald *et al.*, 2022; Lacey y Rutledge, 2022; Subramani y Sipkema, 2019).

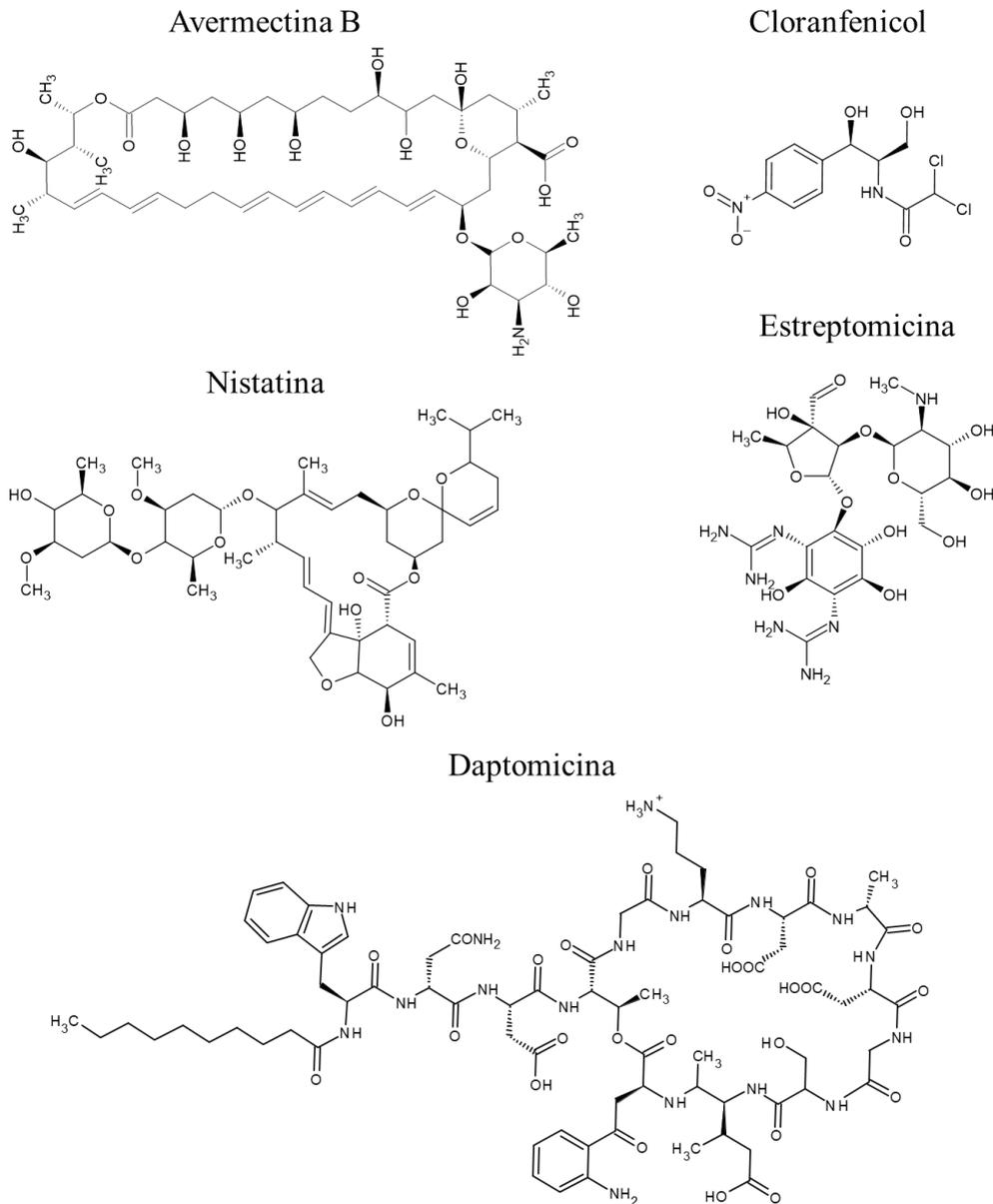


Figura 3. Estructuras químicas de compuestos bioactivos producidos por *Streptomyces*.



1.1.2.1. Las agrupaciones de genes de biosíntesis

La biosíntesis de los metabolitos secundarios está codificada por los BGCs, un conjunto de genes que actúan de manera coordinada y que usualmente se encuentran agrupados y con una compleja regulación (Olano *et al.*, 2011). En los BGCs podemos encontrar una amplia variedad de genes:

Genes estructurales: son la mayoría de los genes del BGC y codifican enzimas que participan en el proceso de biosíntesis. Encontramos entre ellos diferentes tipos.

- Los genes de biosíntesis de unidades precursoras, que biosintetizan precursores que no pueden ser aportados por el metabolismo primario, y que sirven como unidad iniciadora o de extensión del compuesto final.
- Los genes de biosíntesis estructural, que son genes involucrados en el ensamblaje de estas unidades iniciadoras. En este grupo de genes se incluyen las sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y las policétidos sintetasas (PKS).
- Los genes de modificaciones de elementos estructurales, que son genes que codifican enzimas que permiten la modificando del núcleo estructural. Entre ellas encontramos las transferasas, peroxidadasas, halogenasas, reductasas, oxigenasas o las deshidrogenasas.

Genes reguladores: genes que controlan la expresión de los genes de biosíntesis, pudiendo encontrarse tanto reguladores positivos de la familia de reguladores SARP (*Streptomyces Antibiotic Regulatory family Protein*), como reguladores negativos de la transcripción como las familias TetR, LysR y GntR (Xia *et al.*, 2020).

Genes de resistencia: genes involucrados en la autodefensa del microorganismo productor, de tal forma que los compuestos producidos por el propio organismo no lo dañen o maten.

Genes de transporte: genes que codifican proteínas que participan en distintos sistemas de transporte como los sistemas de intercambio de protones/sodio, o los transportadores del tipo ABC (*ATP Binding Cassette*). Dentro de estos se incluyen



sistemas de secreción del compuesto final que funcionan como un mecanismo de resistencia.

Existen diversos tipos de BGCs según el compuesto final sintetizado. De los más frecuentes en el caso de *Streptomyces*, están los BGCs para terpenos, metalóforos o sideróforos, péptidos no ribosomales (NRPs), policétidos (PKs) y RiPPs (péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente) (Wenski *et al.*, 2022).

1.1.2.1.1. Péptidos sintetizados no ribosomales (NRPS)

La síntesis de NRPs está codificada por unas megaenzimas llamadas NRPS. Estos NRPs son metabolitos secundarios que en muchas ocasiones son bioactivos. Algunos metabolitos secundarios de *Streptomyces* sintetizados gracias a NRPS son la valinomicina, un antiviral para el tratamiento del coronavirus de tipo 2; el antibiótico actinomicina; vancomicina; y daptomicina; o el tripéptido fosfomicina con poder herbicida (Cheng, 2006; Jones, 1987; McCormick *et al.*, 1995; Miao *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2004). A diferencia de la ruta clásica ribosomal para la generación de péptidos, las enzimas NRPS no usan necesariamente aminoácidos proteínogénicos, sino que pueden utilizar una larga lista de aminoácidos que han sido modificados por metilación o halogenación, así como α -hidroxiácidos y α -cetoácidos, cadenas alifáticas, ácidos aminobenzoicos y heterociclos entre cientos de posibilidades, contribuyendo a la versatilidad estructural de los compuestos finales y por tanto de sus actividades biológicas (Süssmuth y Mainz, 2017).

Las NRPS se consideran megaenzimas no solo por su tamaño sino por la presencia de diferentes módulos con dominios en su estructura. Estos dominios presentan funciones determinadas y que actúan de forma conjunta (Marahiel, 2016; Strieker *et al.*, 2010). La organización mínima que se espera en una NRPS es un dominio de adenilación (A), uno de tiolación o PCP (*Peptidyl Carrier Protein*) y normalmente otro de condensación (C). El primer módulo en actuar suele carecer del dominio C, a menos que sea de tipo *C-starter* (Cs). Esto sucede en la biosíntesis lipopéptidos como la surfactina o la daptomicina, donde el dominio Cs inicia la condensación con una cadena policétida (Kraas *et al.*, 2010; Wittmann *et al.*, 2008). Además, el último módulo de la NRPS suele



acabar con un dominio tioestera (TE) que permite la liberación del compuesto (Strieker *et al.*, 2010).

El proceso de síntesis de la NRPS comienza con la selección y activación de un sustrato concreto de los anteriormente mencionados (Süssmuth y Mainz, 2017). Este proceso se lleva a cabo en el dominio A, en cuyo extremo C-terminal se encuentra el dominio hidrofóbico encargado de la especificidad de sustrato. Este dominio se denomina también *binding pocket* y permite activar al sustrato gastando ATP y dando lugar a un aminoacil-AMP. Con esta activación el dominio A pasa de conformación abierta a cerrada (Strieker *et al.*, 2010; Weissman, 2015). Es en ese momento cuando el sustrato activado pasa al dominio PCP encargado de la prolongación del péptido, permitiendo que el dominio A vuelva a conformación abierta (Figura 4A). En el PCP, el aminoacil-AMP se une al grupo tiol ($-SH$) del cofactor fosfopanteteína (Ppant), formando un aminoacil tioéster. A su vez, el Ppant está unido a un residuo de serina que se encuentra altamente conservado en los PCP (Strieker *et al.*, 2010). El aminoacil tioéster que se encuentra en el PCP es traslocado al dominio C. Es este dominio C quien genera un enlace peptídico entre la molécula en formación y el siguiente aminoacil-AMP. Este segundo aminoacil-AMP se encontraría ya unido al PCP del segundo módulo, habiendo sido previamente activado por el dominio A del segundo módulo. De esta forma se va extendiendo la cadena peptídica (Marahiel, 2016). Este proceso puede repetirse tantas veces como módulos haya y hasta llegar al último donde se encuentra el dominio TE. Este dominio TE realiza la liberación de la cadena peptídica mediante dos reacciones. En primer lugar, transfiere el aminoacil tioéster unido al último PCP al sitio activo del propio dominio TE, en la mayoría de los casos a un residuo conservado de serina, pero también se ha visto que puede hacerlo a un residuo de cisteína (Süssmuth y Mainz, 2017). Y la segunda reacción que realiza es la liberación del péptido, por hidrólisis o por ciclación (Kopp y Marahiel, 2007; Strieker *et al.*, 2010) (Figura 4B).

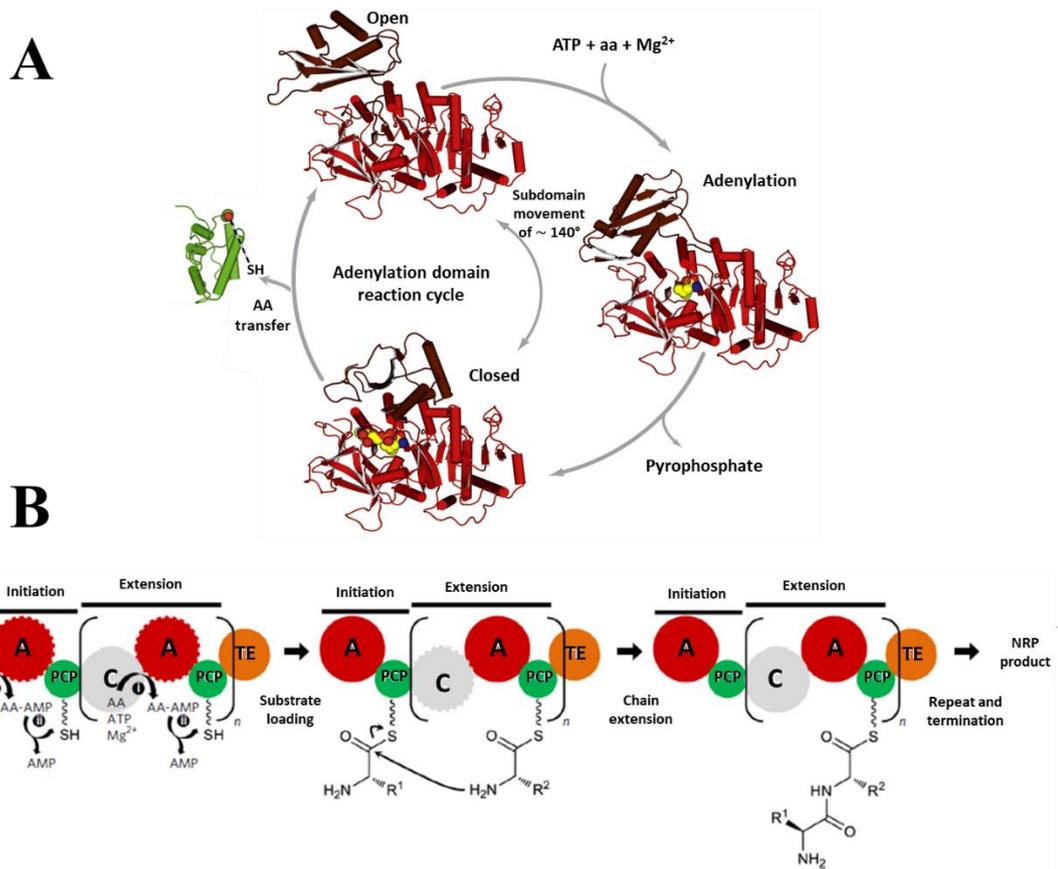


Figura 4. Esquemas del funcionamiento de una NRPS. **A:** Mecanismo de alternancia de dominios de adenilación de una NRPS. **B:** Mecanismo general y organización de una NRPS. **AA:** aminoácido; **A:** dominio de adenilación; **PCP:** dominio de tiolación; **C:** dominio de condensación; **TE:** dominio tioesterasa. Modificado de Weissman (2015).

Además, en algunos casos los módulos de las NRPS pueden contener otros tipos de dominios adicionales. Estos dominios realizan modificaciones determinadas en los diferentes sustratos que se van añadiendo a la cadena peptídica. Así, podemos encontrar dominios de diferentes tipos de metilaciones (O-, S-, N- y C-), dominios de epimerización, de formilación, de ciclación, de oxidación, de reducción, entre otras actividades (Süssmuth y Mainz, 2017). También pueden existir otras enzimas, aparte de las propias NRPS, que realizan alguna acción sobre la molécula que se va sintetizando o que tienen alguna influencia sobre la NRPS. Así, vemos que no siempre es necesaria la presencia del dominio TE, ya que una tioesterasa adicional podría cumplir este papel o que hay pequeñas proteínas llamadas tipo MbtH, que se asocian no covalentemente al dominio A y que en algunos casos son esenciales para el funcionamiento de la NRPS (Felnagle *et al.*, 2010).



1.1.2.1.2. Policétido sintasa (PKS)

Las PKS son macroenzimas multifuncionales con grandes variaciones en sus estructuras, responsables de la biosíntesis de policétidos. Algunos metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* que son sintetizados por PKS son el antihelmíntico avermectina; el antitumoral doxorubicina; el antifúngico nistatina; o el antibiótico eritromicina (Burg *et al.*, 1979; Grimm *et al.*, 1994; Hazen y Brown, 1950;; McGuire *et al.*, 1952). Estas macroenzimas seleccionan unidades de acilo que presentan el grupo carboxilo activado (acetil-CoA, malonil-CoA, metilmalonil-CoA) como unidades iniciadores y alargadoras para la biosíntesis (Fischbach y Walsh, 2006). Las enzimas PKS se organizan por módulos y dominios. Generalmente presentan un dominio de activación del sustrato o acil-transferasa (AT), un dominio que porta el compuesto en extensión (ACP) y un dominio de unión de las unidades o cetosintasa (KS) (Weissman, 2015).

La biosíntesis por PKS comienza con la selección de una unidad de acil-CoA que se transfiere al ACP del primer módulo, concretamente al grupo prostético Ppant de la ACP. Posteriormente, el dominio KS se acila con la unidad iniciadora que se encuentra en el ACP del primer módulo, y realiza una condensación descarboxilativa de tipo Claisen con la unidad de extensión presente en el ACP del segundo módulo. Esta unidad extensora previamente ha sido reconocida por el AT del segundo módulo. Se produce así la extensión de la cadena policetónica. Finalmente, el último módulo contiene un dominio tioesterasa (TE), que libera la cadena y da lugar al producto policetónico final (Fischbach y Walsh, 2006). También podemos encontrar dominios adicionales que ocasionan modificaciones durante la extensión de la cadena, como por ejemplo dominios cetorreductasas, dominios deshidratasa y dominios enoilreductasa (Weissman, 2015) (Figura 5).

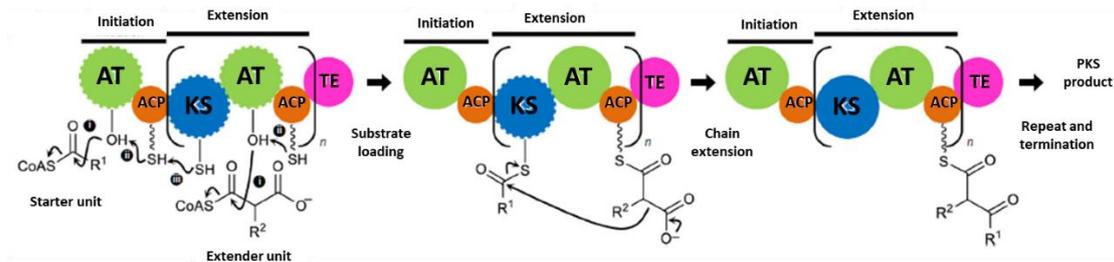


Figura 5. Esquema del mecanismo general y la organización de una PKS. **AT:** dominio aciltransferasa; **ACP:** dominio transportador de acilos; **KS:** dominio cetosintasa; **TE:** dominio tioesterasa. Modificado de Weissman (2015).

Las enzimas PKS se dividen en tres tipos (Figura 6) (Lim *et al.*, 2016).

Las PKS tipo I que son codificadas por un mismo gen y cada uno de los módulos realiza una condensación carboxililativa, por lo que se dice que actúan en cis. Las hay con múltiples módulos que actúan secuencialmente, realizando cada módulo una adición a la cadena policetílica, o también las hay con un único módulo con dominios que actúa de forma iterativa, en el que el único módulo repite los pasos de síntesis del policétido (Figura 6A y B).

Las PKS tipo II cada dominio del módulo es codificado por diferentes genes, por lo que estos dominios se encuentran separados e interactúan entre sí, a esto se le denomina actuar en trans (Figura 6C).

Las PKS tipo III son enzimas homodímeras de pequeño tamaño que no necesitan un dominio ACP y que usan malonil-CoA como unidad iniciadora (Figura 6D).

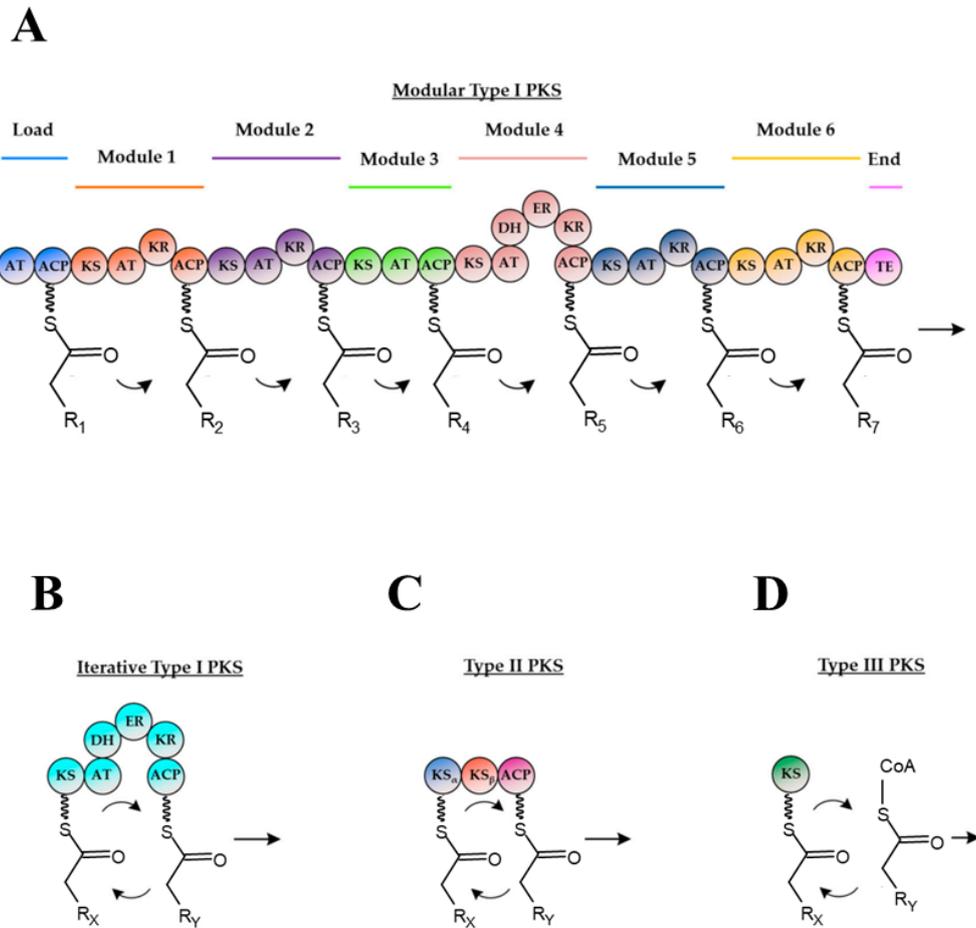


Figura 6. Esquema de los tipos de PKS. **A:** PKS tipo I con varios módulos. **B:** PKS tipo I con un único módulo. **C:** PKS tipo II. **D:** PKS tipo III. AT: aciltransferasa; ACP: transportador de acilos; KS: cetosintasa; KR: cetorreductasa; DH: deshidratasa; ER: enoilreductasa; TE: tioesterasa. Lim *et al.* (2016).

2. Necesidad de nuevos compuestos naturales y bioactivos

En la actualidad es indiscutible la necesidad de desarrollar nuevos fármacos por varias razones. Así, el 70 % de las bacterias patógenas son resistentes a al menos uno de los antibióticos que se conocen actualmente (Bérdy, 2012). Y no solo eso, sino que la aparición de bacterias multirresistentes a antibióticos de uso clínico, como por ejemplo MRSA y VRE, que pueden incluso producir *biofilms* dificultando su tratamiento, es un significativo problema de salud pública. Tan solo en España, en el año 2023 la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMEC) reveló el fallecimiento de más de veinte mil pacientes tras ser diagnosticados con una infección



por una bacteria multirresistente, de las más de ciento cincuenta mil infecciones detectadas por este tipo de bacterias.

Algo similar pero a menor escala ocurre con las infecciones fúngicas cuya prevalencia ha aumentado, y como con cualquier otra infección existe el indeseado efecto colateral de la aparición de resistencias, aunque es menos frecuente. Sin embargo, en las micosis sistémicas el tratamiento es complejo independientemente de la presencia o ausencia de resistencias, sumado a los efectos tóxicos de los fármacos antifúngicos que también afectan a las células humanas (Cuenca-Estrella, 2010). Además, los casos en los que la infección deriva en la producción de *biofilms*, los antifúngicos comerciales presentan menor actividad, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos para estos casos clínicos es de vital importancia (Butassi *et al.*, 2021).

Sin embargo, no solo es necesaria la búsqueda de compuestos con actividad antibiótica o antifúngica, sino que el resto de las actividades también son de interés, pues aún aparecen nuevas patologías que son intratables y que requieren del diseño de tratamientos específicos. Así como también existen enfermedades con tratamientos que no son siempre exitosos o que son inespecíficos en muchos casos, como es el cáncer. Este caso en particular, en los últimos tiempos, se ha presentado como un problema para los países desarrollados, donde es la principal causa de morbi-mortalidad, pues el aumento de la esperanza de vida, así como de los hábitos sedentarios, la exposición al sol, y el consumo de alcohol y tabaco, han derivado en el aumento continuado de la mortalidad por esta enfermedad. Es por ello por lo que en 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró casi diez millones de defunciones a causa de esta enfermedad en el mundo, mientras que la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) advierte de que en 2024 se alcanzarán los casi doscientos ochenta y siete mil casos en España. Estas estadísticas sumadas a la inespecificidad de muchos de los fármacos antitumorales disponibles actualmente, en parte debido a la gran cantidad de diferentes tipos de tumores existentes, además de los efectos secundarios de los tratamientos que ocasionan toxicidad sobre las células sanas con la consecuente repercusión sobre el paciente, generan la necesidad de buscar compuestos con mayor especificidad y eficacia que presenten menos efectos secundarios (Olano *et al.*, 2011). Todas estas son las razones por las que existen numerosos estudios enfocados en la búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividad antitumoral, así como revisiones que las compilan, haciéndolos ver como



prometedores tratamientos para esta enfermedad (Alves *et al.*, 2018; Montuori *et al.*, 2022; Sawadogo *et al.*, 2015).

Además, la búsqueda de compuestos naturales bioactivos se ha comenzado a priorizar frente a compuestos sintéticos, puesto que los compuestos naturales presentan una gran diversidad y complejidad estructural, lo que los hace en general más específicos bioquímicamente y con mayor eficiencia y afinidad en la unión e interacción con sus dianas frente a compuestos sintéticos, siendo mejores opciones para ser usados en clínica (Alves *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2014).

De esta manera, los compuestos naturales producidos por los microorganismos han sido y son una de las mayores fuentes de compuestos bioactivos. Se conocen alrededor de quinientos mil compuestos naturales. Sin embargo, tan solo entorno a sesenta mil son bioactivos y aunque la mayoría de ellos son producidos por plantas (veinte cinco mil), la segunda mayor fuente son las bacterias (diecinueve mil) y más de la mitad de estos compuestos bioactivos son producidos por el género de bacterias *Streptomyces* (Bérdy, 2012). Estos datos y posteriores revisiones colocan a *Streptomyces* como un gran nicho de compuestos naturales de interés (Donald *et al.*, 2022).

La aportación de *Streptomyces* al ámbito clínico inicia en 1944 con el descubrimiento de la estreptomycinina y continúa durante largos años que han sido denominados “La Era Dorada”. En ella se aportaron metabolitos bioactivos que aún se siguen usando en clínica (Demain y Sánchez, 2009; Procópio *et al.*, 2012). Las herramientas clásicas utilizadas en la búsqueda de estos compuestos consistieron en cribados fenotípicos, aislamiento y caracterización estructural, para posteriormente realizar ensayos de bioactividad con dichos compuestos. Sin embargo, llega un punto en el que el descubrimiento de estos compuestos en *Streptomyces* se ve menguado o se produce continuamente el reaislamiento de compuestos ya descritos (Katz y Baltz, 2016). Por ello a estas técnicas clásicas debieron sumársele nuevas herramientas que ampliaran el rango de búsqueda de compuestos naturales y bioactivos. Estas estrategias se recogen en la Figura 7 y se expondrán en los siguientes apartados.



2.1. Exploración de nuevos nichos

Como se ha mencionado con anterioridad el género *Streptomyces* en un género bacteriano ubicuo que además puede formar relaciones de mutuo beneficio con otras especies. Su aislamiento de diferentes ambientes ha aportado múltiples compuestos de interés, como la daptomicina D producida por *S. roseosporus* aislado del monte más alto de Turquía (Miao *et al.*, 2005). Sin embargo, muchos ambientes terrestres y sobre todo marinos, además de ambientes inhóspitos, han sido escasamente explorados. Por lo tanto, actualmente el número de especies de *Streptomyces* que se conocen, (1.309 en Julio de 2024 <http://www.bacterio.net/Streptomyces.html>), son solo una pequeña parte de todos los que aún hay por descubrir.

La exploración de nuevos nichos en busca de nuevas especies es una herramienta que permite el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con posibles bioactividades. El interés por la exploración de nuevos nichos está a la orden del día y así, son múltiples los artículos de revisión dedicados a ello (Bull y Goodfellow, 2019; Diarra *et al.*, 2024; Hui *et al.*, 2021). Por mencionar algunas de las muchas nuevas moléculas encontradas gracias a estos estudios, están la caboxamicina, un benzoxazol con actividad antibiótica producido por *Streptomyces sp.* NTK 937 aislado del fondo oceánico (Losada *et al.*, 2017); las abenquininas, que tiene gran potencial como agentes antiinflamatorios, producidas por *Streptomyces sp.* DB634, aislado de la sal del desierto de Atacama en Chile, un lugar con tal nivel de radiación UV que puede ser comparado con el planeta Marte (Schulz *et al.*, 2011); los compuestos antibióticos, PVI401 y PVI402, con actividad contra MRSA, producidos por *Streptomyces pharmamarensis* ICN40, un simbionte de una esponja marina (Joseph *et al.*, 2017); dos nuevos miembros de la familia de las macrolactámicos (sipanmicinas A y B) y un nuevo grupo de compuestos llamados colibrimicinas aislados todos ellos de *Streptomyces sp.* CS149 perteneciente a la colección CS, aislada de las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini, con las que esta colección de *Streptomyces* mantienen una relación mutualista (Malmierca *et al.*, 2018; Prado-Alonso *et al.*, 2022).

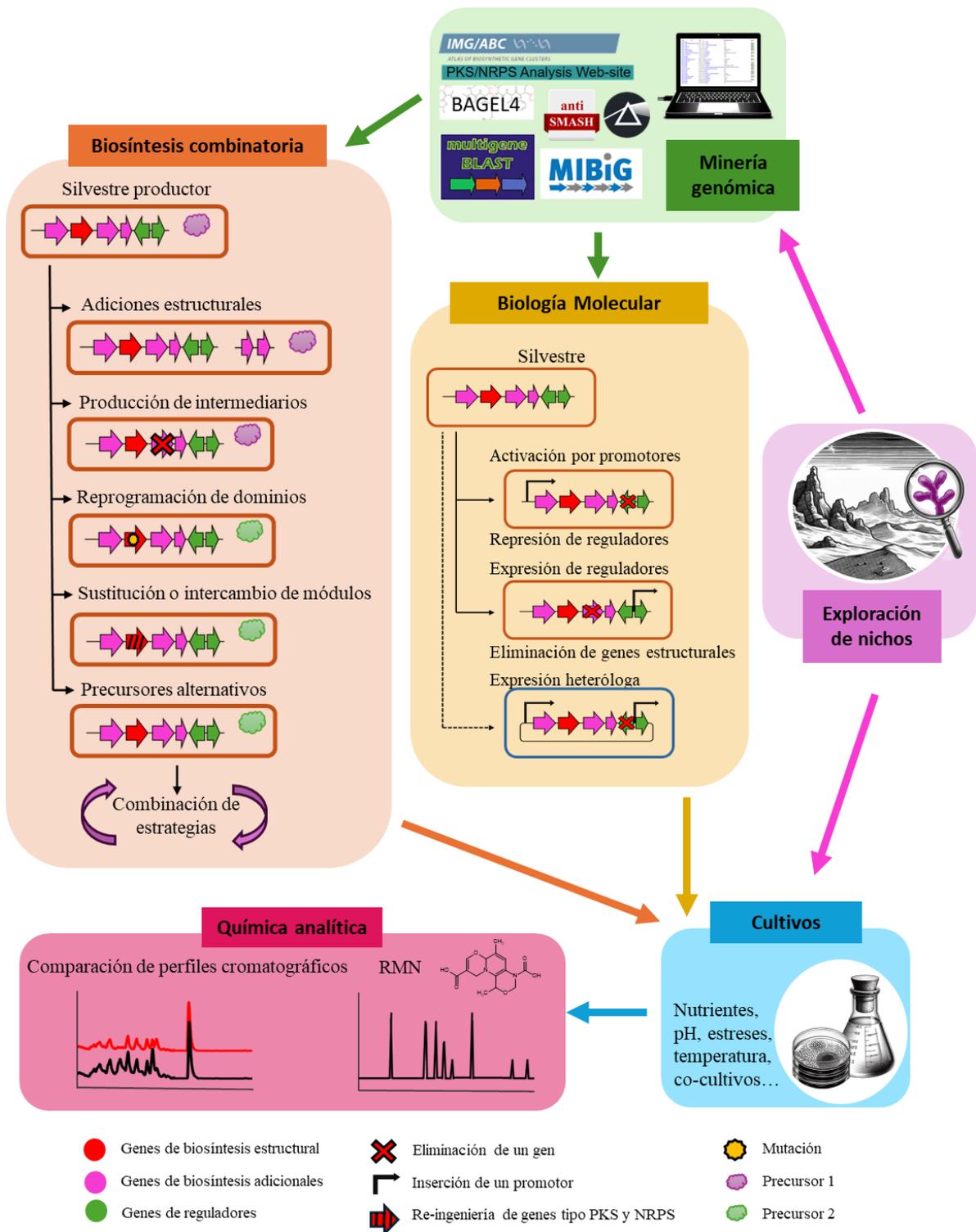


Figura 7. Esquema general de las estrategias y técnicas descritas en este trabajo para el descubrimiento de metabolitos secundarios.



2.2. Modificación de las condiciones de cultivo y co-cultivos

Muchos de los BGCs en *Streptomyces* se encuentran silenciados bajo condiciones de laboratorio y los medios usualmente ricos en nutrientes utilizados en laboratorio no son adecuados para la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*. Al contrario, la modificación en las condiciones de cultivo es por tanto una herramienta utilizada para la producción de metabolitos secundarios en este caso. La modificación de nutrientes, de pH, temperatura y someter a diferentes estreses ambientales y nutricionales puede lograr obtener distintos compuestos a partir de la misma cepa, ya que las fuentes de fosfato, carbono y nitrógeno juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo y los estreses nutricionales y ambientales crean respuesta a nivel de reguladores globales que modifican el metabolismo y la producción de estos metabolitos (Martín y Liras, 2010).

Los co-cultivos son otra estrategia que permite la producción de nuevos compuestos. Estos cultivos generan un ambiente más similar al natural ya que permiten que cohabiten distintas combinaciones de microorganismos imitando interacciones dentro de comunidades microbianas naturales. Esto puede hacer que se activen diferentes rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios por interacciones químicas o físicas entre las especies (Cuervo *et al.*, 2022; Liu y Kakeya, 2020).

2.3. Minería genómica

Desde principios de la década de los 2000 la minería genómica surgió como una herramienta de gran valor para la búsqueda de compuestos naturales bioactivos gracias a la detección de BGCs. La minería genómica puede ser definida como el conjunto de estrategias informáticas que permite la búsqueda y predicción *in silico* de BGCs presentes en los genomas de microorganismos y que se pueden asociar con la biosíntesis de compuestos naturales, gracias al conocimiento previamente adquirido sobre el metabolismo secundario (Albarano *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020; Meena *et al.*, 2024). Los avances en la secuenciación de los genomas de *Streptomyces*, así como el aumento y mejora de los algoritmos y programas bioinformáticos, que pueden ser usado en minería genómica, han permitido el descubrimiento de un considerable número de compuestos naturales (Lee *et al.*, 2020).



Existen multitud de programas que pueden ser usados en minería genómica, muchos de ellos se centran en la localización y análisis de los genes que codifican enzimas modulares tipo NRPS y PKS que suelen caracterizar a algunos de los BGCs (Albarano *et al.*, 2020). En relación con estos tipos de genes existen programas que se centran en la predicción de los dominios de adenilación de las enzimas NRPS y acetiltransferasa de las PKS resultantes, como *NRPSpredictor2K*, y por tanto, dan predicciones de las estructuras sintetizadas por las mismas (Röttig *et al.*, 2011). También, los hay cuyo análisis es más exhaustivo pudiendo predecir los diferentes módulos y actividades que contendrían las enzimas tipo NRPS y PKS, como *PKS/NRPS Analysis Web-site* (Bachmann y Ravel, 2019). En ambos casos, dando información para la predicción de los compuestos codificados por el BGC. Existen también programas que permiten la predicción de BGCs completos como PRISM (*PRediction Informatics for Secondary Metabolomes*) o antiSMASH (*Antibiotic and Secondary Metabolites Analysis Shell*) (Blin *et al.*, 2023; Skinnider *et al.* 2015). Estos programas no solo aportan información sobre los genes tipo NRPS y PKS que suelen caracterizar a los BGCs, sino también de los genes adyacentes, permitiendo la delimitación del BGC o una aproximación a ella. Además, no solo se centran en BGCs con este tipo de genes, sino que en el caso de antiSMASH diferencia hasta un total de 81 tipos diferentes de BGCs, mientras que PRISM diferencia entre 22 tipos distintos. También, existen programas que permiten la búsqueda específica de un tipo de BGC y las estructuras de los compuestos codificadas por los mismos, como sería BAGEL4 (BACTERIOCIN GENOME mining tool) y RiPPs-miner (Agrawal *et al.*, 2017; van Heel *et al.*, 2018). Estos son programas específicos para los BGCs de tipo RiPPs, responsable de la biosíntesis de pequeños péptidos resultantes de un péptido mayor, que ha sido alterado post-traduccionalmente por diferentes enzimas presentes en el BGC. Otras herramientas como MultiGeneBlast permiten realizar búsquedas por homologías de diferentes BGCs en lugar de genes individuales (Medema *et al.*, 2013). También existen bases de datos de libre acceso donde se recoge información detallada sobre los diferentes BGCs ya descritos, como MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster*), que es usada por lo propios algoritmos de los diferentes programas utilizados en minería genética para ayudarse en sus predicciones (Terlouw *et al.*, 2023). Y finalmente, IMG-ABC (*Integrated Microbial Genomes Atlas of Biosynthetic gene Clusters*) una base de datos que combina tanto BGCs verificados experimentalmente como predichos (Palaniappan *et al.*, 2019).



Este conjunto de herramientas permiten detectar los BGCs presentes en un genoma, pero además permite centrar la búsqueda en aspectos de interés según los criterios de búsqueda (Kumar *et al.*, 2024). Así, encontramos que es una herramienta de utilidad para la detección de BGCs silenciosos o de baja expresión en condiciones de laboratorio y cuyos productos resultantes son, en su mayoría, crípticos. Algunos criterios útiles de búsqueda para la detección de estos BGCs nuevos, sería la localización de genes de resistencia o genes que codifiquen proteínas reguladoras de antibióticos; la identificación de genes claves de una ruta de biosíntesis, como genes involucrados en la biosíntesis de grupos funcionales inusuales o genes de biosíntesis de unidades iniciadoras de interés.

En los últimos años la minería genómica ha permitido identificar numerosos BGCs nuevos. Sin embargo, tras la predicción es necesario siempre un laborioso trabajo de laboratorio en el que se combinan diferentes estrategias y técnicas de biología molecular, ya que es usual que la mayoría de los BGCs no se expresen o se expresen poco en condiciones de laboratorio. Además, en muchos casos los productos finales son desconocidos o crípticos. Por lo que hay muchos BGCs, y sus productos, que aún no han sido identificados (Hoskisson y Seipke, 2020).

Aunque prometedora y efectivamente útil, la minería genómica presenta limitaciones como cualquier técnica, principalmente resultado de utilizar bases de datos para realizar las comparaciones y predicciones, por lo que no es posible localizar BGCs que presenten mecanismos enzimáticos totalmente diferentes a los ya descritos. Y por otro lado, la problemática derivada de la calidad de los genomas utilizados para los estudios. La obtención de secuencias genómicas de buena calidad que permita un ensamblaje eficiente es crucial para un estudio efectivo usando esta técnica. Los genomas de *Streptomyces* debido a su característico alto porcentaje de CG y las secuencias repetitivas que contienen, son difíciles de secuenciar con las técnicas usualmente utilizadas en secuenciación. Esto sumado a las dificultades de ensamblar secuencias de genes tipo NRPS y PKS por sus largas y repetitivas secuencias, dificulta la obtención de secuencias de alta calidad (Baltz, 2021; Lee *et al.*, 2020). Así, de los más de 6.200 genomas depositados en NCBI de este género, poco más de 900 se encuentran etiquetados como completos, lo que equivale a menos del 15% (datos de julio 2024) y aunque los datos han mejorado con respecto a años anteriores (11,3% en julio de 2020 según Baltz,



2021) aún es un porcentaje bajo. Finalmente, los programas bioinformáticos que pueden proponer estructuras preliminares de los compuestos codificados por un BGC, como antiSMASH o PRISM, no suelen obtener predicciones de alta fiabilidad.

2.3.1. Activación de BGCs

Como se ha mencionado anteriormente, muchos de los BGCs identificados no se expresan o se expresan poco, lo que hace imposible identificar el compuesto que codifican. En estos casos es necesario activar el BGC o incrementar su expresión. Algunas de las estrategias para activar o incrementar la expresión de BGCs se han mencionado anteriormente como la utilización de co-cultivos o modificaciones en la condiciones de cultivo, pero también existen muchas otras, algunas de las cuales se mencionan a continuación.

Utilización de promotores de expresiones de constitutiva.

En la regulación transcripcional el promotor del gen es una parte esencial pues contiene el sitio de unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción, por lo que utilizar promotores de expresión constitutiva es una buena forma de activar BGCs. En *Streptomyces* no todos los promotores generalmente utilizados en microbiología son aptos. El principal y más usado es el promotor *ermE** derivado del promotor del gen de resistencia a eritromicina *ermE* de *Saccharopolyspora erythraeus*, al que se le han eliminado tres nucleótidos en la región *ermEp1* (Schmitt-John y Engels, 1992). Otras alternativas con tan buen resultado como el promotor *ermE** son los promotores *SF14P* y *kasOP*, promotores de la familia de reguladores SARP de *S. ghanaensis* y *S. coelicolor*, respectivamente (Labes *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2013).

Expresión y represión de genes reguladores.

No es inusual encontrar genes reguladores dentro de los BGCs que permiten la activación o la represión de los genes de biosíntesis de dichos BGCs. Por ello, la sobreexpresión de genes que codifique activadores o la eliminación de genes que codifique represores son buenos métodos para la activación de los BGCs para mejorar la producción de los compuestos que codifican (Xia *et al.*, 2020).



Las familias de reguladores SARP, PAS-LuxR y LAL, son usualmente activadores y su sobreexpresión ha mostrado la activación o el aumento de la expresión de diferentes BGCs. Así, la sobreexpresión del gen *nemR* (familia LAL) en *S. cyaneogriseus* incrementa considerablemente la producción del antibiótico nemadectina, una lactona macrocíclica (Li *et al.*, 2019). O como la expresión del gen *otcR*, que codifica un regulador de la familia SARP, es indispensable para el funcionamiento del BGC responsable de la síntesis de oxitetraciclina, un antibiótico de amplio espectro comercial producido por *S. rimosus* (Yin *et al.*, 2015).

Por otro lado la inactivación de genes represores, como suelen serlo los de las familias TetR, GntR y LysR, ampliamente distribuidos en el genoma de *Streptomyces*, pueden derivar en la activación de BGCs. Como por ejemplo en *S. scabies*, donde la inactivación de un gen *tetR* permitió la expresión del BGC de piochelina (Seipke *et al.*, 2011). En algunos casos la eliminación de estos genes puede mejorar la producción del compuesto, como en *S. platensis*, donde la eliminación del gen *ptmR1*, miembro de la familia GntR, aumentó la producción de los antibióticos platensimicina y platensin alrededor de cien veces más respecto a la cepa silvestre (Smanski *et al.*, 2009).

Expresión heteróloga

Para aquellos BGCs que no pueden ser expresados en condiciones de cultivo estándar de laboratorio, una forma de estudiarlos es clonándolos para posteriormente expresarlos en otra cepa hospedador. Normalmente la expresión heteróloga de BGCs activos en la cepa parental suele ser más exitosa que las de BGCs silenciosos, por lo que en este último caso podría requerirse de algunas manipulaciones genéticas adicionales, pero sigue siendo una técnica usada con éxito (Jones *et al.*, 2013; Komatsu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016).

Existen una serie de vectores lanzadera de *Escherichia coli-Streptomyces* para la construcción de bibliotecas genómicas y la expresión de genes heterólogos. Las metodologías para la generación de las construcciones finales son variadas: digestión más ligación; ensamblajes múltiples usando la metodología Gibson; combinaciones de esto junto con el método CRISPR/Cas9; transformación asociada a recombinación (TAR) usando levaduras; clonación vía directa (DiPaC) donde una polimerasa de alta fidelidad permite la amplificación de grandes fragmentos para posteriormente ensamblarlos por



método Gibson, entre otras opciones posibles. Normalmente se utilizan como hospedadores cepas modificadas de las especies *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. avermitilis* y *S. albus* (Xu y Wright, 2019).

2.3.2. Identificación de compuestos codificados por BGCs

Para identificar el compuesto codificado por un BGC, generalmente se recurre a la generación de un mutante en dicho BGC, para posteriormente comparar su perfil metabólico con el de la cepa silvestre por técnicas cromatográficas, HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) o UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), e identificar los compuestos diferenciales (Ahmad *et al.*, 2020; Bucar *et al.*, 2013). Después se deben purificar dichos compuestos en cantidades suficientes para realizar su análisis estructural, generalmente, por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Breton y Reynolds, 2013; Krug y Müller, 2014; Reynolds y Enríquez, 2022). Normalmente se procede a la inactivación de un gen estructural de la ruta de biosíntesis, generando un mutante deficiente en dicho gen, por lo que la ruta queda interrumpida y el producto final del BGC no puede ser producido. De esta forma cuando los perfiles metabólicos de la cepa silvestre y el mutante deficiente son comparados por cromatografía, se revela la ausencia de producción en el mutante y esto permite localizar el compuesto en la cepa silvestre. Será de esta cepa de donde posteriormente se podrá obtener dicho compuesto gracias a diferentes técnicas de purificación. Gracias a esta estrategia fueron identificadas las argimicinas mediante la inactivación del gen *arpPIII*, que codifica una PKS de tipo I, y se descubrió el BGC críptico responsable de la biosíntesis de diperamicina, al inactivar el gen *dpnS2* o el gen *dpnZ*, un gen tipo NRPS y un gen que codifica una Piperazato Sintasa respectivamente (García-Gutiérrez *et al.*, 2024; Ye *et al.*, 2017).

2.4. Biosíntesis combinatoria

La biosíntesis combinatoria hace uso de técnicas de ingeniería genética con las que aprovecha al máximo la maquinaria biosintética y la versatilidad en el metabolismo secundario de las bacterias, permitiendo rediseñar o reprogramar rutas de biosíntesis. Gracias a esto se generan tanto nuevos productos naturales, como modificaciones de los productos nativos que pueden presentar propiedades mejoradas (Ruijne y Kuipers, 2021;



Yñíguez-Gutierrez y Bachmann, 2019). Existen varias estrategias de biosíntesis combinatoria que se pueden utilizar para generar nuevos compuestos y que además pueden combinarse entre ellas, como (i) la inactivación de genes para generara mutantes que presenten bloqueos en la ruta y que acumulan intermediarios diferentes y de interés; (ii) la expresión de genes de biosíntesis específicos procedentes de otros BGCs que permitan introducir modificaciones en las moléculas nativas, generando combinaciones únicas y nuevos compuestos; (iii) la sustitución de unidades estructurales nativas del compuesto por otras que han sido añadidas por *feeding*, si la flexibilidad de sustrato de las enzimas de la ruta lo permiten, (Chen et al., 2017; Olano *et al.*, 2009; Olano *et al.*, 2011); (iv) la mutasíntesis, en la que se combina la mutación de genes como, los genes que codifican NRPS y PKS y que afectan a los *binding pocket* de las NRPS y al motivo AT de la PKS, con la adición de un sustrato, por lo que se puede forzar la selección de un sustrato diferente al nativo por parte de esta enzimas; (v) la reingeniería de los genes que codifican NRPS o PKS de una línea de ensamblaje completa, ya sea por sustitución o intercambio de los módulos de dichas enzimas, aunque las interacciones entre los diferentes dominios del módulo deben ser tomadas en cuenta para determinar cuales serían las combinaciones óptimas; (vi) la adicción de dominios extras en los módulos de estas enzimas que pueden añadir sustituyentes al grupo α -ceto o β -ceto del intermediario acil-ACP de las PKS, o en un grupo lateral del intermediario aminoacídico de la NRPS (Brown *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2020 y Ruijne y Kuipers, 2021).

Algunos ejemplos de compuestos obtenidos gracias a alguna de estas técnicas o varias de ellas son el análogo del antibiótico dependiente de calcio (CDA), que fue obtenido al mutar el gen que codifica la NRPS involucrada en su biosíntesis, haciendo posible la reprogramación de su dominio de adenilación, lo que resultó en el cambio del 3-metil-glutamato que incorporaba de forma natural por un 3-metil-glutamina sintético añadido, generando este nuevo análogo del lipopéptido cíclico (Thirlway *et al.*, 2012), y la molécula desmicarosil-3D- β -D-digitoxosilmitramicina SK, un análogo de la mitramicina con mayor actividad antitumoral y menor citotoxicidad que el compuesto nativo, que fue obtenido gracias a la mutación de una cetorreductasa del BGC de la mitramicina, además de la expresión de genes que permiten sintetizar el azúcar D-digitoxosa (Núñez *et al.*, 2012). Estas modificaciones crearon una molécula que se posiciona como un posible tratamiento del sarcoma, ya que inhibe el crecimiento de las



células iniciadoras del tumor así como el de las células responsables de la expansión y propagación del tumor (Tornin *et al.*, 2016).

2.5. Búsqueda de diversidad estructural en los compuestos naturales

En la actualidad uno de los retos en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos por minería genómica es la identificación de BGCs que codifiquen compuestos diferentes a los ya descritos. La minería genómica permite identificar los BGCs de un genoma, pero no aquellos que presenten mecanismos enzimáticos totalmente diferentes a los ya descritos. Sin embargo, ciertas aproximaciones bioinformáticas pueden solventar esta dificultad. Así, se han identificado nuevos compuestos cuando se ha priorizado la búsqueda de genes que codifiquen enzimas con actividades capaces de generar estructuras diversas en el compuesto codificado por el BGC. Como genes que codifican PKS con didominios DUF-SH que permiten la incorporación de azufre (Pan *et al.*, 2017); genes que codifiquen halogenasas que realicen esta modificación en el compuesto (Prado-Alonso *at al.*, 2022); genes responsables de la generación de enlaces N-N (Prado-Alonso *at al.*, 2024); o también genes que codifiquen enzimas clave que permitan la síntesis de moléculas que puedan ser usadas como *building blocks* para los compuestos codificados por el BGC, como el ácido piperazido (García-Gutiérrez *et al.*, 2024).

2.5.1. El salicilato como *building block*

En la biosíntesis del compuesto final codificado por un BGC se parte de una o varios *building blocks* que son reconocidos por las enzimas codificadas por los genes de biosíntesis estructural. Es usual que dichas unidades sean sintetizadas por acción de alguna enzima codificada por un gen de biosíntesis adicional del propio BGC (Olano *et al.*, 2011). Como se ha explicado previamente, las enzimas NRPS y PKS pueden reconocer una larga lista de compuestos como sustratos (Süssmuth y Mainz, 2017). El salicilato o ácido 2-hidroxibenzoico es uno de estos hidroxiácidos y es una unidad iniciadora de muchos metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces*. Muchos de ellos son sideróforos como la piochelina, producida por diferentes cepas de *Streptomyces* y otras especies bacterianas, o su variante la watasemicina de *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712, que además presentan actividad antibiótica (Ho *et al.*, 2018; Inahashi *et al.*,



2017). Otro ejemplo son los sideróforos oxachelina B y oxachelina C, producidos por *Streptomyces sp.* RM-14-6 y que tienen función neuroprotectora (Shaaban *et al.*, 2017). Pero además, el salicilato también puede encontrarse en otros compuestos que no presentan función biológica como sideróforo. Así encontramos el anticancerígeno tetraciclina SF2575 de *Streptomyces sp.* SF2575 y el antitumoral caboxamicina de *Streptomyces sp.* NTK 937 (Hatsu *et al.*, 1992; Losada *et al.*, 2017) (Figura 8).

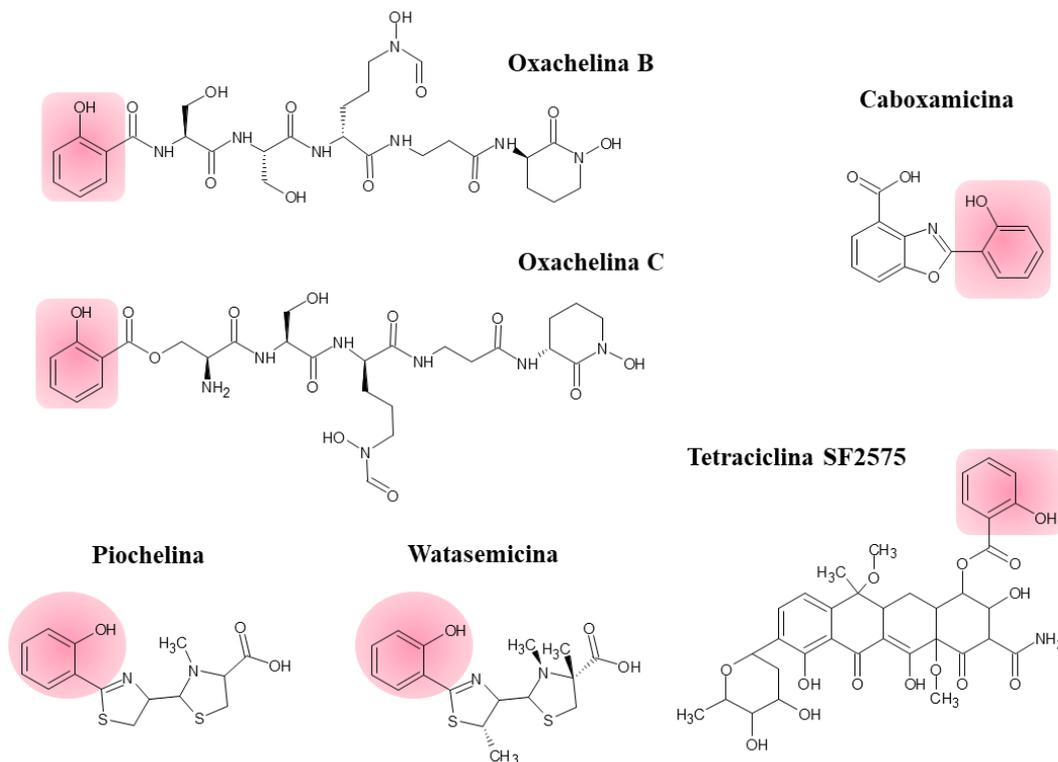


Figura 8. Estructuras químicas de compuestos producidos por *Streptomyces* que contienen salicilato en su estructura. Se resalta con color las moléculas de salicilato.

El salicilato es uno de los posibles derivados del corismato que a su vez, procede de la ruta del ácido siquímico, en la que una D-eritrosa-4-fosfato y un fosfoenolpiruvato son los precursores para que, por acción de diferentes enzimas y dando reacciones de condensación/redox se produzca finalmente el ácido corísmico o corismato (Herrmann, 1995) (Figura 9). Esta ruta está conservada en hongos, bacterias y plantas pero, no en animales. El corismato resultante es precursor para la síntesis de los aminoácidos aromáticos esenciales pero también para la producción de antibióticos aromáticos, alcaloides, flavonoides, ligninas, por lo que es un precursor tanto del metabolismo primario como del secundario (Mishra y Baek, 2021). Del corismato se pueden obtener diferentes derivados por acción de enzimas únicas, que pueden usarse como *building*



blocks para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Walsh *et al.*, 2012). En concreto, la enzima que convierte el corismato en salicilato en un único paso y que es única de bacterias es la Salicilato Sintasa. Esta enzima cataliza tanto la reacción de isomerización como la eliminación de la cola procedente del fosfoenolpiruvato, en el corismato (Shelton y Lamb, 2018). Sin embargo, no todas las bacterias poseen esta enzima; los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* carecen de ella y necesitan la acción de dos enzimas para producir el salicilato. Primero deben transformar el corismato en isocorismato con la Isocorismato Sintasa, después con la Isocorismatos Piruvato Liasa lo convierten en salicilato liberando piruvato. Sin embargo, otras géneros de bacterias como *Yersinia*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Streptomyces* sí presentan la enzima Salicilato Sintasa, obteniendo salicilato en una única reacción (Mishra y Baek, 2021) (Figura 9).

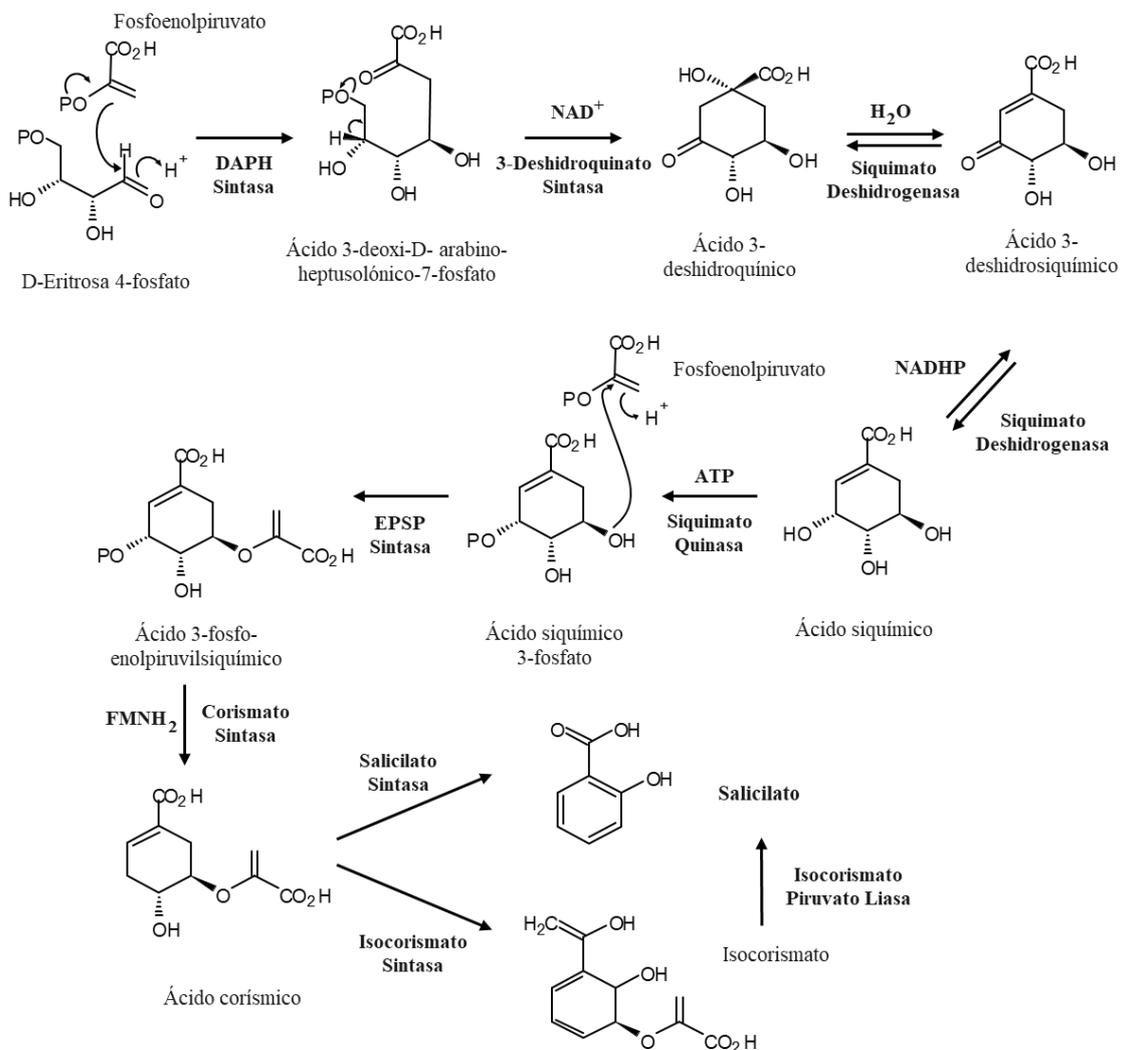


Figura 9. Ruta del ácido siquímico. Síntesis de ácido corísmico y sus derivados isocorismato y salicilato.



Una estrategia que se puede seguir para la detección de nuevos BGCs de interés en *Streptomyces* gracias a la minería genómica, es la identificación de genes claves de una ruta de biosíntesis, como genes de biosíntesis de *building blocks*. Si tomamos el salicilato como el *building block* de interés para la síntesis de posibles nuevos compuestos, el gen codificante de la enzima Salicilato Sintasa sería crucial para dicha biosíntesis y por tanto, una diana interesante para la identificación de nuevos BGCs que codifiquen compuestos que contengan dicha unidad estructural.



II. OBJETIVOS





II. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal la identificación y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis (BGCs) que codifiquen compuestos nuevos y bioactivos en *Streptomyces* y que contengan como unidades estructurales 2-hidroxibenzoato. La consecución de este objetivo se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos intermedios:

1. Localizar las regiones conservadas en las proteínas Salicilato Sintasa.
2. Detectar, en cepas de *Streptomyces*, genes homólogos al gen *ssfH* que codifica la Salicilato Sintasa de tetraciclina SF2575.
3. Analizar por antiSMASH los genomas y los BGCs de las cepas identificadas. Localizar los BGCs portadores de los genes homólogos a *ssfH* detectados.
4. Delimitar las agrupaciones de genes identificadas si procede.
5. Analizar bioinformáticamente los módulos de los genes de biosíntesis estructural de los BGCs de interés.
6. Diseñar y generar cepas mutantes en los BGCs de interés.
7. Analizar comparativamente por cromatografía líquida los perfiles metabólicos de las cepas construidas.
8. Identificar compuestos diferenciales producidos.
9. Purificar por cromatografía líquida los compuestos diferenciales de interés.
10. Caracterizar estructuralmente por RMN los compuestos purificados.
11. Proponer la ruta de biosíntesis del BGC 8 de *Streptomyces glaucescens* GLA.O.
12. Analizar la actividad biológica del compuesto UO-188.





III. MATERIALES Y MÉTODOS





III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el desarrollo del presente trabajo se muestran en las Tablas 1 a 3.

Tabla 1. Cepas de *Streptomyces* utilizadas para cribados de PCR

Microorganismo	Genotipo	Referencia
<i>Streptomyces argillaceus</i> ATCC 12956	Silvestre, productor de mitramicina	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Streptomyces canus</i> ATCC 12646	Silvestre, productor de telomicina	
<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 13273	Silvestre	
<i>Streptomyces nogalater</i> ATCC 27451	Silvestre, productor de nogalamicina	
<i>Streptomyces galilaeus</i> ATCC 14969	Silvestre	
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	Silvestre, productor de daptomicina y cariomicina	Agricultural Research Service (ASR) Culture Collection NRRL
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S1022	Silvestre	
<i>Streptomyces rimosus</i> NRLL 3016	Silvestre, productor de oxitetraciclina	
<i>Streptomyces albireticuli</i> NRRL B-1670	Silvestre	
<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057	Silvestre, productor de tienamicina	
<i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O	Silvestre, productor de tetracenomicina e hidroxistreptomicina	Weber <i>et al.</i> , 1979
<i>Streptomyces lividans</i> TK 24	Silvestre	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
<i>Streptomyces coelicolor</i> M 145	Silvestre, productor de actinorodina	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
<i>Streptomyces olivaceus</i> Tü 2353	Silvestre, productor de eloramicina	Drautz <i>et al.</i> , 1985
<i>Streptomyces lydicus</i> NRRL 2433	Silvestre, productor de estreptolydingin	DeBoer <i>et al.</i> , 1955
<i>Streptomyces steffisburgensis</i> NRRL 3193	Silvestre, productor de estefimicina	Dietz, 1967
<i>Streptomyces</i> sp. Tü 6176	Silvestre, productor de nataxazol	Sommer <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces albus</i> J1074	ilv-1, sal-2, R-, M-, producción de paulomicinas	Chater y Wilde, 1976
<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Silvestre, productor de caboxamicina	Manfio, 1995
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> 3017	Silvestre	Jensen, 1931, emend.
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> 3718	Silvestre	Komaki <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces</i> sp. CS003, CS004, CS014, CS030, CS040, CS044a, CS047, CS052a, CS052b, CS057, CS074a, CS081a, CS084, CS088c, CS090a, CS092, CS109, CS113, CS115, CS119, CS123, CS131, CS134, CS147, CS149, CS159, CS170, CS174, CS180, CS190, CS199, CS207, CS215, CS217, CS227, CS065, CS048	Silvestre	Colección CS Malmierca <i>et al.</i> , 2018

ilv-1: auxótrofo de isoleucina más valina; **sal-2:** endonucleasa sal-2; **R-M-:** defectuoso en la restricción y modificación; **emend.:** enmendado.



Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio

Microorganismo	Genotipo	Uso	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH10B	$F^- mcrA \Delta(mrr^- hsdRMS^- mcrBC) \phi 80lacZAM15, \Delta lacX74, deoR, recA1, endA1, ara\Delta 139, \Delta(ara, leu)7697, galU, galK, \lambda^-, rpsL (StrR), nupG$	Clonaje	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> ET12567 (pUB307)	$F^+, dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, zjj-201::Tn10, recF143, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, thonA31, rpsL136, hisG4, tsx-78, mtl-1, glnV44. chlR, kanR, tetR$	Conjugación intergenérica	(Flett <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i> ET12567 (pUZ8002)	$F^+, dam13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR zjj201::Tn10, recF143, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, thonA31, rpsL136, hisG4, tsx-78, mtl-1, glnV44. chlR, kanR$		(Kieser <i>et al.</i> , 2000)

F^- : ausencia de plásmido F ; $mcrA \Delta(mrr^- hsdRMS^- mcrBC)$: eliminación de los sistemas de restricción $mcrA$, mrr , $hsdRMS$ y $mcrBC$; $\phi 80lacZAM15$: producción de un fragmento omega de β -galactosidasa que permite el screening azul/blanco; $\Delta lacX74$: delección del operón lac ; $deoR$: represor transcripcional $DeoR$; $recA1$: forma inactiva de la proteína de reparación y mantenimiento del ADN $RecA$; $endA1$: pérdida de la endonucleasa I de digestión no específica; $ara\Delta 139$: bloqueo del metabolismo de la arabinosa por una mutación en la L-ribulosa-fosfato 4-epimerasa; $\Delta(ara, leu)7697$: carencia del operón $leuLABCD$ por delección de los genes $b0060-b0079$ lo que impide que se sintetice leucina a partir de valina; $galU$: nucleotidil transferasa de azúcar; $galK$: enzima galactokinase; λ^- : delección del lisogen lambda; $rpsL (StrR)$: mutación en la proteína ribosomal $S12$ que confiere resistencia a la estreptomycin; $nupG$: transportador de nucleósidos de alta afinidad; $dam-13::Tn9$: ADN adenina metilasa; $dcm-6$: ADN citosina metiltransferasa; $recF143$: mutación que afecta la sensibilidad a la inducción térmica y lisogen lambda afectado; $galT$: enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa; ara : operón de la arabinosa; $lacY1$: gen de la permeasa de lactosa, $xyl-5$: gen para la biosíntesis de xilosa; $leuB6$: 3-isopropilmalato deshidrogenasa; $thi-1$: sulfurotransferasa para la biosíntesis de tiamina; $rpsL136$: subunidad ribosómica 30S de la proteína $S12$; $hisG4$: ATP fosforibosiltransferasa, $tsx-78$: canal para nucleósidos; $mtl-1$: operón para la síntesis de manitol; $glnV44$: glutamina ARNt; $chlR$: resistencia a cloranfenicol; $kanR$: resistencia a kanamicina; $tetR$: resistencia a tetraciclina.

Tabla 3. Cepas de mutantes de *Streptomyces* generadas en este estudio

Microorganismo	Genotipo	Uso	Referencia
Δcs_ssfH-1	$CS123\Delta ssfH-1::pOJ260$	Cultivos y purificación	Este trabajo
$\Delta 362$	$CS123\Delta orf2-5::aac(3)IV contig362$		
$\Delta orf12g$	$S. glaucescens \Delta orf12::aac(3)IV BGC 8$		
$\Delta orf14g$	$S. glaucescens \Delta orf14::aac(3)IV BGC 8$		
$\Delta orf23-24g$	$S. glaucescens \Delta orf23-24::aac(3)IV BGC 8$		
$\Delta orf36g$	$S. glaucescens \Delta orf36::aac(3)IV BGC 8$		
+orf11g	$S. glaucescens +pSETETc-orf11 BGC 8$		
$\Delta orf12g + orf11g$	$\Delta orf12g + pSETETc-orf11 BGC 8$		
+orf29g	$S. glaucescens +pSETETc-orf29 BGC 8$		
$\Delta orf36g + orf29g$	$\Delta orf36g + pSETETc-orf29 BGC 8$		
Eorf24g	$S. glaucescens pOJ260*p-Eorf24 BGC 8$		
Eorf33g	$S. glaucescens pOJ260*p-Eorf33 BGC 8$		
S. glau+pset	$S. glaucescens +pSET150ETc$		

cs_ssfH-1 : gen homólogo en *Streptomyces* sp. $CS123$ al gen $ssfH$ de tetraciclina $SF2575$; $pOJ260$: vector suicida en *Streptomyces*; $aac(3)IV$: gen de la aminoglicósido acetil-transferasa que confiere resistencia a apramicina y tobramicina; $pSETETc/pSET150ETc$: vector integrativo en *Streptomyces*; $pOJ260*p$: vector suicida en *Streptomyces* con el promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado ($ermE^*p$).



2. Métodos microbiológicos

Los métodos utilizados para el cultivo de *Escherichia coli* y *Streptomyces*, han sido los descritos por Green y Sambrook (2012) y Kieser *et al.* (2000), respectivamente.

2.1. Soluciones utilizadas

Oligoelementos: $ZnCl_2$ (0,04 g/L), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,2 g/L), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,01 g/L), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,01 g/L), $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (0,01 g/L), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,01 g/L).

Elementos trazas sin hierro x4: $ZnCl_2$ (1,6 mg/L), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,4 mg/L), $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,4 mg/L), NaB_4O_7 (0,4 mg/L), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,4 mg/L). Filtrar y no autoclavar.

2.2. Antibióticos

Para la realización de este trabajo se utilizaron los antibióticos a las concentraciones indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Antibióticos y concentraciones utilizadas para cada microorganismo

Antibiótico	Solvente	Concentración stock (mg/mL)	Concentración cultivo (mg/mL)	
			<i>E. coli</i>	<i>Streptotomyces</i>
Ácido nalidíxico	NaOH 0,15 N	25	-	50
Apramicina	H ₂ O miliQ	200	100	25
Cloranfenicol	Etanol 70 %	50	25	-
Kanamicina	H ₂ O miliQ	50	25	-
Tioestreptona	DMSO	25	-	25 (cultivo sólido) 5 (cultivo líquido)

2.3. Medios de cultivo

A continuación se detallan los medios de cultivos empleados en este estudio. Dichos medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 1 atmósferas durante 20 minutos.



2.3.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Medio 2xTY (Green y Sambrook, 2012): Triptona (16 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y NaCl (5 g/L). Utilizado para el crecimiento celular y la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*. La versión sólida con 2 % de agar se usa para crecimiento de *E. coli* como colonia aislada.

Medio SOB (Green y Sambrook, 2012): Triptona (20g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (0,58 g/L), KCl 0,19 (g/L), pH 7. Suplementado con glucosa (20mM) y MgCl₂-MgSO₄ (1mM). Utilizado para la preparación de células competentes.

2.3.1. Medios de cultivo para bioensayos

Medio 2xTY (Green y Sambrook, 2012): Triptona (16 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y NaCl (5 g/L). Medio líquido utilizado para el cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* y *Micrococcus luteus*.

Medio TSA (Tryptic Soy Broth, Merck): Caldo CASO[®] (30 g/L); pH 7,0. Medio sólido con 2 % de agar usado para el cultivo de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *M. luteus*.

Medio YPD: extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L), glucosa (20 g/L). Medio utilizado para el crecimiento de *Candida albicans*. Con un 2 % de agar en su versión sólida.

2.3.2. Medios de cultivo para *Streptomyces*

Medio MA (Fernández *et al.*, 1998): MOPS (21 g/l), glucosa (5 g/l), extracto de levadura (0,5 g/l), extracto de carne (0,5 g/l), casaaminoácidos (1 g/l) y 2,5 % de agar; pH 7. Medio sólido utilizado para la esporulación de *Streptomyces*.

Medio TSB (Tryptic Soy Broth, Merck): Caldo CASO[®] (30 g/L); pH 7,0. Medio líquido comercial usado para el cultivo de los preinóculos de *Streptomyces* y para cultivos de cepas silvestres y transconjugantes para la extracción de ADN genómico.



Medio MS (Hobbs *et al.*, 1989): Manitol (20 g/L), harina de soja (20 g/L) y $MgCl_2$ (4,8 g/L). Se utilizó agua del grifo como solvente. Utilizado en la producción en *Streptomyces*. La versión sólida de este medio se realizó con 2 % de agar y se utilizó para la conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces*, así como para la esporulación de *Streptomyces glaucescens* GLA.O.

Medio Ent (Fiedler *et al.*, 2001): Almidón de patata (20 g/L), bactopectona (5 g/L) y extracto de carne (2,5 g/L); pH 7,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM1 (Cortés, comunicación personal): Harina de soja (10 g/L), glucosa (18 g/L), $CaCO_3$ (0,2 g/L); Na_2SO_4 (1 g/L). Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM3 (Cortés, comunicación personal): Glucosa (5 g/L), almidón de patata (50 g/L), harina de soja (25 g/L), sirope de arroz (3 g/L), K_2HPO_4 (0,25 g/L) y $CaCO_3$ (2,5 g/L); pH 7. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM4 (Cortés, comunicación personal): Glucosa (2,5 g/L), almidón de patata (25 g/L), harina de soja (12,5 g/L), sirope de arroz (1,5 g/L), K_2HPO_4 (0,125 g/L), $CaCO_3$ (1,25 g/L) y MOPS (21 g/L); pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM5 (Cortés, comunicación personal): Peptona (20 g/L), extracto de carne (8 g/L), glucosa (15 g/L), glicerol (10 g/L) y $CaCO_3$ (0,4 g/L); pH 7,2. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM7 (Cortés, comunicación personal): MOPS (20,9 g/L), L-prolina (15 g/L), glicerol (20 g/L), sacarosa (2,5 g/L), L-glutamato (1,5 g/L), $NaCl$ (0,5 g/L), K_2HPO_4 (2 g/L), $MgSO_4$ (0,24 g/L), $CaCl_2$ (0,022 g/L) y 5 mL/L de solución de oligoelementos; pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM8 (Cortés, comunicación personal): MOPS (20,9 g/L), L-prolina (10 g/L), glicerol (20 g/L), $NaCl$ (0,5 g/L), K_2HPO_4 (2,1 g/L), EDTA (0,25 g/L), $MgSO_4$ (0,49 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,029 g/L) y 5 mL/L de solución de oligoelementos; pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.



Medio SM9 (Cortés, comunicación personal): MOPS (20,9 g/L), L-prolina (11,5 g/L), glicerol (23 g/L), NaCl (0,5 g/L), K_2HPO_4 (0,52 g/L), EDTA (0,25 g/L), $MgSO_4$ (0,49 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,029 g/L), 5 ml/L de solución de oligoelementos; pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM10 (Cortés, comunicación personal): MOPS (20,9 g/L), L-prolina (11,5 g/L), glicerol (23 g/L), NaCl (0,5 g/L), K_2HPO_4 (2,1 g/L), Na_2SO_4 (0,28 g/L), $MgSO_4$ (0,24 g/L), $CaCl_2$ (0,022 g/L), 5 ml/L de solución de oligoelementos; pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM12 (Cortés, comunicación personal): Harina de soja (10 g/L), glucosa (50 g/L), peptona (4 g/L), extracto de carne (4 g/L), extracto de levadura (1 g/L), NaCl (2,5 g/L), $CaCO_3$ (5 g/L); pH 7,6. Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM15 (Cortés, comunicación personal): MOPS (20,9 g/L), casaminoácidos (11,5 g/L), glicerol (23 g/L), NaCl (0,5 g/L), K_2HPO_4 (0,52 g/L), EDTA (0,25 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,49 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,029 g/L) y 5ml/L de solución de oligoelementos; pH 6,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM17 (Cortés, comunicación personal): Glucosa (2 g/L), glicerol (40 g/L), almidón soluble (2 g/L), harina de soja (5 g/L), peptona (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (5 g/L) y $CaCO_3$ (2 g/L). Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM19 (Cortés, comunicación personal): Pasta de tomate (40 g/L), avena (15 g/L), glucosa (2 g/L). Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM20 (Cortés, comunicación personal): Maltosa (20 g/L), peptona (5 g/L), extracto de carne (5 g/L), extracto de levadura (3 g/L), NaCl (3 g/L) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g/L); pH 7,2. Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.



Medio SM21 (Cortés, comunicación personal): L-asparagina (7,5 g/L), NaCl (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), MOPS (21 g/L), MgSO₄ (0,24 g/L), CaCl₂ (0,022 g/L), 5 ml/L de solución de oligoelementos. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM23 (Cortés, comunicación personal): L-prolina (11,5 g/L), NaCl (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), MOPS (20,9 g/L), maltosa (30 g/L), MgSO₄ (0,24 g/L), CaCl₂ (0,022 g/L), 5 ml/L de solución de oligoelementos. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM24 (Cortés, comunicación personal): Extracto de levadura (9 g/L), peptona (1,8 g/L), glucosa (20 g/L), KH₂PO₄ (1g/L) y MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L). Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM25 (Cortés, comunicación personal): Peptona (10 g/L), extracto de malta (21 g/L), glicerol (40 g/L). Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM30 (Cortés, comunicación personal): Pasta de tomate (40 g/L), avena (15 g/L), glucosa (2 g/L); pH 4,5. Se utilizó agua de grifo como solvente. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SM31 (Cortés, comunicación personal): Extracto de levadura (9 g/L), peptona (1,8 g/L), glucosa (20 g/L), KH₂PO₄ (1g/L) y MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L); pH 4,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio SV2 (Cortés, comunicación personal): Glucosa (15 g/L), glicerol (15 g/L), peptona de soja (15 g/L) NaCl (3 g/L), CaCO₃ (1 g/L); pH 4,5. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio R5A (Fernández *et al.*, 1998): Sacarosa (103 g/L), MOPS (21 g/L), K₂SO₄ (0,25 g/L), MgCl₂.6H₂O (10,12 g/L), glucosa (10 g/L), casaminoácidos (0,1 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y 2 mL/L de solución de oligoelementos; pH 6,8. Medio utilizado para producción en *Streptomyces*.

Medio MMI (Keiser *et al.*, 2000 modificado): MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), L-asparagina (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), glucosa (10 g/L), CaCl₂ (0,1 g/L), 0,250 ml/L de solución de elementos trazas sin hierro x4; pH 7,2. El glicerol y la glucosa se



suplementan tras autoclavar el medio Se añaden 20 g/L de agar si el medio es sólido. Medio utilizado para producción en *Streptomyces* bajo condiciones de ausencia de hierro.

Medio MMs (Keiser *et al.*, 2000 modificado): MgSO₄.7H₂O (0,6 g/L), NH₄SO₄ (2 g/L), K₂HPO₄ (2,6 g/L), glucosa (2,5 g/L), glicerol (25 mL), CaCl₂ (0,1 g/L), extracto de levadura (0,05 g/L), 0,250 ml/L de solución de elementos trazas sin hierro x4; pH 7,2. El glicerol y la glucosa se suplementan tras autoclavar el medio. Se añaden 20 g/L de agar si el medio es sólido. Medio utilizado para producción en *Streptomyces* bajo condiciones de ausencia de hierro.

2.4. Obtención de *stock* celulares

Para obtener un *stock* de almacenaje de células de *E. coli* se preparó un cultivo de 2xTY líquido a 37 °C y a 250 rpm durante 12 horas. De este cultivo se tomó 1,5 mL que fueron centrifugados y lavados con 2xTY líquido dos veces. El sedimento resultante se resuspendió en glicerol 50%:2xTY líquido en relación 1:1. Los *stock* de esporas fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

Para obtener un *stock* de almacenaje de esporas de *Streptomyces* se recogieron de placas de medio MS o MA incubadas a 30 °C durante al menos 7 días, se filtraron a través de algodón estéril y se conservaron en glicerol al 20 %. Los *stock* de esporas fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

Para obtener un *stock* de almacenaje de micelio de *Streptomyces* se preparó un cultivo en TSB a 30 °C y a 250 rpm durante 1 día. El cultivo fue centrifugado y lavado con glucosa 10,3 % dos veces. El sedimento resultante fue resuspendido en glucosa 10,3 % y alicuotado. Los *stock* de esporas fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

2.5. Condiciones de cultivo

2.5.1. Condiciones de cultivo para *Escherichia coli*

Las cepas DH10B y ET12567 (pUB307 y pUZ8002) de *E. coli* fueron cultivadas en medio 2xTY sólido a 37 °C durante 24 horas para obtener colonias aisladas. Estas colonias se usaron individualmente para preparara cultivos líquidos en 2xTY que se



incubaron a 37 °C y en agitación a 250 rpm durante una noche. Para cada cepa se utilizó el antibiótico de selección necesario.

2.5.2. Condiciones de cultivo para *Streptomyces*

Todas las cepas de *Streptomyces* se sembraron en MA o MS y se incubaron a 30 °C durante 7 días para obtener esporas. Los cultivos líquidos de *Streptomyces* se realizaron partiendo de un preinóculo líquido de 50 mL de TSB con 50-100 µL de un *stock* de esporas o 200-250 µL de un *stock* de micelio. El preinóculo se incubó durante 48 h, a 30 °C y en agitación a 250 rpm. Para iniciar el cultivo de producción en los diferentes medios indicados en el apartado 2.2.2. se preparaban volúmenes de 50 mL de medio a los que se le añadía masa celular del preinóculo. La masa celular de preinóculo añadida corresponde al volumen necesario para que el cultivo de producción de 50 mL obtenga una densidad óptica de 0,2 a 600 nm. Los cultivos de producción se incubaron a 30 °C durante un máximo de 7 días según el experimento y en agitación a 250 rpm. Si los cultivos de producción se realizaron en medios sólidos el proceso seguía los mismos procedimientos, con excepción de que se calcula la masa celular para un volumen de cultivo de producción de 25 mL y el cultivo de producción se mantenía en estático.

3. Aislamiento de ADN

La obtención de ADN plasmídico de *E. coli* y ADN cromosómico de *Streptomyces* se basó en los métodos descritos por Green y Sambrook (2012) y Kieser *et al.*, (2000). El *kit* comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (ThermoFisher Scientific) fue utilizado para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* cuando era necesario obtener una pureza mayor.

4. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

El termociclador *SureCycler 8800*[®] (Agilent Technologies) se utilizó para realizar las múltiples PCR a lo largo de este trabajo.



4.1. Polimerasa *DreamTaq*: PCR de cribado y comprobaciones

La polimerasa *DreamTaq DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific) permite amplificar hasta 6 Kb de ADN generando extremos simples de desoxiadenosina en el extremo 3'. Esta polimerasa se utilizó en este proyecto para tres casos diferentes. Primero, para realizar el cribado de PCR mediante oligonucleótidos degenerados y específicos para genes homólogos al gen *ssfH*. Segundo, para comprobar colonias de *E. coli* transformadas con plásmidos diseñados *in vitro* en este trabajo. Y tercero, para realizar comprobaciones de transconjugantes de *Streptomyces* a partir de ADN cromosómico extraído de ellos. Las condiciones de la reacción fueron las recomendadas por la casa comercial y que se encuentran descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la polimerasa *DreamTaq*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Anillamiento	Tm-5	30 s	25-40
Extensión	72	1 min*	
Extensión final	72	5-15 min	1
Fin de la reacción	4	∞	1

Tm: Temperatura de melting. *: 1 minuto para productos de PCR de hasta 2 Kb, para productos mayores aumentar 1 minuto por cada 1 Kb.

4.2. Polimerasa *Herculasa*: amplificación de ADN para construcciones

La polimerasa *Herculase II Fusion*[®] (Agilent Technologies) permite la amplificación de fragmentos de hasta 23 Kb generando extremos romos en menos tiempo (30 s/kb) y de mayor fidelidad (1 error por cada 777 Kb) que la polimerasa *DreamTaq*, además permite mejores amplificaciones para ADN con alto contenido en C+G. Esta polimerasa fue utilizada para la generación de fragmentos de ADN destinados a la realización de construcciones plasmídicas. Las condiciones de la reacción fueron las recomendadas por la casa comercial y que se encuentran en la Tabla 6.



Tabla 6. *Condiciones de reacción para la polimerasa Herculasa*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	20 s	
Anillamiento	T _m -5	20 s	30
Extensión	72	30 s/Kb	
Extensión final	72	3 min	1
Fin de la reacción	4	∞	1

T_m: Temperatura de melting.

4.3. Polimerasas *Terra* y *Platinum*: comprobación de transconjugantes de *Streptomyces*

Para la comprobación rápida de colonias transconjugantes de *Streptomyces* se utilizaron las polimerasas *Terra*TM *PCR Direct Polymerase* (Takara) y *Platinum*TM *Direct Polymerase* (Invitrogen). Estas polimerasas permiten realizar PCR a partir de muestras complejas con impurezas procedentes de lisados celulares. En ambos casos el lisado es generado por lisis alcalina seguido de un choque térmico de las esporas o micelio del transconjugante, como indican las respectivas casas comerciales. Finalmente, un volumen de 2-5 µL de este lisado es utilizado como ADN molde para la PCR. Las condiciones de la reacción para ambas polimerasas fueron las recomendadas por las respectivas casas comerciales y se encuentran indicadas en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. *Condiciones de reacción para la polimerasa Terra*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	98	2 min	1
Desnaturalización	98	10 s	
Anillamiento + Extensión	68	1 min/Kb	40
Fin de la reacción	4	∞	1

T_m: Temperatura de melting.



Tabla 8. Condiciones de reacción para la polimerasa Platinum

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	15 s	
Anillamiento	60	15 s	35-40
Extensión	68	20 s/Kb	
Fin de la reacción	4	∞	1

T_m: Temperatura de melting.

5. Manipulación *in vitro* del ADN

5.1. Vectores utilizados

En la Tabla 9 se recogen los vectores utilizados en el presente trabajo.

Tabla 9. Vectores utilizados en el estudio

Vector	Tamaño (kb)	Características	Uso	Referencia
pCR®-Blunt	3,5	<i>rep pUC, T7p, lacp, lacZα-ccdB, Kan^R, Zeo^R</i>	Clonación	Invitrogen
pHZ1358	10,7	Vector conjugativo en <i>Streptomyces, rep pUC, bla, neo, tsr, oriTRP4</i>	Reemplazamiento de genes	(Sun <i>et al.</i> , 2009)
pOJ260	3,5	Vector suicida en <i>Streptomyces, rep pUC, lacZ, aac(3)IV, oriTRP4</i>	Disrupción de genes	(Bierman <i>et al.</i> , 1992)
pOJ260*P	3,6	Vector suicida en <i>Streptomyces, rep pUC, lacZ, aac(3)IV, oriTRP4, ermE*p</i>	Sobreexpresión de genes	(Olano <i>et al.</i> , 2004)
pSET152ETc	6,9	Vector integrativo, <i>rep pUC, aac(3)IV, tsr, oriTRR4, intΦC31, attPΦC31, ermE*p</i>	Sobreexpresión de genes en monocopia	(Cano-Prieto <i>et al.</i> , 2015)
pUO9090	3,5	<i>rep pUC, aac(3)IV, Km^R</i>	Obtención del <i>cassette</i> de resistencia a apramicina	M. C. Martín, comunicación personal

rep pUC: origen de replicación de *E. coli*; *T7p*: promotor T7; *lacp*: promotor del gen *lacZ*; *lacZα-ccdB*: extremo N-terminal de β-galactosidasa fusionado con un gen letal *ccdB*; *lacZ*: enzima β-galactosidasa; *Kan^R*: resistencia a kanamicina; *Zeo^R*: resistencia a zeocina; *bla*: gen de la β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; *neo*: gen de resistencia a neomicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *oriTRP4*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac(3)IV*: gen de la aminoglicósido acetil-transferasa que confiere resistencia a apramicina y tobramicina; *intΦC31*: gen que codifica una integrasa ΦC31; *attPΦC31*: sitio de integración del plásmido; *ermE*p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.2. Digestión enzimática del ADN

Las digestiones de ADN se realizaron con endonucleasas de restricción según los métodos descritos por Green y Sambrook (2012). Las condiciones de la reacción, así



como los tampones utilizados en la misma, se seleccionaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial a la que pertenecían las enzimas (ThermoFisher Scientific). La ARNasa utilizada en las reacciones se preparó a una concentración final de 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl 15 mM, calentándola a 90 °C durante 15 minutos. Una vez la solución se enfría a temperatura ambiente se almacena a -20 °C.

5.2.1. Desfosforilación de extremos 5' de ADN

La eliminación del grupo fosfato del extremo 5' del ADN era necesaria en algunos casos para evitar la formación de religados en vectores abiertos cuyos extremos eran romos o cohesivos. Esta desfosforilación se realizó utilizando la fosfatasa alcalina CIP (New England Biolabs) según indica la casa comercial. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente se purificó el ADN con el *kit* comercial *GeneJET PCR Purification Kit* (ThermoFisher Scientific).

5.3. Ligación de ADN

Las reacciones de ligación entre vectores e insertos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Green y Sambrook (2012). Se utilizó la enzima ADN ligasa del fago T4 (Invitrogen) tanto para ligar extremos romos como cohesivos. Las ligaciones se llevaron a cabo en un ratio 1:3, vector:inserto. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 1 h.

5.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La preparación de los geles se realizó con agarosa Pronadisa (Conda), usualmente a 0,7 %. Se utilizó *RedSafeTM* (iNtRON Biothecnology) como reactivo de revelado de ácidos nucleicos, siguiendo las especificaciones de la casa comercial. A las muestras de ADN que no contenían un agente densificante se les añadió tampón de carga 10x preparado con 100 mM EDTA, 43 % glicerol y 0,5 % azul de bromofenol. Se utilizó el marcador *GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular en todas las electroforesis realizadas, el marcador se resuspendía en 400 µL de agua miliQ y 100 µL de tampón de carga (Thermo Fisher), lo que equivale a una concentración final de 0,1 µg/µL. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales



a un voltaje de 100-120 V con tampón TAE 0,5x (20 mM Tris-HCl, 10 mM ácido acético glacial, 1,1 mM EDTA). La visualización del ADN se realizó con el sistema *GelDoc*[®] (BioRad) con luz ultravioleta de 285 nm de longitud de onda.

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

Una vez los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis, la agarosa correspondiente a las bandas de ADN de interés se recortaba con un bisturí. Posteriormente, esta agarosa se trataba con el *kit* comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* (ThermoFisher Scientific), según las instrucciones del fabricante, permitiendo la purificación del ADN contenido en esos fragmentos de agarosa.

6. Transformación de ADN plasmídico

6.1. Preparación y transformación de células *E. coli* DH10B

Las células quimiocompetentes *E. coli* DH10B se obtuvieron partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento. La competencia se indujo mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). La transformación de estas células se realizó por choque térmico según el método descrito por Green y Sambrook (2012). Las células transformadas se incubaron en medio 2xTY líquido sin antibiótico a 37 °C durante 1 h y a 250 rpm, permitiendo así la expresión del marcador de resistencia del AND plasmídico con el que se transformaron. Finalmente estas células se sembraron por agotamiento en 2xTY sólido con el antibiótico de selección pertinente y se incubaron a 37 °C durante una noche.

6.2. Preparación y transformación de células *E. coli* ET12567

Las células electrocompetentes *E. coli* ET12567 se obtuvieron partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento. La competencia de estas células se indujo gracias a lavados con glicerol al 10 % a 4 °C (MacNeil *et al.*, 1992). La transformación de estas células se realizó en un electroporador *MicroPulser*[®] (BioRad), se utilizó una cubeta con 2 mm de separación entre electrodos. En ella se mezcló 600 ng de ADN con



50 μ L de células electrocompetentes. Estas células fueron sometidas a un pulso de 2,5 kV y 5 ms de duración. Las células se diluyeron rápidamente en 1 mL de medio 2xTY y se incubaron a 37 °C durante 1 h y a 250 rpm, permitiendo así la expresión del marcador de resistencia del AND plasmídico con el que se transformaron. Finalmente, las células se sembraron en placas de 2xTY sólido con los antibióticos de selección correspondientes y se incubaron a 37 °C durante una noche.

7. Conjugación intergenérica de *Streptomyces*

La conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces* se llevó a cabo según los protocolos descritos (Kieser *et al.*, 2000), empleando como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUB307 o *E. coli* ET12567/pUZ8002, conteniendo el plásmido de interés. Para la conjugación se usaron esporas de *Streptomyces* procedentes de *stock* de almacenamiento o micelio de un cultivo de 1 día en TSB. Las esporas y las células *E. coli* se lavaron con medio 2xTY fresco, para eliminar el glicerol y el antibiótico respectivamente. Mientras que el micelio se lavó con glucosa 10,3 %. Las esporas además, se sometieron a un choque térmico de 50 °C durante 10 minutos para inducir su germinación. Finalmente, las células *E. coli* y las esporas o el micelio de *Streptomyces* se mezclaron y sembraron por extensión en placas con 25 mL de medio MS suplementado con cloruro de magnesio hasta obtener la concentración final de 1 mM. Las placas se incubaron unas 18 h a 30 °C antes de ser cubiertas con 1,5 mL de H₂O conteniendo ácido nalidíxico y el antibiótico de selección correspondiente a las concentraciones adecuadas para los 25 mL de medio de la placa. Las placas se incubaron a 30 °C hasta la aparición de colonias aisladas.

8. Secuenciación de ADN

El servicio de secuenciación de *Eurofins Genomics* fue el utilizado para la secuenciación de fragmentos de PCR y construcciones plasmídicas. Los resultados aportados por este servicio se analizaron con el programa de análisis de secuencias *SnapGene* (Insighful Science) y la herramienta bioinformática BLAST de NCBI (Altschul *et al.*, 1990).



9. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el trabajo se diseñaron partiendo de las secuencias nucleotídicas que se deseaban amplificar, para ello se utilizó el *software SnapGene* (Insighful Science). Como criterios se tomaron, la proporción de C+G; el tamaño; la temperatura de desnaturalización; las posibles hibridaciones entre parejas de cebadores; así como hibridaciones intracatenarias que pudieran interferir en la reacción de amplificación, para ello se utilizó la herramienta *OligoAnalyzer™ Tool* (IDT). Algunos de los oligonucleótidos diseñados presentan en su extremo 5' secuencias específicas añadidas que denominamos “colas”. Estas colas sirven como dianas de enzimas de restricción específicas o zonas de homologías con otros fragmentos. Esto genera la creación de extremos indispensables para permitir la clonación en sitios específicos o el ensamblaje de Gibson (Gibson *et al.*, 2009).

Los oligonucleótidos utilizados, así como las colas añadidas, se encuentran recogidos en las Tablas 10 a 16.

Tabla 10. *Oligonucleótidos utilizados para los cribados por PCR de genes ssfH*

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Deg_F1	CTGMTGCAYCTSGTCGTBCC
Deg_F3	TSGCSGGSACCCGSGCS
Deg_ssfH_F1	TACGGCTGGDSSGCSTTCGARYTSKC
SsfH-Deg-F1-	RCTGGMGS GCSTACGGMTGG
SsfH-Deg-F2-	CCSRCSCGBTCTTCMTGYT
ssfH_63_F1	TTCGAGAAGAGGCTGAGGCTGCCC
ssfH_50_F1	ACGACCGCGAGTCCTTGCGCC
ssfH_50_F4	GCCGCAGAGATCGTCCTGGACCACAA
Deg_ssfH_R1	TABGCSGCGKCCTTSGGBAYVCC
Deg_ssfH_R2	ATSCCSGCDCCGGCSTGCAGC
SsfH-Deg-R2-	CGCAGSACSAYSGCSGCYTCCA
SsfH-Deg-R1-	AGTTCTCSSBGGTCTCCTC
Deg_R3	GCACCGMCSCGVAGHCA
ssfH_63_R1	ATCTCCTTCGGGTCCGCGAGG
ssfH_50_R1	TTCTCGCAGGTCTCCTCGAACTCCC

En los oligonucleótidos degenerados la presencia de las letras que no corresponden con los nucleótidos clásicos del ADN se corresponden con mezclas aleatorias de alguno de ellos, según las siguientes normas **B:** C o G o T; **D:** A o G o T; **H:** A o C o T; **K:** G o T; **M:** A o C; **R:** A o G; **S:** G o C; **V:** A o C o G; **Y:** C o



Tabla 11. *Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes*

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Construcción	Mutante
ssfH_50_F1	ACGACCGCGAGTCCTTGCGCC	pOJ-Δcs_ssfH-1	Δcs_ssfH-1
ssfH_50_R1	TTCTCGCAGGTCTCCTCGAACTCCC		
F1_mt362_Gib	<u>CCGCCGAAAGTTCCTCGAAGCATGGTGTA</u> CGAGACGGAAGG	pHZ-Δcontig362	Δ362
R1_mt362_Gib	<u>GGCATCAGTTACCGTGAGCCTCGAGACCG</u> GTCGTGTCCA		
F2_mt362_Gib	<u>CTTGACATTGGGGAATTGACGCGTGGACG</u> CCGCCGTCACGA		
R2_mt362_Gib	<u>CGGGGACCTGCAGGTCGACTGGCTGTACG</u> GGTCCGACGGG		
F_BglII_glau	AAAAGATCTAACCCGGCCGACATCTCCG	pHZ-Δorf12	Δorf12g
R_HindIII_glau	TTTAAGCTTTTCCAGCGCTCCTCGGTCACC		
F_BamHI_glau	TTGGATCCATGCCGCCCTGGTACTGCG		
R_NotI_glau	TAGCGGCCGCATAGCGGAACATGCGGGCCG		
F1_Δ4355_glau	<u>CTTGACATTGGGGAATTGACGCGCACGTCG</u> CACTCGCGGTGAT	pHZ-Δorf14	Δorf14g
R1_Δ4355_glau	<u>CGGGGACCTGCAGGTCGACTCCGCGCGCC</u> GGCGGTGATCA		
F2_Δ4355_glau	<u>CCGCCGAAAGTTCCTCGAAGTCGATGCGG</u> GTACCCACGCGTT		
R2_Δ4355_glau	<u>GGCATCAGTTACCGTGAGCGACAGCGGAC</u> CGGTGATGTCGAGGAA		
R1_Gib_NRPS23-24	<u>CGGGGACCTGCAGGTCGACTCGCGAAGCG</u> GGTGCCGCTGT	pHZ-Δorf23-24	Δorf23-24g
F1_Gib_NRPS23-24	<u>CTTGACATTGGGGAATTGACGCGCGGGACT</u> GGGCGCGCTGA		
R2_Gib_NRPS23-24	<u>GGCATCAGTTACCGTGAGCGTTCGCTCTCG</u> CGTTCAACT		
F2_Gib_NRPS23-24	<u>CCGCCGAAAGTTCCTCGAAGGGGAGGAGG</u> TGATCGGCTAC		
F1_ter36_gib	<u>CCGCCGAAAGTTCCTCGAAGGAATCCGTG</u> CCTGGGAGCGG	pHZ-Δorf36	Δorf36g
R1_ter36_gib	<u>GGCATCAGTTACCGTGAGCGTCGTGGCCC</u> CGATGCCGAT		
F2_ter36_gib	<u>CTTGACATTGGGGAATTGACGCCGGAGCT</u> GGCCGCGCAGGA		
R2_ter36_gib	<u>CGGGGACCTGCAGGTCGACTTCATGCCCA</u> GGTGCTCGGTG		

Se muestran subrayadas las secuencias especiales que se usan como colas. Siendo 5'-CCGCCGAAAGTTCCTCGAAG-3'; 5'-GGCATCAGTTACCGTGAGC-3'; 5'-CTTGACATTGGGGAATTGACG-3' y 5'-CGGGGACCTGCAGGTCGACT-3' las secuencias responsables del ensamblaje de Gibson. El resto secuencias subrayadas se corresponde con dianas de reconocimiento para enzimas de restricción: 5'-AGATCT-3' para BglII; 5'-AAGCTT-3' para HindIII; 5'-GGATCC-3' para BamHI; y 5'-GCGGCCGC-3' para NotI.



Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes con sobreexpresión

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Construcción	Mutante
F_AsfR_glau	TTGGATCCGCGCCGACGCACGACCGGACG	pSETETc-orf11	+orf11g
R_AsfR_glau	TTGAATTCCTCACAGGGAGACGGTGCGGACG		
F_LuxR29_XbaI	ATTCTAGAGGCGGGAGAGATTGCGCCACGG	pSETETc-orf29	+orf29g
R_LuxR29_NotI	TTGCGGCCGCTCAGATCCAGTGGGAATCCC GCGCGATACG		
F_erm_24_XbaI	AATCTAGACGGCCCCATGTCATCGTGATGA CCGTTACCA	pOJ260*p-Eorf24	Eorf24g
R_erm_24_EcoRI	TTGAATTCCTTGTAGCAGGAACCGCTCCTCGC CGCTCCA		
F_erm_33_EcoRI	ATGAATTCGGTATCAACCATGAACTCGGA TGGGGCC	pOJ260*p-Eorf33	Eorf33g
R_erm_33_XbaI	AATCTAGACCTCCTAGGTTGTGGCGCCTTC AGGT		

Se muestran subrayadas las secuencias especiales que se usan como colas y que son dianas para enzimas de restricción, siendo 5'-GGATCC-3' para BamHI; 5'-GAATTC-3' para EcoRI; 5'-TCTAGA-3' para XbaI; y 5'-GCGGCCGC-3' para NotI.

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes en *Streptomyces* sp. CS123

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado		Cepa resultante
		Silvestre	Transconjugante	
ssfH_50_F1	ACGACCGCGAGTCCTTGCG CC	-	1 Kb	Δcs_ssfH-1
M13R	CAGGAAACAGCTATGA			
M13F	GTAAAACGACGGCCAG			
ssfH_50_R1	TTCTCGCAGGTCTCCTCGAA CTCCC	-	1 Kb	
contig_F2	ACGCGGGTGCTCTCGCGCC	1,9 Kb	-	Δ362
contig_R1	TCTCACGGCGGCCCGTGCC			
contig_F2	ACGCGGGTGCTCTCGCGCC			
contig_R5	GCGGGAAGTGGTCCCCGTTG ACGAG	4,1 Kb	1,7 Kb	



Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes en *Streptomyces glaucescens* GLA.O

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado		
		Silvestre	Transconjugante	Cepa resultante
F_Full_ssfH_glau	TTTCCCACCGGTCGCTCGCT TTCC	1,6 Kb	2,2 Kb	Δorf12g
R_Full_ssfH_glau	TTCCGTCCGGTCGTGCGTCGG			
F_comp_Δ4355_XbaI	AATCTAGATGCGGTAAAAC GCCTCACCCCGCT	1,9 Kb	4,1 Kb	Δorf14g
R_comp_Δ4355_NotI	AAGCGGCCGCGGGGCCG ACGACCGGCC			
F_NRPS4405BamHI	TTGGATCCCCGGCCCCATGTC ATCGTGATGACCGTTACCAG	6,7 Kb	1,8 Kb	Δorf23-24g
R_NRPS4400EcoRI	TTGAATTCTCACACCGCACCC TCTTCGAGTCGTC			
F_ter36_NotI	AAGCGGCCGCACACGTTCTG AAATTAGCACTGGGGGCAGG	0,8 Kb	1,8 Kb	Δorf36g
R_ter36_EcoRI	ATGAATTCCACCGCTCCGC CGGGTACGGCCGCT			

Tabla 15. Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de mutantes con sobreexpresión en *Streptomyces glaucescens* GLA.O

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado		
		Silvestre	Transconjugante	Cepa resultante
ermE_up	TAGCTTGCGAGTGTCCTG			
R_AsfR_glau	TTGAATTCTCACAGGGAGAC GGTGCGGACG	-	2,6 Kb	+orf11g Δorf12g+orf29
ermE_up	TAGCTTGCGAGTGTCCTG			
R_LuxR29_NotI	TTGCGGCCGCTCAGATCCAG TGGAATCCC GCGGATACG	-	0,9 Kb	+orf29g Δorf36g+orf29
ermE_compro_24	CCGGACAGGTCGGCCTCGAC CAGCA	-	3,5 Kb	Eorf24g
ermE_up	TAGCTTGCGAGTGTCCTG			
ermE_compro_33	CGCTCGAAGGGGTGGTAGA AGTGGTGCC	-	3,5 Kb	Eorf33g
ermE_up	TAGCTTGCGAGTGTCCTG			
Tsr 1	AGTCTAGAAATACTTCATA TGCGGGGATC			
Tsr 2	TATCTAGAAACAGAGGCGC TTATCGG	-	1 Kb	S. glau+pset



Tabla 16. Otros oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Uso
ApraGib-F	GCTCACGGTAACTGATGCC	Obtención del <i>cassette</i> del gen de resistencia <i>aac(3)IV</i>
ApraGib-R	CGTCAATTCCCCAATGTCAAG	
Comp-gib	AAAAACAGCGCATAACAGAACATCCGTCG	Comprobación de plásmidos generados por el método de Gibson
Comp_Gib_2	TAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGG	
Comp_G	ACGTCCCATGCGCTCCATCAAGAAGA	
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	Secuenciación de plásmidos
M13R	CAGGAAACAGCTATGA	

aac(3)IV: gen de la aminoglicósido acetil-transferasa que confiere resistencia a apramicina y tobramicina.

10. Generación de construcciones plasmídicas para cepas mutantes

En las Tablas 17 a 19 se muestran los plásmidos diseñados y utilizados en este trabajo.

Tabla 17. Plásmidos utilizados para la generación de cepas mutantes en la cepa *Streptomyces sp. CS123*

Plásmido	Tamaño (Kb)	Uso	Referencia
pCR-Blunt-cs_ssfH-1	4,5	Obtención de un reservorio del gen <i>cs_ssfH-1</i>	Este trabajo
pOJ260-Δcs_ssfH-1	4,5	Disrupción génica del gen <i>cs_ssfH-1</i>	Este trabajo
pHZ-Δcontig362	16,4	Reemplazamiento génico de la <i>orf3-orf4</i> y disrupción de las <i>orf2</i> y <i>orf5</i> del contig 362	Este trabajo

cs_ssfH-1: gen homólogo en *Streptomyces sp. CS123* al gen *ssfH* de tetraciclina SF2575.

Tabla 18. Plásmidos utilizados para la generación de cepas mutantes en genes del BGC 8 en la cepa *Streptomyces glaucescens GLA.O*

Plásmido	Tamaño (Kb)	Uso	Referencia
pUO9090_A12	6,5	Proporcionar el fragmento A (<i>orf11-orf12'</i>) y el <i>cassette aac(3)IV</i>	Este trabajo
pUO9090_AB12	8,5	Proporcionar el fragmento B (<i>orf12-orf13'</i>) al existente plásmido pUO9090_A	Este trabajo
pHZ-Δorf12	16,3	Reemplazamiento génico de la <i>orf12</i> por el <i>cassette aac(3)IV</i>	Este trabajo
pHZ-Δorf14	16,5	Reemplazamiento génico de la <i>orf14</i> por el <i>cassette aac(3)IV</i>	Este trabajo
pHZ-Δorf23-24	16,3	Reemplazamiento génico de la <i>orf23-24</i> por el <i>cassette aac(3)IV</i>	Este trabajo
pHZ-Δorf36	16,5	Reemplazamiento génico de la <i>orf36</i> por el <i>cassette aac(3)IV</i>	Este trabajo

orf11-orf12': fragmento que contiene la secuencia correspondiente a *orf11* y *orf12* pero incompleta en ambos extremos; *orf12-orf13'*: fragmento que contiene la secuencia correspondiente a *orf12* y *orf13* pero incompleta en ambos extremos; *aac(3)IV*: gen de la aminoglicósido acetil-transferasa que confiere resistencia a apramicina y tobramicina.



Tabla 19. Plásmidos utilizados para la generación de cepas con sobreexpresión de genes del BGC 8 en la cepa *Streptomyces glaucescens* GLA.O

Plásmido	Tamaño (Kb)	Uso	Referencia
pSETETc-orf11	8,9	Sobreexpresión de la <i>orf11</i>	Este trabajo
pSETETc-orf29	7,6	Sobreexpresión de la <i>orf29</i>	Este trabajo
pOJ260*p-Eorf24	6,8	Sobreexpresión de la <i>orf24</i>	Este trabajo
pOJ260*p-Eorf33	6,6	Sobreexpresión de la <i>orf33</i>	Este trabajo

10.1. Generación del plásmido pCR-Blunt-cs_ssfH-1

Para mantener almacenados y poder secuenciar los amplicones potencialmente interesantes obtenidos con los oligonucleótidos, diseñados a partir de proteínas SsfH (Tabla 10), estos se clonaron en el vector pCR[®]-Blunt (Invitrogen) (Tabla 9). Para ello se utilizó el *kit* comercial *Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit* (Invitrogen), siguiéndose las indicaciones de la casa comercial, que permite la clonación de amplicones con extremos romos, como los producidos por la polimerasa *Herculase II Fusion[®]* (Agilent Technologies). El fragmento clonado en el vector pCR[®]-Blunt queda flanqueado por dos sitios EcoRI (Figura 10).

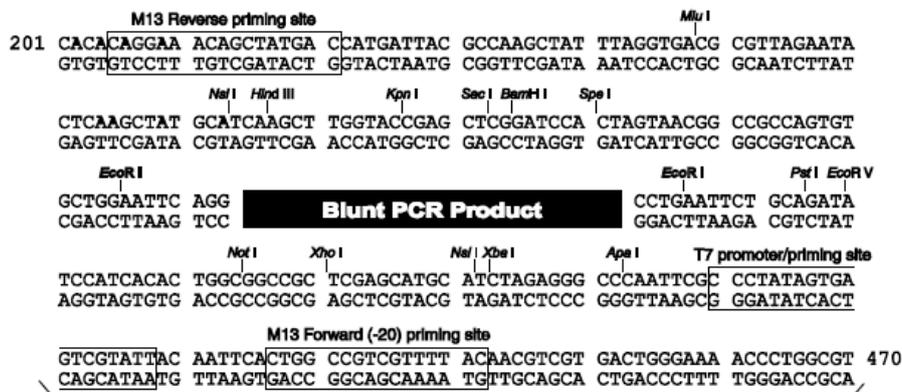


Figura 10. Se muestra parte de la secuencia nucleotídica del vector comercial pCR[®]-Blunt de Invitrogen. Se indica el lugar de inserción de los fragmentos romos. Imagen obtenida del manual de uso *Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit*, número *part* del documento 250162 y número de publicación MAN0000040.

Gracias a este método se pudo obtener el plásmido pCR-Blunt-cs_ssfH-1, que porta entre dos sitios EcoRI un fragmento interno del gen *ssfH-1* de la cepa CS123, de aproximadamente 1 Kb. Este fragmento fue amplificado utilizando los oligonucleótidos *ssfH_50_F1* y *ssfH_50_R1* (Tabla 10) (Figura 11). Las células transformadas con esta construcción se sembraron en medio 2xTY sólido suplementado con isopropil-β-D-1-



tiogalactopiranosido (IPTG), 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido (X-gal) y el antibiótico kanamicina. Este medio permite diferenciar por color las células portadoras de la construcción final, puesto que el inserto interrumpe el gen *lacZ α* haciendo que la colonia sea blanca en lugar de azul, que indicaría la religación del vector.

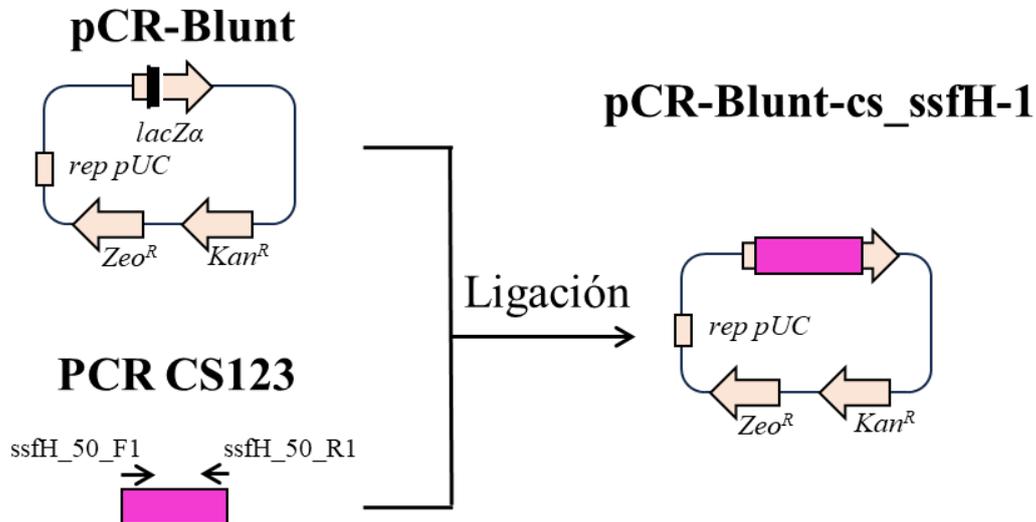


Figura 11. Representación esquemática para generar el plásmido pCR-Blunt-cs_ssfH-1. *rep pUC*: origen de replicación de *E. coli*; *lacZ α* : enzima β -galactosidasa; *Kan^R*: resistencia a kanamicina; *Zeo^R*: resistencia a zeocina.

10.2. Generación de mutantes

Las cepas mutantes generadas en este trabajo presentan la eliminación o inactivación de al menos un gen. Para la producción de este tipo de cepas existen muchas estrategias disponibles, sin embargo en este trabajo se ha hecho uso de tan solo dos de ellas. La disrupción génica, con la que se ha generado una cepa, y el reemplazamiento génico, con el que se han generado el resto de las cepas. A su vez, el reemplazamiento génico se ha realizado con dos metodologías diferentes según la cepa generada. En su mayoría se han construido plásmidos mediante el ensamblaje de Gibson de un único paso (Gibson *et al.*, 2009), y para la generación de una de las cepas se utilizó un plásmido construido según la estrategia convencional de tres ligaciones y transformaciones sucesivas.



10.2.1. Construcción de plásmidos para la interrupción de genes

En este trabajo una de las cepas mutantes ha sido generada por interrupción génica, produciendo la inserción del plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga simple y así, interrumpiendo el gen diana que se desea inactivar. Esto genera dos copias inactivas de dicho gen. Para la obtención de este tipo de mutantes se utilizó el plásmido pOJ260, replicativo en *E. coli* pero no en *Streptomyces*, donde es suicida (Bierman *et al.*, 1992). Es en este plásmido donde, mediante el uso de enzimas de restricción específicas, se debe clonar una región interna del gen a inactivar generando el plásmido pOJ260- ΔX , siendo X el gen diana. La región del gen ha de tener un tamaño de aproximadamente 1 Kb para favorecer la recombinación. Las células portadoras de esta construcción mostraran resistencia al antibiótico de selección apramicina (Figura 12).

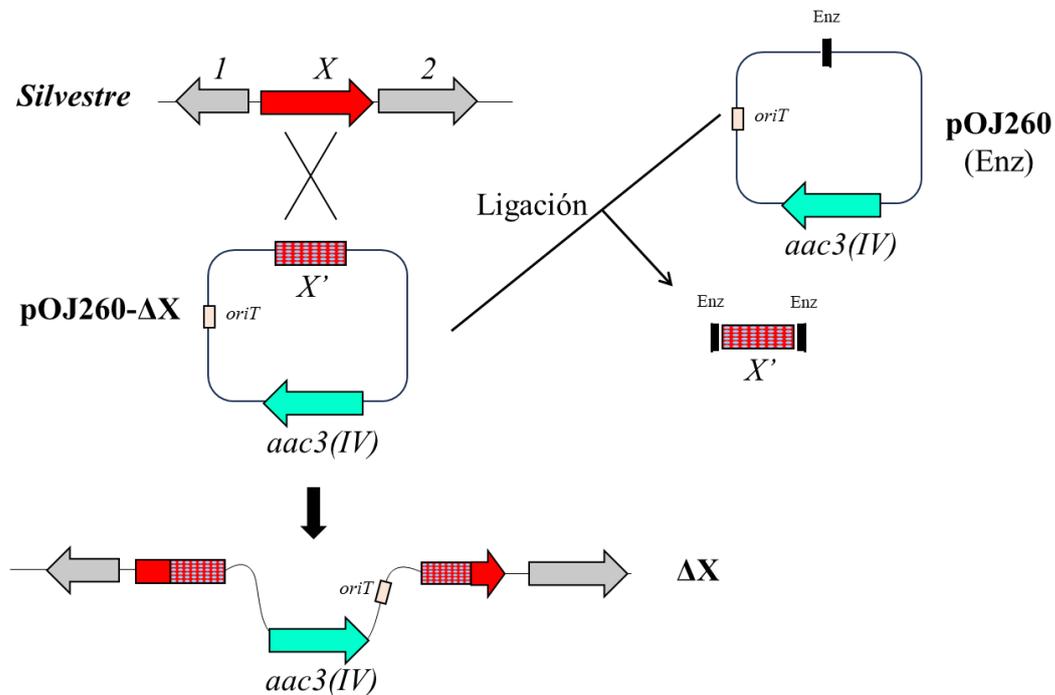


Figura 12. Representación esquemática de la construcción del plásmido pOJ260- ΔX y representación esquemática de la recombinación homóloga simple para la generación de una cepa mutante en el gen X por interrupción génica con este plásmido. **Enz**: sitio de corte para enzimas de restricción específicas; **X'**: gen X incompleto. **oriT**: origen de transferencia a *Streptomyces*; **aac(3)IV**: gen de resistencia a apramicina.



10.2.1.1. Plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1

El plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1 (Tabla 17 y Figura 13) se utilizó para la generación de la cepa Δ cs_ssfH-1 en CS123 (Tabla 3). La construcción de este plásmido tuvo lugar a partir del plásmido pCR-Blunt-CS_ssfH-1 (apartado 10.1.), un plásmido que contiene un fragmento del gen *ssfH-1* de la cepa CS123. El plásmido pCR-Blunt-CS_ssfH-1 se digirió con la enzima de restricción EcoRI, lo que produjo la liberación de un fragmento de 1 Kb correspondiente a parte del gen *ssfH-1*. Posteriormente este fragmento se clonó en el plásmido pOJ260 previamente digerido con la enzima EcoRI, obteniéndose el plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1 de 4,5 Kb (Figura 13). Puesto que la clonación se realizó con una única enzima el fragmento del gen *ssfH-1* podía insertarse en cualquiera de las dos orientaciones. Con el uso de los oligonucleótidos M13F y M13R (Tabla 16) se pudo conocer la orientación obtenida. En cualquier caso, la orientación del inserto no es algo relevante cuando se utiliza el plásmido pOJ260, ya que la disrupción del gen se producirá con cualquiera de las dos orientaciones. El plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1 se utilizó para conjugar la cepa CS123, cuyos transconjugantes se seleccionaron por su resistencia al antibiótico apramicina.

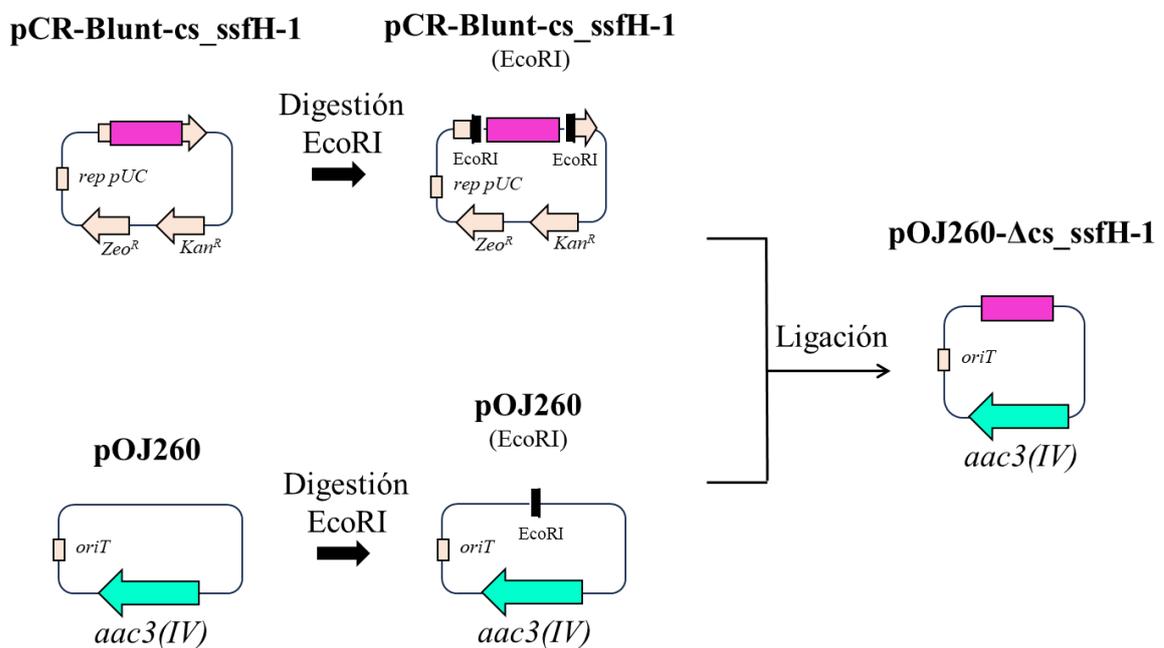


Figura 13. Construcción del plásmido pOJ260- Δ cs_ssfH-1. *rep pUC*: origen de replicación de *E. coli*; *Kan^R*: resistencia a kanamicina; *Zeo^R*: resistencia a zeocina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac3(IV)*: gen de resistencia a apramicina



10.2.2. Plásmidos para la eliminación de genes

En este trabajo el resto de las cepas mutantes han sido generadas por reemplazamiento génico, una técnica que permite la sustitución específica de una región del cromosoma por un marcador de selección, gracias a un evento de doble recombinación. El marcador de selección utilizado ha sido el gen *aac(3)IV*, que confiere resistencia al antibiótico apramicina, y para obtener el plásmido de conjugación final siempre se ha utilizado el pHZ1358, que es un plásmido conjugativo e inestable en *Streptomyces* (Sun *et al.*, 2009). Para que la doble recombinación homóloga se lleve a cabo deben obtenerse las regiones adyacentes al gen a reemplazar, estas han de tener un tamaño de alrededor de 2 Kb, para que el evento de recombinación sea favorable. Además estas regiones deben flanquear al *cassette* de resistencia en la misma dirección en la que flanquean al gen original. Al estar en esta orientación, cuando la recombinación homóloga doble tenga lugar, el gen *aac(3)IV* quedará integrado en el cromosoma, reemplazando la región original y en la misma orientación que el gen reemplazado. Cuando el evento de recombinación se ha llevado con éxito la cepa resultante presenta resistencia al antibiótico apramicina y sensibilidad a tioestreptona, pues en la doble recombinación pierde esta *cassette* de resistencia a tioestreptona que posee el plásmido original pH1358 (Figura 14).

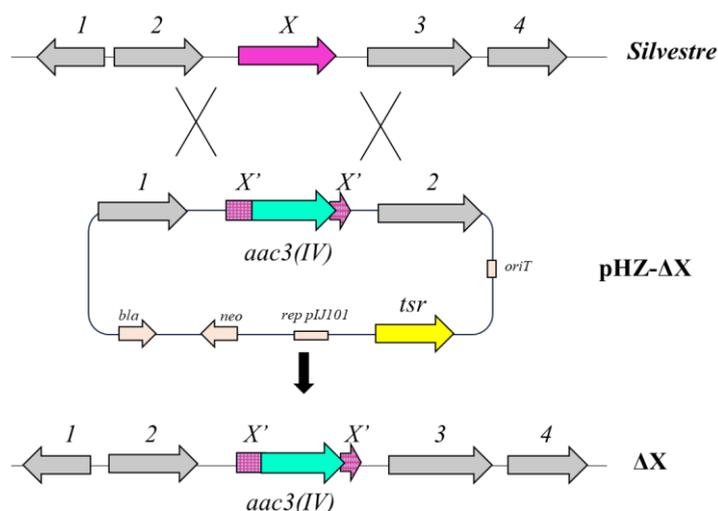


Figura 14. Representación esquemática de la recombinación homóloga doble para la generación de una cepa mutante en el gen *X* por reemplazamiento génico con el plásmido pHZ- Δ X. *X'*: extremos del gen *X*. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



En este trabajo la construcción de la mayoría de los plásmidos pHZ- Δ X, se han generado gracias al ensamblaje de Gibson de un único paso (Gibson *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las cepas mutantes se generó gracias a un plásmido obtenido por el ensamblaje convencional, que consta de tres clonaciones y tres transformaciones celulares sucesivas para obtener el plásmido final pHZ- Δ X.

10.2.2.1. Generación de pHZ- Δ X en tres pasos: Método Convencional

El método convencional para la generación de un plásmido pHZ- Δ X conlleva tres clonaciones sucesivas. Estas se basan en ligaciones por sitios específicos producidos por enzimas de restricción. A cada evento de clonación le sucede una transformación celular, en el caso de este trabajo en células *E. coli* DH10B, como se indica en el apartado 6.1. Posteriormente se realiza la comprobación del plásmido resultante por secuenciación antes de la siguiente clonación. Como se indica en el apartado anterior 10.1.2., en la generación del pHZ- Δ X es necesario obtener las regiones adyacentes al gen a reemplazar y clonarlas en una orientación determinadas junto con el *cassette* de resistencia. Esto se consigue clonando inicialmente un primer fragmento A en el plásmido pUO9090, el cual contiene el *cassette* de resistencia (Tabla 9), generando el plásmido pUO9090_A en el que se clonará el fragmento B. De esta manera se obtiene el pUO9090_AB en el que el *cassette* de apramicina queda flanqueada por las regiones adyacentes del gen a reemplazar y en la orientación adecuada. Finalmente, el *cassette* de reemplazamiento es rescatada por digestión enzimática, gracias a dos sitios de corte idénticos, existentes a cada lado del fragmento final, y es clonada en el plásmido pHZ1358 digerido previamente. Estas dos últimas digestiones realizadas con SpeI y XbaI generan extremos compatibles que permiten la ligación en cualquiera de las dos orientaciones generando el plásmido final pHZ- Δ X (Figura 15). Cualquiera de las dos orientaciones resultantes del plásmido pHZ- Δ X es válida para generar la doble recombinación homóloga, que será exitosa cuando los transconjugantes resultantes muestren resistencia al antibiótico apramicina y sensibilidad a tioestreptona.

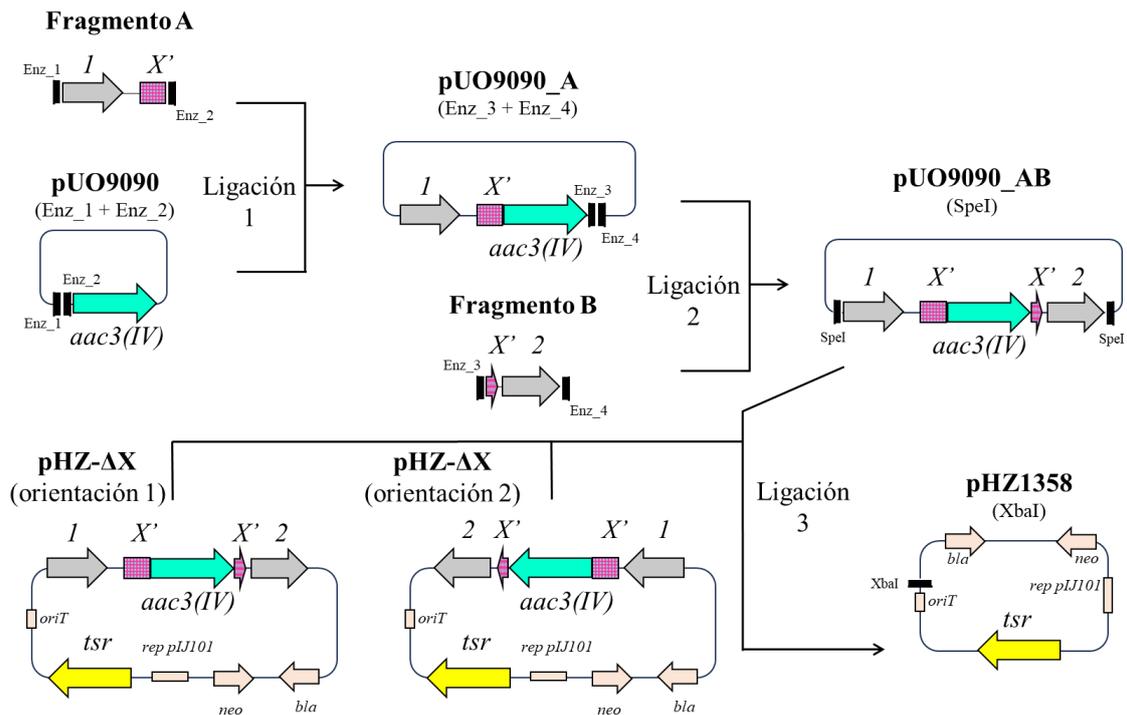


Figura 15. Representación esquemática de la generación de un plásmidos pHZ- Δ X por metodología convencional. **Enz_1-Enz_4:** enzimas de restricción específicas; **Fragmento A y Fragmento B:** regiones adyacentes al gen a reemplazar; **X':** extremos del gen a reemplazar. ***aac(3)IV:*** gen de resistencia a apramicina; ***tsr:*** gen de resistencia a tioestreptona; ***bla:*** gen de la β -lactamasa; ***neo:*** resistencia a neomicina; ***oriT:*** origen de transferencia a *Streptomyces*; ***rep pIJ101:*** origen de replicación inestable de *Streptomyces*.

10.2.2.1.1. pHZ- Δ orf12

La construcción pHZ- Δ orf12 (Tabla 18) se utilizó para la generación del mutante Δ orf12g (Tabla 3). Para ello se amplificaron por PCR los fragmentos adyacente a la *orf12* del BGC 8, denominados Fragmento_A12 y Fragmento_B12 de 1997 pb y 1983 pb respectivamente. El Fragmento_A12 que contiene casi en su totalidad la *orf11* y el extremo 3' de la *orf12*, se amplificó utilizando los oligonucleótidos F_BglII_glau, R_HindIII_glau (Tabla 11), que contienen colas con sitios de corte para las enzimas BglII y HindIII respectivamente. Mientras que el Fragmento_B12 que contiene el extremo 5' de la *orf12* y el extremo 3' de la *orf13*, se amplificó utilizando los oligonucleótidos F_BamHI_glau y R_NotI_glau (Tabla 11), cuyas colas poseen dianas de corte para las enzimas BamHI y NotI respectivamente. El Fragmento_A12 se clonó como un fragmento BglII-HindIII en los mismo sitios de corte del plásmido pUO9090, aguas abajo del *cassette* de apramicina, generando el plásmido pUO9090_A12. Este plásmido se digirió con las enzimas BamHI y NotI para clonar en él el Fragmento_B12 digerido previamente



con las mismas enzimas. Así se generó el plásmido pUO9090_AB12 donde el *cassette* de resistencia está flanqueada por estos fragmentos. Del plásmido pUO9090_AB12 se liberó el *cassette* de reemplazamiento correspondiente a 5444 pb, utilizando los sitios de corte para la enzima SpeI que flanquean el mismo. Finalmente, el *cassette* de reemplazamiento se clonó en el sitio XbaI de pHZ1358, generando la construcción pHZ- Δ orf12 (Figura 16). La orientación del plásmido pHZ- Δ orf12 se obtuvo por secuenciación utilizando el oligonucleótido M13F (Tabla 16).

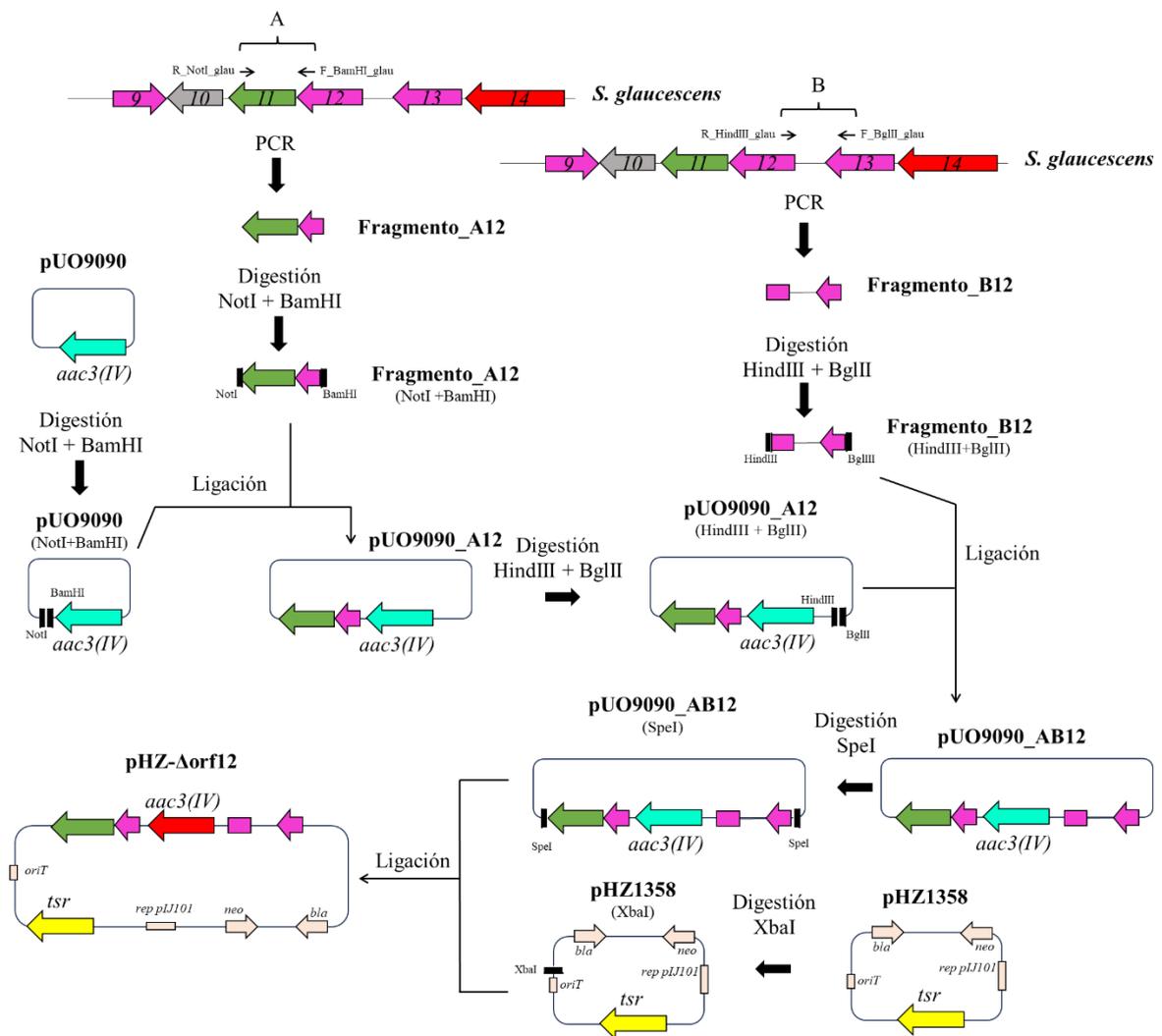


Figura 16. Representación esquemática de la construcción del plásmido pHZ- Δ orf12 para la generación del mutante Δ orf12g. *aac3(IV)*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



10.2.2.2. Generación de pHZ-ΔX en un paso: Método de Gibson

Para la generación de la mayoría de los plásmidos utilizados para construir mutantes por reemplazamiento génico, se llevó a cabo el método de ensamblaje de Gibson (Gibson *et al.*, 2009). Este método permite ensamblar secuencias de ADN que presenten extremos solapantes en una sola reacción. Esto sucede debido a que los extremos solapantes obtenidos durante la amplificación por PCR, pasan a ser extremos 3' monocatenarios solapantes por acción de enzimas con actividad 5' exonucleasa. Sucesivamente la ADN polimerasa rellena los huecos entre las dos cadenas de ADN de hebra simple solapantes para que finalmente, los extremos 5' y 3' de los fragmentos resultantes sean unidos por acción de la ADN ligasa. Las regiones solapantes de los fragmentos se obtienen al introducir colas de aproximadamente 20 nucleótidos en el extremo 5' de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de dichos fragmentos (Tabla 11). Estas colas se encuentran estandarizadas ya que el *cassette* de resistencia a apramicina utilizada, ha sido siempre obtenida del mismo modo, por amplificación a partir del vector pUO9090 (Tabla 9) con los oligonucleótidos ApraGib-F y ApraGib-R (Tabla 16) (cola del Fragmento_A: 5'-CTTGACATTGGGGAATTGACG-3'; cola del Fragmento_B: 5'-GGCATCAGTTACCGTGAGC-3'). De igual forma sucede con los extremos solapantes con el vector pHZ1358, digerido con las enzimas XbaI y NheI, (cola del Fragmento_A: 5'-CGGGGACCTGCAGGTCGACT-3'; cola del Fragmento_B: 5'-CCGCCGAAAGTTCCTCGAAG-3'). Por tanto, la amplificación del *cassette* de resistencia a apramicina y la digestión del vector pHZ1358 son comunes para todas las construcciones, y en el diseño de oligonucleótidos específicos para cada fragmento ha de añadirsele la cola correspondiente (Figura 17).

Como se ha indicado, el fragmento que contiene el *cassette* de resistencia a apramicina se obtiene del vector pUO9090 usando unos oligonucleótidos sin colas, pues los Fragmentos_A y B ya contienen las regiones solapantes. Sin embargo, el fragmento con el *cassette* de resistencia sí debe ser tratado con la enzima DpnI antes de su uso, para eliminar los restos de ADN plasmídico metilado residuales y que no puedan interferir en la reacción de Gibson. Por otro lado, el vector pHZ1358 digerido con las enzimas XbaI y NheI debe ser desfosforilado para evitar la religación espontánea, ya que estas enzimas producen extremos compatibles.



Para llevar a cabo la reacción de Gibson se siguió el manual de instrucciones de *Gibson Assembly® Cloning kit* (New England BioLabs) para el ensamblaje de hasta cuatro fragmentos, en un volumen de reacción de 20 μ L en los que se añaden 0,5 pmoles de cada fragmento y entre 0,007 y 0,014 pmoles de vector pHZ1358. La reacción se lleva a cabo a 50 °C durante 1 h en el termociclador *SureCycler 8800®* (Agilent Technologies). Los plásmidos pHZ- Δ X resultantes son introducidos en *Streptomyces* por conjugación intergenérica. El reemplazamiento por doble recombinación se habrá producido con éxito cuando los transconjugantes resultantes muestren resistencia al antibiótico apramicina y sensibilidad a tioestreptona.

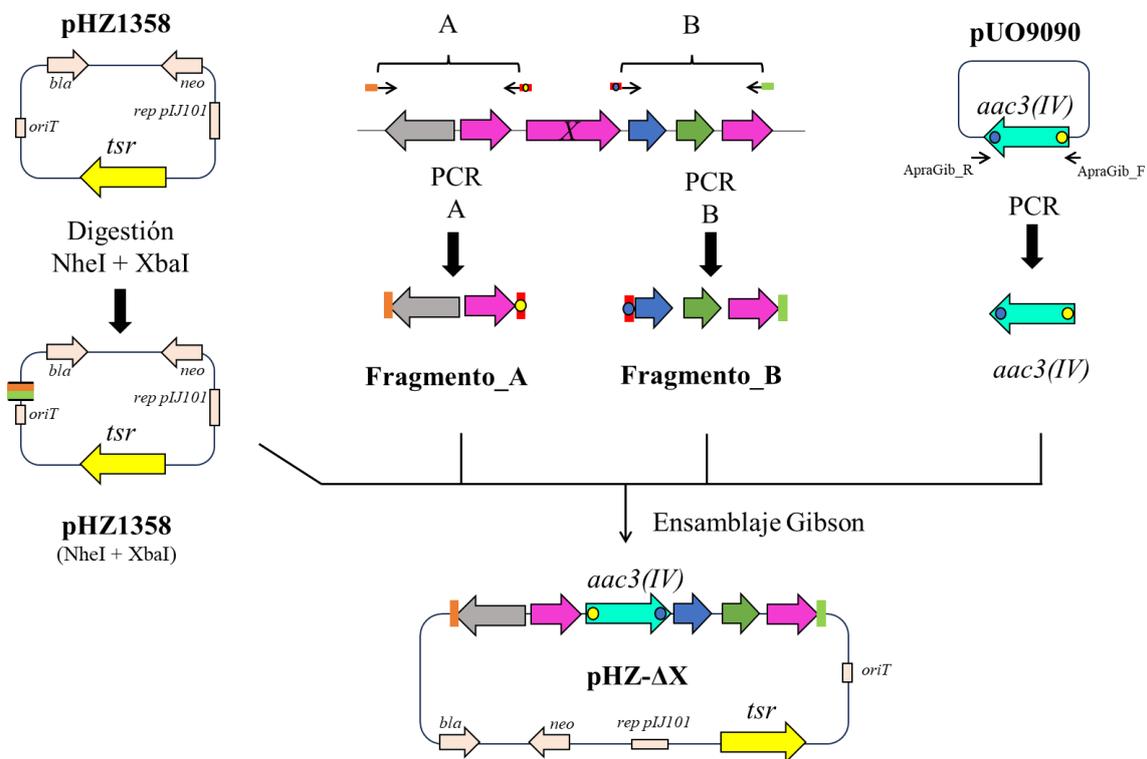


Figura 17. Representación esquemática de la generación de plásmidos pHZ- Δ X mediante el ensamblaje de Gibson. En verde y naranja se representa las secuencias solapantes entre los fragmentos y el vector pHZ1358 digerido. En rojo se muestran las regiones solapantes del *cassette* de resistencia a apramicina, en rojo con un punto amarillo se indica la región solapante del Fragmento_A y en rojo con un punto azul la correspondiente al Fragmento_B. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pLJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



10.2.2.2.1. pHZ- Δ contig362

La construcción pHZ- Δ contig362 (Tabla 17) se generó para obtener un mutante en la cepa CS123 que tuviera inactivados los cuatro genes centrales de la secuencia del *contig* 362, cepa denominada Δ 362 (Tabla 3). Para ello se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes a los extremos del *contig* 362. Estas se denominaron Fragmento_A362 y Fragmento_B362 de 2143 pb y 2065 pb respectivamente. El Fragmento_A362 contiene la *orf1* y el extremo 5' de la *orf2* del *contig*, mientras que el Fragmento_B362 contiene el extremo 3' de la *orf5* y la *orf6* completa. El Fragmento_A362 se obtuvo utilizando los oligonucleótidos F1_mt362_Gib y R1_mt362_Gib, y el Fragmento_B362 se obtuvo con los oligonucleótidos F2_mt362_Gib y R2_mt362_Gib, que contienen las secuencias solapantes necesarias para que se produzca el ensamblaje de Gibson (Tabla 11). Una vez obtenidos los dos fragmentos se les añadió el *cassette* de resistencia *aac(3)IV* y el pHZ1358 digerido con XbaI y NheI a la mezcla de reacción para llevar a cabo el ensamblaje de Gibson. Como resultado se obtuvo el plásmido pHZ- Δ 362 de 16,4 Kb (Figura 18).

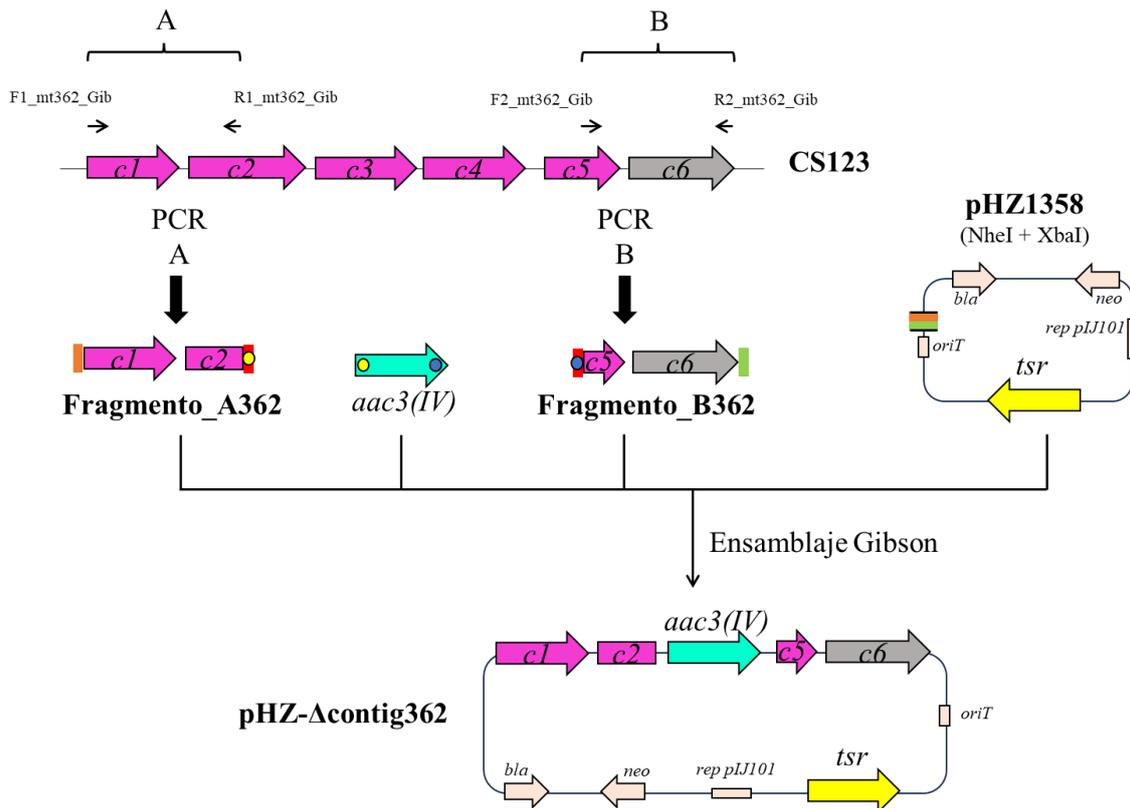


Figura 18. Representación esquemática de la construcción por el método de Gibson del plásmido pHZ- Δ contig362 para la generación del mutante Δ 362. En verde y naranja se representa las secuencias solapantes entre los fragmentos y el vector pHZ1358 digerido. En rojo se muestran las regiones solapantes del *cassette* de resistencia a apramicina, en rojo con un punto amarillo se indica la región solapante del Fragmento_A y en rojo con un punto azul la correspondiente al Fragmento_B. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.

10.2.2.2.2. pHZ- Δ orf14

La construcción pHZ- Δ orf14 (Tabla 18) se generó para la obtención de un mutante *orf14* del BGC 8 de la cepa *S. glaucescens*, el mutante se denominó Δ orf14g (Tabla 3). Para ello, se amplificaron por PCR el Fragmento_A14 y el Fragmento_B14. Los oligonucleótidos F2_ Δ 4355_glau y R2_ Δ 4355_glau se utilizaron para obtener el Fragmento_A14 de 2179 pb (Tabla 11). Estos oligonucleótidos contienen en sus colas las secuencias solapantes que harán posible la clonación del Fragmento_A14 aguas arriba del gen *aac(3)IV* y en la orientación deseada. Mientras que el Fragmento_B14 de 2118 pb se obtuvo gracias a los oligonucleótidos F1_ Δ 4355_glau y R1_ Δ 4355_glau (Tabla 11), cuyas colas permiten que este se clone aguas abajo del gen *aac(3)IV* y en la orientación



deseada. El Fragmento_A14 contiene el extremo 5' de la *orf14*, la *orf15* completa y el extremo 3' de la *orf16*. Por otro lado, el Fragmento_B14 contiene la *orf13* en su totalidad y el extremo 3' de la *orf14*. Para llevar a cabo el ensamblaje de Gibson el Fragmento_A14 y el Fragmento_B14 se añadieron a la reacción junto al *cassette* de resistencia *aac(3)IV* y el pHZ1358 linealizado con XbaI y NheI. Se obtuvo así el plásmido pHZ- Δ orf14 de 16,5 Kb (Figura 19).

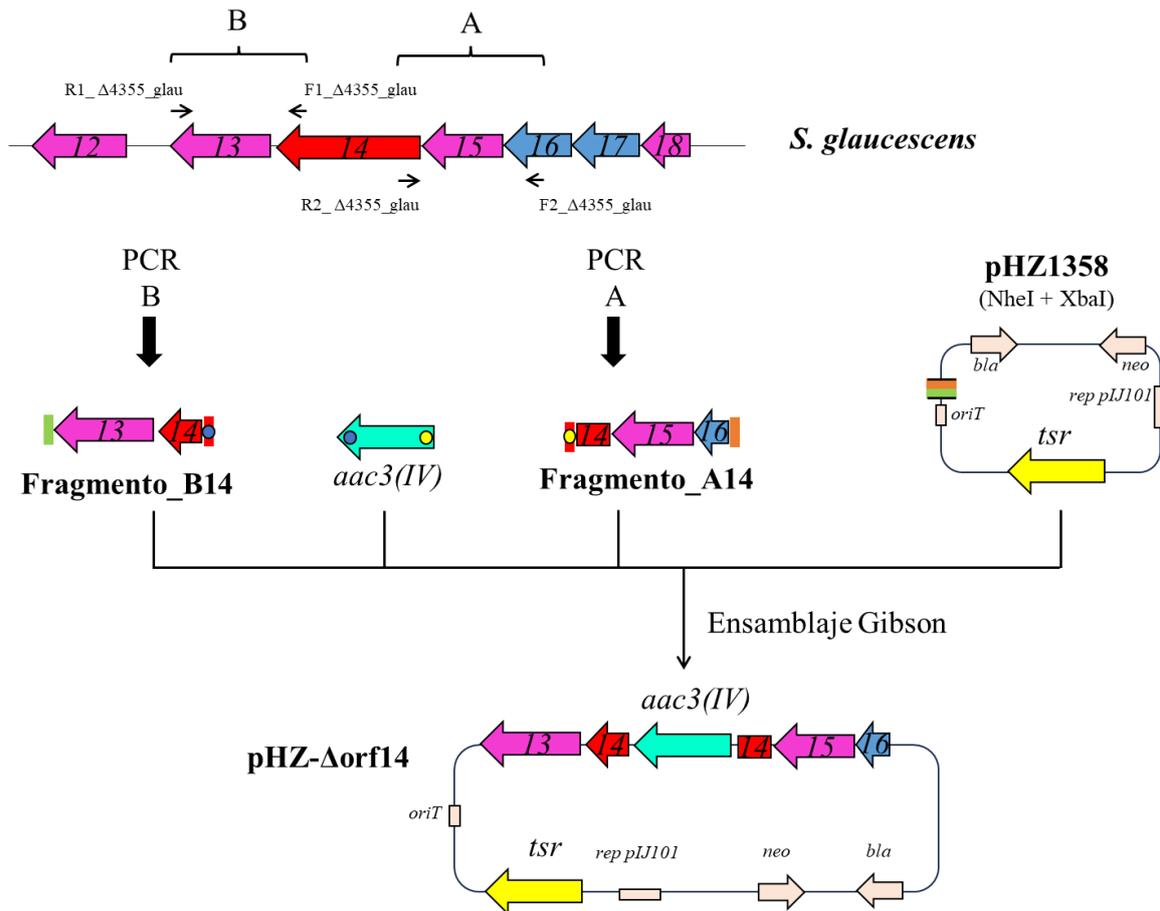


Figura 19. Representación esquemática de la construcción por el método de Gibson del plásmido pHZ- Δ orf14 para la generación del mutante Δ orf14g. En verde y naranja se representa las secuencias solapantes entre los fragmentos y el vector pHZ1358 digerido. En rojo se muestran las regiones solapantes del *cassette* de resistencia a apramicina, en rojo con un punto amarillo se indica la región solapante del Fragmento_A y en rojo con un punto azul la correspondiente al Fragmento_B. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



10.2.2.2.3. pHZ- Δ orf23-24

Para la generación de la cepa mutante Δ orf23-24g (Tabla 3) se diseñó el plásmido pHZ- Δ orf23-24 (Tabla 18). Este plásmido permite el reemplazamiento de la *orf23* y la *orf24* del BGC 8. El pHZ- Δ orf23-24 contiene el *cassette* de resistencia *aac(3)IV* flanqueada en su extremo 5' por el Fragmento_A23-24 de 2066 pb, que se obtuvo por amplificación con PCR usando los oligonucleótidos F2_Gib_NRPS23-24 y R2_Gib_NRPS23-24 (Tabla 11). Este fragmento contiene el extremo 5' de la *orf24*, las *orf25* y *orf26* completas y el extremo 3' de la *orf27*. En el otro extremo del *cassette* de resistencia *aac(3)IV*, el extremo 3', se encuentra el Fragmento_B23-24 de 2063 pb, que se obtiene por amplificación utilizando los oligonucleótidos F1_Gib_NRPS23-24 y R1_Gib_NRPS23-24 (Tabla 11). Este fragmento contiene casi en su totalidad la *orf22*, a excepción de una parte de su extremo 3', y el extremo 3' de la *orf23*. El ensamblaje de Gibson para generar el plásmido pHZ- Δ orf23-24 se llevó a cabo utilizando el Fragmento_A23-24 y el Fragmento_B23-24, junto con *cassette* de resistencia *aac(3)IV* y el pHZ1358 linealizado con las enzimas de restricción XbaI y NheI. El plásmido obtenido presenta un tamaño de 16,3 Kb (Figura 20).

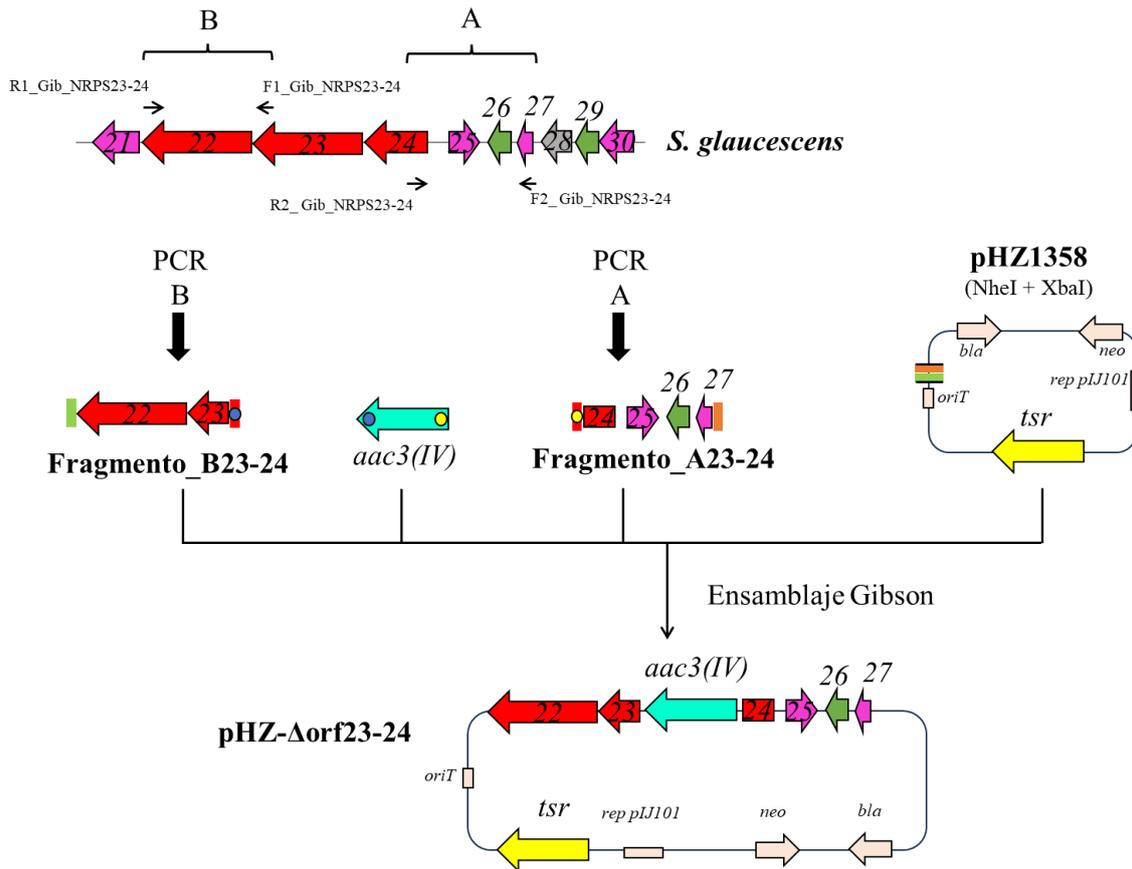


Figura 20. Representación esquemática de la construcción por el método de Gibson del plásmido pHZ- Δ orf23-24 para la generación del mutante Δ orf23-24g. En verde y naranja se representa las secuencias solapantes entre los fragmentos y el vector pHZ1358 digerido. En rojo se muestran las regiones solapantes del *cassette* de resistencia a apramicina, en rojo con un punto amarillo se indica la región solapante del Fragmento_A y en rojo con un punto azul la correspondiente al Fragmento_B. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.

10.2.2.2.4. pHZ- Δ orf36

Para la construcción del plásmido pHZ- Δ orf36 (Tabla 18) utilizado para reemplazar la *orf36* del BGC 8 de *S. glaucescens*, y generar la cepa Δ orf36g (Tabla 3), se amplificaron por PCR las regiones colindantes de la *orf36*. Se utilizaron los oligonucleótidos F1_ter36_gib y R1_ter36_gib, (Tabla 11), para obtener el un amplicón de 2141 pb correspondiente al Fragmento_A36 donde se encontraba la *orf35* y el extremo 5' de la *orf36*. Por otro lado, los oligonucleótidos F2_ter36_gib y R2_ter36_gib, (Tabla 11), se utilizaron para obtener un amplicón de 2166 pb correspondiente al Fragmento_B36, que contiene el extremo 3' de la *orf36*, la *orf37* y casi la totalidad de la



orf38 a excepción de su extremo 3'. Finalmente, mediante el ensamblaje de Gibson, con el *cassette* del gen de resistencia a apramicina, amplificado también por PCR, y el vector pHZ1358 digerido con XbaI y NheI, se obtiene el plásmido pHZ- Δ orf36 (Figura 21). Este plásmido presenta un tamaño de 16,5 kb.

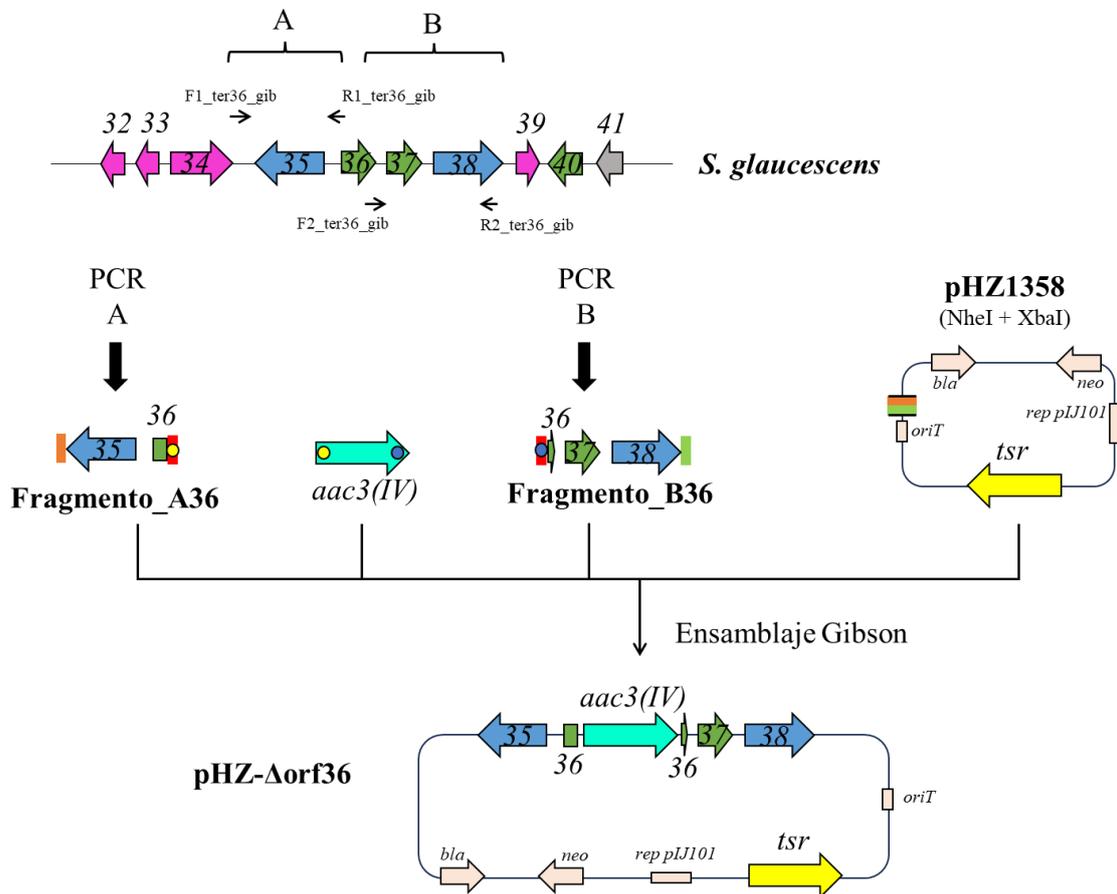


Figura 21. Representación esquemática de la construcción por el método de Gibson del plásmido pHZ- Δ orf36 para la generación del mutante Δ orf36g. En verde y naranja se representa las secuencias solapantes entre los fragmentos y el vector pHZ1358 digerido. En rojo se muestran las regiones solapantes del *cassette* de resistencia a apramicina, en rojo con un punto amarillo se indica la región solapante del Fragmento_A y en rojo con un punto azul la correspondiente al Fragmento_B. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



10.3. Vectores para la sobreexpresión de genes

La clonación de genes en vectores de expresión constitutiva permite observar el efecto de la sobreexpresión de dichos genes. En este trabajo la sobreexpresión de genes se ha realizado utilizando los vectores pSET152ETc y pOJ260P (Tabla 9). Ambos vectores permiten la expresión del gen de interés bajo el control del promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado (*ermE***p*) (Schmitt-John y Engels, 1992).

10.3.1. Sobreexpresión de genes con el vector pSET152ETc

El vector pSET152ETc (Tabla 9) es un plásmido replicativo en *E. coli*, ya que contiene el origen de replicación, y un plásmido integrativo en *Streptomyces*. Este vector integrativo ya que contiene el sitio *attP* y el gen de la integrasa del fago $\Phi C31$. Esto permite una recombinación sitio-específica, concretamente en el sitio *attB* del cromosoma de *Streptomyces*, por recombinación con el sitio homólogo *attP*. Además, este vector contiene el promotor *ermE***p* que permite la expresión constitutiva del gen clonado aguas abajo del mismo. Al realizarse la recombinación sitio-específica se genera una única copia sobreexpresada de este gen por célula, dando lugar a la cepa +orfX (Figura 22).

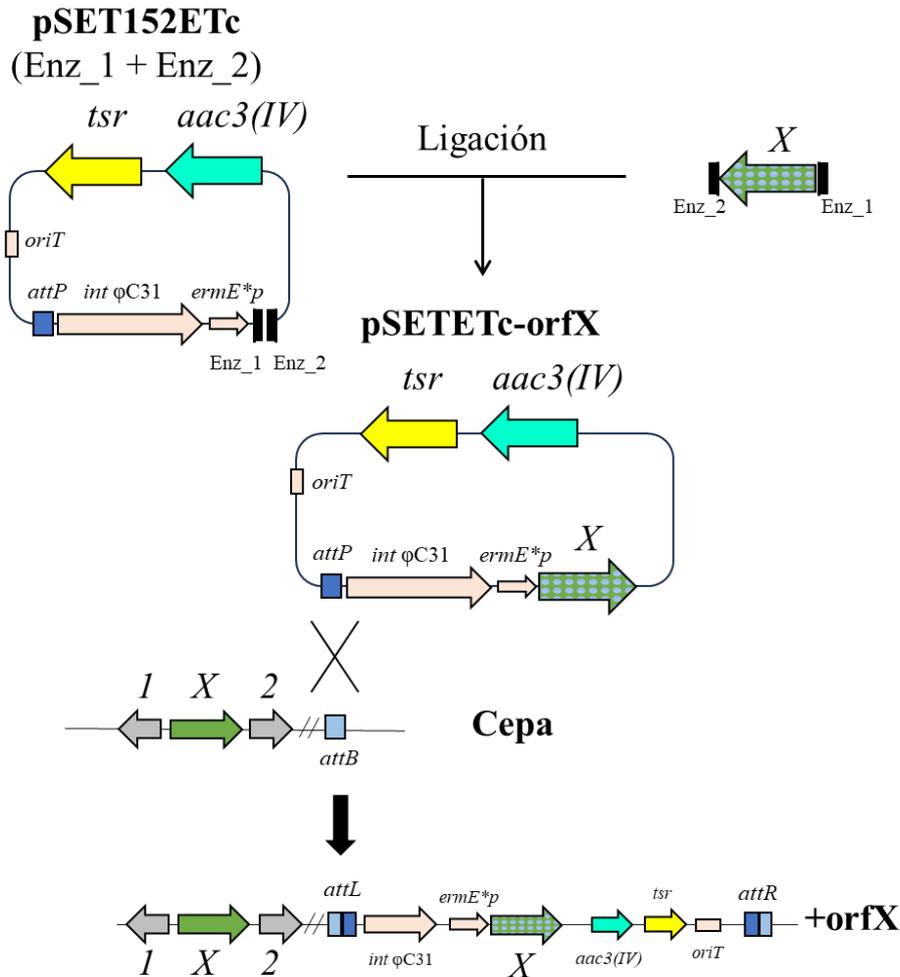


Figura 22. Representación esquemática de la construcción de plásmidos pSETETc-orfX y recombinación sitio-específica del plásmido entre los sitio *attP* y *attB*, generando la cepa +orfX. *X*: gen sobreexpresado, en verde punteado el gen *X* sobreexpresado introducido y en verde sólido el gen nativo sin modificar; **Enz_1** y **Enz_2**: enzimas de restricción específicas. **oriT**: origen de transferencia a *Streptomyces*; **aac(3)IV**: gen de resistencia a apramicina; **intΦC31**: gen de la integrasa ΦC31; **ermE*p**: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

Para la generación de los plásmidos pSETETc-orfX es necesario amplificar el gen que se desea sobreexpresar con unos oligonucleótidos portadores de colas con secuencias específicas para enzimas de restricción. Gracias esto se obtienen dianas para generar extremos cohesivos entre el gen y el plásmido pSET152ETc, para que se produzca la clonación. Una vez obtenido el plásmido pSETETc-orfX, este se introduce en *Streptomyces* mediante conjugación intergenérica. La recombinación sitio-específica genera una expresión estable del gen de interés



10.3.1.1. pSETETc-orf11

El plásmido pSETETc-orf11 (Tabla 19) se construyó para sobreexpresar la *orf11* del BGC 8 de *S. glaucescens*, generando la cepa +orf11g, cuando se conjugó la cepa silvestre con él (Tabla 3), y la cepa Δ orf12g+orf11g, cuando se conjugó la cepa mutante Δ orf12g con este plásmido (Tabla 3). Para ello se amplificó por PCR la *orf11*, obteniéndose un fragmento de 2042 pb. Este fragmento de PCR se encontraba flanqueado en su extremo 3' por un sitio de restricción EcoRI y en su extremo 5' por un sitio BamHI. Estos sitios fueron generados gracias a las colas que contenían los oligonucleótidos utilizados para la amplificación, F_AfsR_glau y R_AfsR_glau (Tabla 15). El amplicón se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI y posteriormente se clonó en el vector pSET152ETc, linealizado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante contenía la *orf11* bajo el control del promotor *ermE**p y tenía un tamaño de 8,9 Kb. Las células portadoras de esta construcción mostraban resistencia a apramicina y en el caso de *Streptomyces*, también al antibiótico tioestreptona (Figura 23).

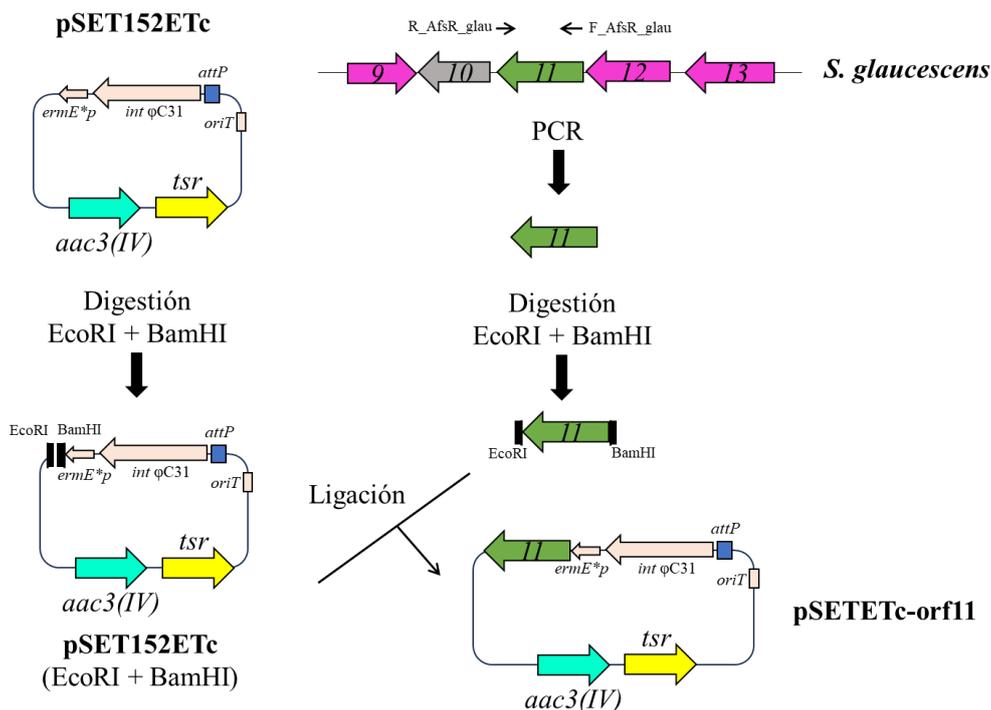


Figura 23. Representación esquemática de la generación del plásmido pSETETc-orf11 para la generación de la cepa +orf11g. *attP*: sitio de recombinación del plásmido; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac3(IV)*: gen de resistencia a apramicina; *intΦC31*: gen de la integrasa ΦC31; *ermE**p: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.



10.3.1.2. pSETETc-orf29

El plásmido pSETETc-orf29 (Tabla 19) se construyó para sobreexpresar la *orf29* del BGC 8 de *S. glaucescens*. Se utilizó tanto con la cepa silvestre, dando lugar a la cepa +orf29g (Tabla 3), como con la cepa Δ orf36g, dando lugar a la cepa Δ orf36g+orf29g (Tabla 3). Para construir el plásmido pSETETc-orf29 se clonó la *orf29* en el vector pSET152ETc, utilizando los sitios de corte de las enzimas NotI y XbaI. Para ello se amplificó por PCR la *orf29*, obteniéndose un fragmento de 709 pb, el cual contenía en su extremo 3' un sitio de restricción NotI y en su extremo 5' un sitio XbaI. Los sitios de corte se obtuvieron utilizando los oligonucleótidos F_Lux29_NotI y R_AfsR_XbaI (Tabla 15), portadores de estas secuencias diana en sus colas. El plásmido resultante de esta construcción tuvo un tamaño de 7,6 Kb y contenía la *orf29* bajo el control del promotor *ermE***p*. Las células portadoras de esta construcción eran resistentes a apramicina. En el caso de *Streptomyces* también lo eran al antibiótico tioestreptona (Figura 24).

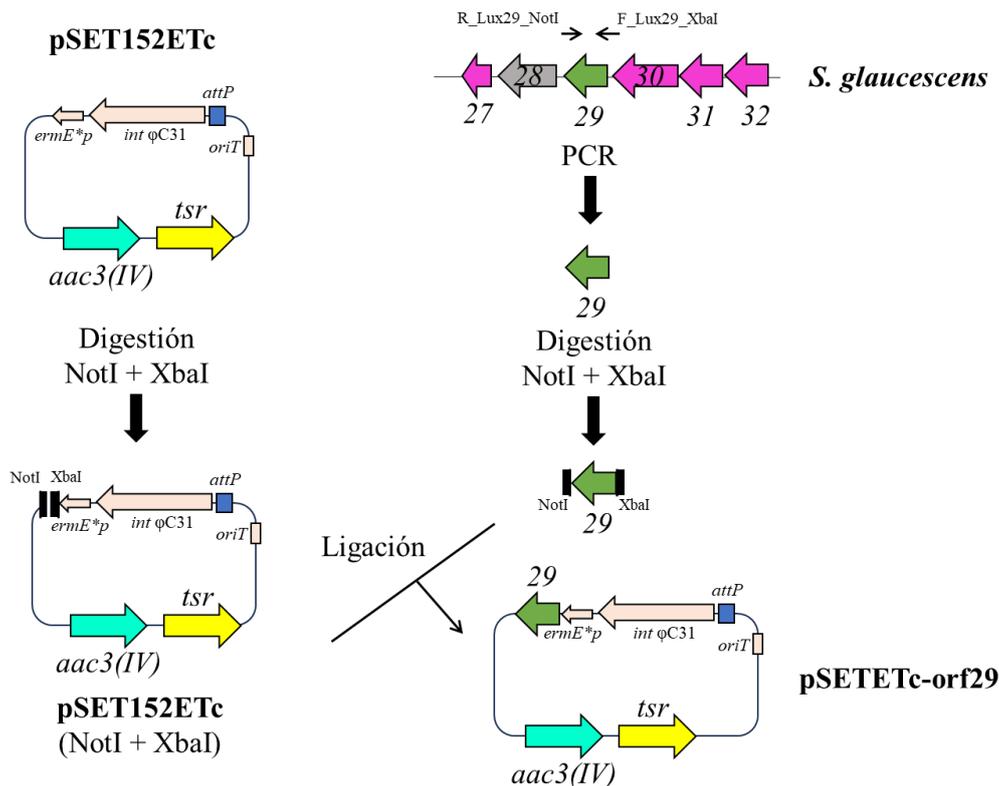


Figura 24. Representación esquemática de la construcción del plásmido pSETETc-orf29 para la generación de la cepa +orf29g. *attP*: sitio de recombinación del plásmido; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *int* Φ C31: gen de la integrasa Φ C31; *ermE***p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.



10.3.2. Sobreexpresión de genes con el vector pOJ260*P

El vector pOJ260*P (Tabla 9) es un plásmido replicativo en *E. coli*, pero es suicida en *Streptomyces*. Este plásmido se integra en el genoma de *Streptomyces* gracias a una recombinación homóloga simple utilizando la región clonada en él mismo. A su vez, esta región queda bajo el control del promotor *ermE**p** que permite su expresión constitutiva. Para la generación de los plásmidos pOJ260*p-EorfX es necesario amplificar una región de unas 2 Kb que será clonada inmediatamente después del promotor *ermE**p** en el vector pOJ260*P, que contenga el gen que se desea sobreexpresar. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar esta región deben contener colas con los sitios de corte para las enzimas XbaI y EcoRI, ya que son los sitios de corte únicos que contiene el vector pOJ260*P. Una vez obtenido el plásmido pOJ*p-EorfX se introduce en *Streptomyces* mediante conjugación intergenérica, y su inserción en el cromosoma de *Streptomyces* genera la duplicación de la región genética que se clonó inicialmente en el plásmido. Así, quedan dos copias pero únicamente una de ellas bajo el control del promotor *ermE**p**. Las células portadoras de la construcción serán resistentes al antibiótico apramicina (Figura 25).

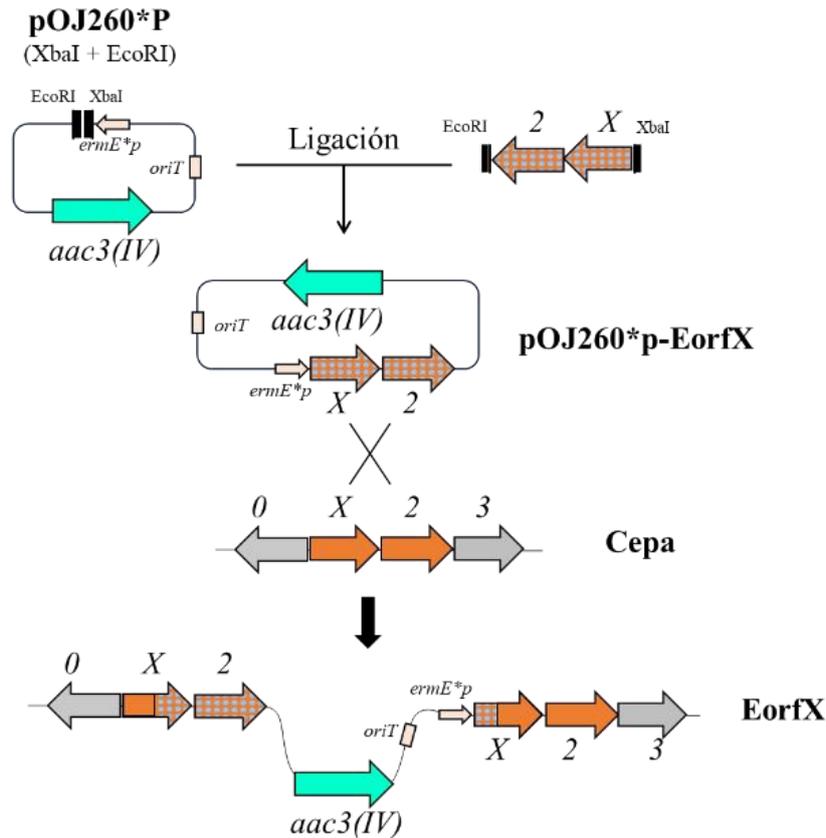


Figura 25. Representación esquemática de la construcción de plásmidos *pOJ260*p-EorfX* y recombinación homóloga del plásmido con el cromosoma silvestre generando la cepa *EorfX*. En naranja sólido gen nativo, en naranja punteado el gen clonado. *X*: gen sobreexpresado. *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *ermE*p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

10.3.2.1. *pOJ260*p-Eorf24*

El plásmido *pOJ260*p_Eorf24* (Tabla 19) se diseñó para generar la cepa *Eorf24g* en *S. glaucescens* (Tabla 3). Para ello se clonó un amplicón de PCR de 3199 pb producido con los oligonucleótidos F_erm_24_XbaI y R_erm_24_EcoRI (Tabla 12). El amplicón contenía la *orf24* y el extremo 5' *orf23*. En el extremo 5' de la *orf24* se añadió una secuencia de corte para la enzima *XbaI* y en el extremo 3' del fragmento amplificado una secuencia de corte para la enzima *EcoRI*, gracias a las colas de los oligonucleótidos utilizados. Este fragmento se clonó en el vector *pOJ260*p* haciendo uso de estas secuencias de corte. Gracias a esto la *orf24* queda inmediatamente después del promotor *ermE*p* (Figura 26). El plásmido resultante fue de 6,8 Kb y las células portadoras de esta construcción pueden seleccionarse gracias al marcador de resistencia a apramicina.

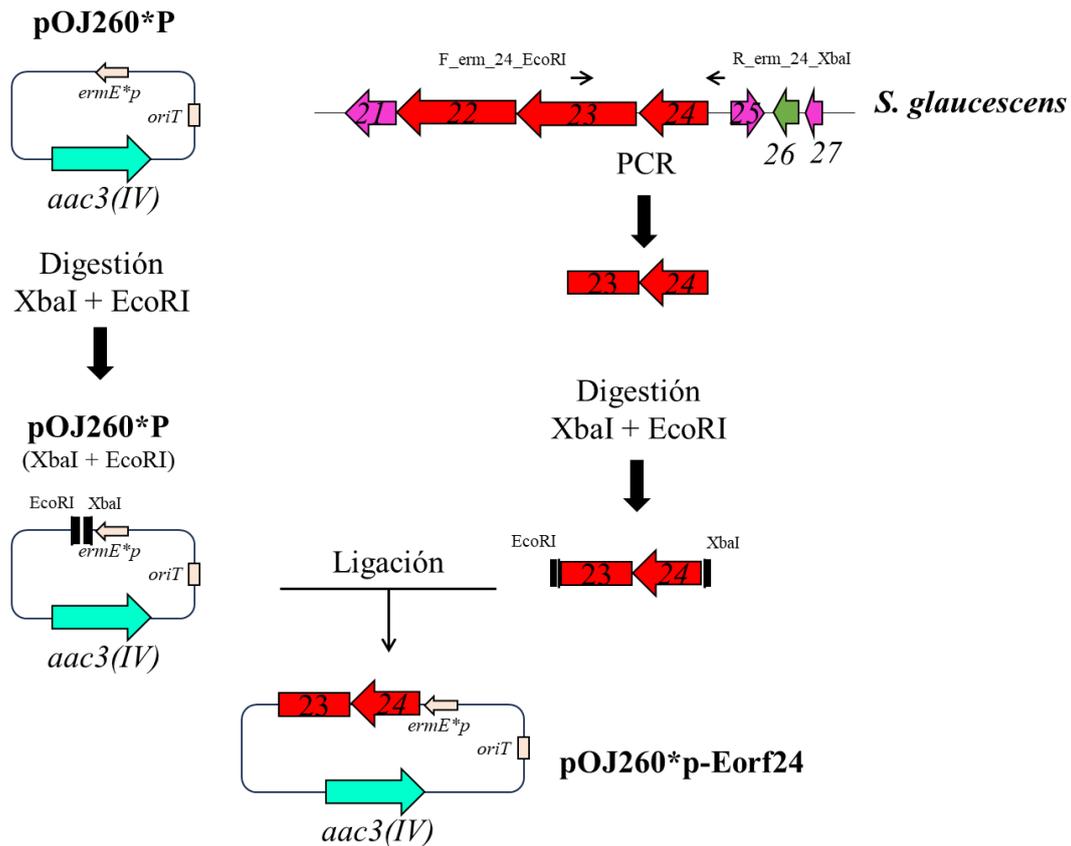


Figura 26. Representación esquemática de la construcción del plásmido pOJ260*p-Eorf24 para la generación de la cepa Eorf24g. *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac3(IV)*: gen de resistencia a apramicina; *ermE*p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

10.3.2.1. pOJ260*p-Eorf33

El plásmido pOJ260*p_Eorf33 (Tabla 19) se construyó para generar la cepa Eorf33g en *S. glaucescens* (Tabla 3). Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 2988 pb que contenía las *orf31*, *orf32* y *orf33* utilizando los oligonucleótidos F_erm_33_XbaI y R_erm_33_EcoRI (Tabla 12). Estos oligonucleótidos aportaron al extremo 5' del fragmento un sitio de corte para XbaI y en el extremo 3' un sitio de corte para EcoRI. Gracias a esto, el fragmento se pudo clonar en el vector pOJ260*p digerido con estas mismas enzimas. Se generó así un plásmido de 6,6 Kb en el cual las tres *orf* clonadas quedan inmediatamente después del promotor *ermE*p* (Figura 27). Las células portadoras de esta construcción muestran resistencia al antibiótico apramicina.

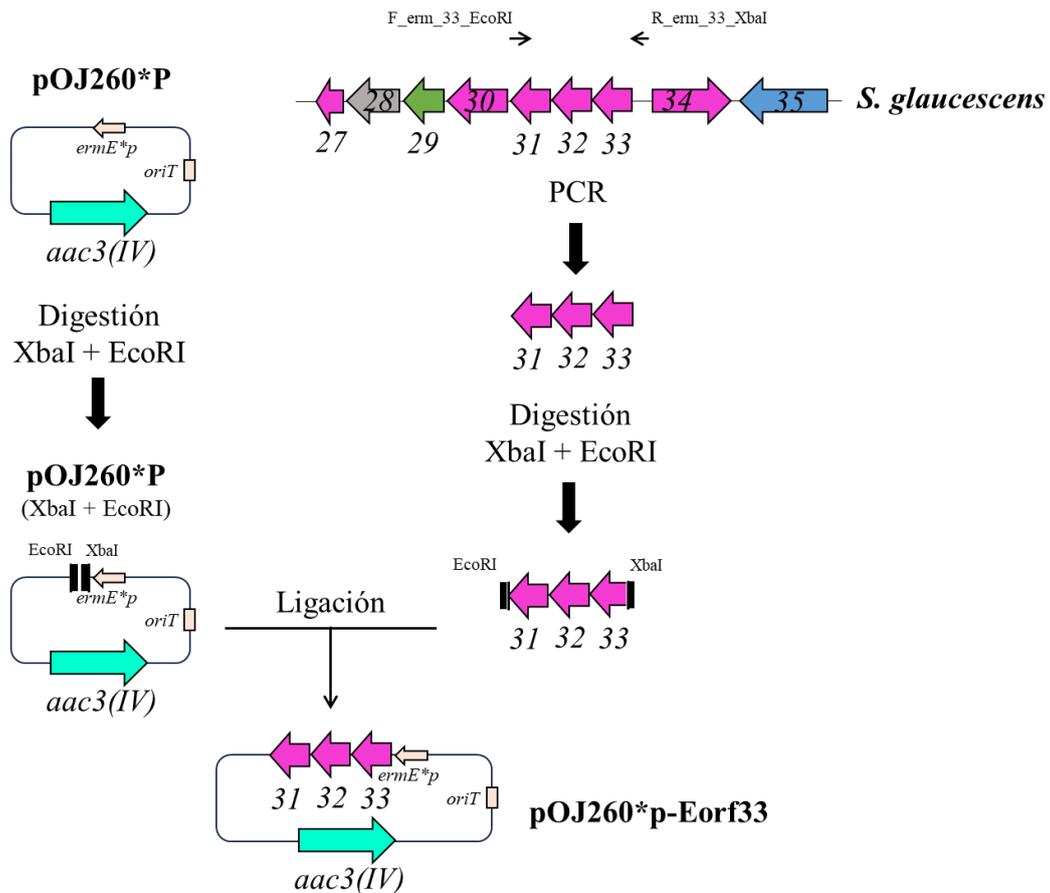


Figura 27. Representación esquemática de la construcción del plásmido pOJ260*p-Eorf33 para la generación de la cepa Eorf33g. *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *ermE*_p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

11. Extracción de compuestos producidos por *Streptomyces*

11.1. Extracción de compuestos en medio líquido

Se tomaron muestras de 1 mL a los días 3, 5 y 7 de los cultivos. A estas muestras se les añadió 1 mL de solvente orgánico (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol o etanol). Las muestras se dejaron en agitación durante 1 h tras la cual se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm. La fase orgánica se recogió y secó en vacío y a 35 °C gracias al sistema *SpeedVac*[®] (Labcono). En el caso de los extractos extraídos con etanol la separación de fases no se produce por lo que se recoge toda la fase líquida y se seca de igual manera.



11.2. Extracción de compuestos de medio sólido

En el día 6 de incubación se tomó una cuarta parte de la placa de agar, cortada con un bisturí estéril. El agar se picó y se le añadió el volumen necesario de solvente para cubrir la muestra (entre 3 y 5 mL) de solvente (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol o etanol). Se mantuvo en agitación durante 1 h. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm y la fase orgánica se recogió y secó en vacío y a 35 °C gracias al sistema *SpeedVac*[®] (Labcono). En el caso de los extractos extraídos con etanol la separación de fases no se produce por lo que se recoge toda la fase líquida y se seca de igual manera.

12. Análisis de compuestos producidos por *Streptomyces*

12.1. Análisis por UPLC

Los extractos secos de los cultivos se resuspendieron, con ayuda de un baño de ultrasonidos, en 60 µL de metanol cuando procedían de cultivos líquidos y en 100 µL de metanol cuando lo hacían de cultivos sólidos o de extractos tratados con etanol. Se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm y se pasó 50 µL del sobrenadante a viales de inyección. El análisis de los extractos se realizó utilizando un equipo *ACQUITY UPLC I-Class* (Waters) con una columna *BEH C18* (1,7 µm de tamaño de partícula, 2,1 x 100 mm, Waters). El volumen de inyección fue de 10 µL y como solventes se utilizaron acetonitrilo al 100 % (canal A) y H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético (canal B). El flujo utilizado fue de 0,5 mL/min y la temperatura de la columna se fijó en 35 °C. Las muestras se eluyeron con 10 % del solvente A durante 1 minuto y a continuación se estableció un gradiente desde el 10 % hasta el 99 % de solvente A durante 9 o 11 minutos para muestras procedentes de cultivos líquidos y 12 minutos para muestras procedentes de cultivos sólidos. Finalmente, se volvió a condiciones iniciales (10 % de A y 90 % de B). El análisis de los datos se realizó gracias al *software Empower 3* (Waters).

12.2. Desreplicación de extractos

Los extractos de cultivos de *Streptomyces* que resultaron interesantes para un análisis más detallado se enviaron a la Fundación MEDINA (Granada), quienes realizaron



estudios HPLC-MS sobre estos extractos para compararlos con una librería de compuestos naturales propia (desreplicación) (Pérez-Victoria *et al.*, 2016).

13. Purificación de compuestos

13.1. Purificación de compuestos en medio líquido

Para la purificación de los compuestos UO-186, UO-187, UO-188 y UO-190 se cultivó el mutante Δ orf36g en 30 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo R5A, puesto que la producción de algunos de los compuestos desaparecía cuando se realizaban cultivos en matraces de mayor volumen. Los cultivos se mantuvieron incubados a 30 °C y 250 rpm durante 7 días. Trascurrido este tiempo se recogieron y se centrifugaron a 4 °C para recoger el sobrenadante por filtración y descartar las células. El sobrenadante recogido se pasó por un cartucho *Sep-Pac Vac C18* de 10 g (Waters) previamente acondicionado con metanol y H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético, lo que permitió que los compuestos con afinidad al sílice de la columna quedaran retenidos en ella. El volumen no retenido fue recogido y guardado a 4 °C, ya que de este se obtendrá el compuesto UO-189. Posteriormente, el cartucho fue sometido a un flujo 5 mL/min durante 55 minutos. Este flujo produce un gradiente que inicia en 0 % de acetonitrilo y 100 % de H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético, hasta alcanzar el 100 % de acetonitrilo y 0 % de H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético. Durante este proceso se recoge el volumen de muestra eluida en fracciones según el porcentaje de solvente en el flujo. Se recogieron 5 fracciones (fracción 1: de 0 % a 25 % de acetonitrilo correspondiente a los 15 primeros minutos; fracción 2: de 25 % a 35 % de acetonitrilo desde el minuto 15 hasta el minuto 21; fracción 3: de 35 % a 48 % de acetonitrilo desde el minuto 21 hasta el minuto 28; fracción 4: de 48 % a 55 % de acetonitrilo desde el minuto 28 hasta el minuto 33; y fracción 5: de 55 % a 100 % de acetonitrilo desde el minuto 28 hasta el minuto 55). Las fracciones se analizaron por cromatografía en el UPLC para localizar los compuestos de interés en cada una de ellas. Los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190 se localizaron en la fracción 3 (de 35 % a 48 % de acetonitrilo). La fracción 3 se secó por vacío y en un baño a 35 °C, posteriormente se resuspendió en el menor volumen posible de metanol. Este volumen de metanol se traspasó a un vial de inyección y los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190, contenidos



en ella, se purificaron mediante HPLC preparativo. Se utilizó la columna *SunFire C18* (10 μm , 10 x 150 mm, Waters) y como solventes se utilizó para el canal A, acetonitrilo 100 %, y para el canal B, H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético, a un flujo constante de 5 mL/min. Se utilizó como programa de HPLC para la purificación una combinación de gradiente y flujo isocrático por etapas, lo que permitió la separación y recogida de los tres compuestos en una misma carrera (Tabla 20). El compuesto UO-187 fue recogido en el minuto 22 y 30 segundos, cuando el porcentaje de acetonitrilo se mantuvo estable a 22 %. El compuesto UO-188 se recogió cuando el porcentaje de acetonitrilo se mantuvo estable a 24 % en el minuto 44. Finalmente, el compuesto UO-190 se recogió en el minuto 51 cuando el programa se encontraba iniciando un gradiente de 24 % de acetonitrilo hasta 100 %.

Tabla 20. Programa de purificación específico para los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190

(min) Tiempo	(%) Acetonitrilo	(%) H ₂ O + 0,1 % TFA	Etapa
0	22	78	Isocrático
26	22	78	Gradiente
27	24	76	Isocrático
50	24	76	Gradiente
55	100	0	Isocrático
58	100	0	Limpiar columna
63	22	78	Recuperación condiciones iniciales

TFA: ácido trifluoroacético.

Para la purificación del compuesto UO-186 se debió procesar el volumen no retenido por el cartucho *Sep-Pac Vac C18* de 10 g (Waters). Para ello se utilizó acetato de etilo en proporción 1:1 con la muestra, y se mantuvo en agitación durante 1 h como se indica en el punto 11.1. Extracción de compuestos en medio líquido, pero a mayor escala. La fase orgánica se separó y recogió para secarla por vacío y en un baño a 35 °C, posteriormente se resuspendió en el menor volumen posible de metanol. Este volumen se traspasó a un vial de inyección. La purificación del compuesto UO-186 se llevó a cabo mediante HPLC preparativo utilizando la columna *SunFire C18* (10 μm , 10 x 150 mm, Waters) y se utilizaron como solventes acetonitrilo 100 % para el canal A y H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético para el canal B. El flujo se fijó a 5 mL/min. El programa de HPLC empleado para la purificación consistió en un flujo isocrático a 20 %



de acetonitrilo. El compuesto se recogió en el minuto 15 con 30 segundos tras iniciarse la carrera.

Para todos los compuestos purificados se llevó a cabo el mismo proceso con un total de 500 mL de cultivo de la cepa silvestre como control y manteniendo la proporcionalidad, para observar en los cromatogramas la presencia o ausencia de estos compuestos.

Una vez obtenidos los distintos compuestos puros, se secaron por vacío en un rotavapor y con ayuda de un baño a 35 °C. Una vez secos se resuspendieron en H₂O miliQ-Terbutanol 1:1, utilizando el volumen necesario hasta su completa disolución. Después, se traspasó el volumen a viales de liofilización previamente pesados y se congeló a -80 °C, durante al menos 30 minutos. Finalmente, los viales se liofilizaron en un liofilizador *FreeZone* (Labconco) durante toda una noche. Los liofilizados se pesaron para calcular la masa de compuesto resultante y se enviaron a la Fundación MEDINA (Granada), para su caracterización estructural mediante RMN y Espectrometría de Masas (MS). Además, previo al análisis de RMN y MS, también se realizó una desreplicación de los compuestos puros.

13.2. Semi-purificación de compuestos en medio sólido

Para la semi-purificación, con la que se obtuvieron las fracciones de cultivos sólido de la cepa silvestre *S. glaucescens* y el mutante Δ orf23-24g, se partió de cultivos en placas con 25 mL de R5A sólido, que se incubaron a 30 °C durante 6 días. El sumatorio del cultivo de cada cepa era el equivalente a 1 L. Transcurrido este tiempo el agar se picó y mezcló con butanol en proporción 1:1, manteniéndose en agitación durante al 2 h. Las muestras se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes descartándose el agar, posteriormente se secaron por rotavapor y en un baño a 35 °C. Los extractos secos resultantes se resuspendieron en el menor volumen posible de metanol y se filtraron con filtros de 0,2 μ m resistentes a solventes, para eliminar residuos procedentes del agar. Las muestras se pasaron a viales de inyección y utilizando el HPLC preparativo y la columna *SunFire C18* (10 μ m, 10 x 150 mm, Waters) junto con los solventes acetonitrilo 100 % en el canal A y H₂O miliQ con 0,1 % de ácido trifluoroacético en el canal B, a un flujo constante de 5 mL/min, se llevó a cabo la semi-purificación para obtener la fracción de



interés. El programa utilizado consistió en una combinación de gradiente y flujo isocrático por etapas que permitió eliminar rápidamente la parte de la muestra que no era de interés (Tabla 21). La fracciones correspondientes a las DRC-254 y DRC-255 se recogieron desde el minuto 16 hasta el minuto 27 y 30 segundos.

Tabla 21. Programa de semi-purificación específico para las fracciones

(min) Tiempo	(%) Acetonitrilo	(%) H ₂ O + 0,1 % TFA	Etapa
0	40	60	Isocrático
15	40	60	Gradiente
25	100	0	Isocrático
38	100	0	Limpiar columna
43	40	60	Recuperación condiciones iniciales

TFA: ácido trifluoroacético.

Una vez obtenidas las dos fracciones se secaron mediante vacío en rotavapor y con ayuda de un baño a 30 °C. Los productos resultantes se resuspendieron en H₂O miliQ-Terbutanol 1:1, y se traspasaron a viales de liofilización. Se congelaron a -80 °C, durante al menos 30 minutos. Finalmente, se liofilizaron en un liofilizador *FreeZone* (Labconco) durante toda una noche. Los liofilos se enviaron a la Fundación MEDINA (Granada), para su análisis por desreplicación.

14. Ensayos de bioactividad

El análisis de la actividad antibiótica y antifúngica se llevó a cabo frente a los microorganismos *M. luteus* y *S. aureus*, como modelos de bacteria Gram-positiva, *E. coli* y *P. aeruginosa*, como modelos de bacteria Gram-negativa y frente al hongo *C. albicans* como modelo de hongos.

Partiendo de una colonia aislada de cada microorganismo se realizaron cultivos líquidos *overnight* de 5 mL de medio 2xTY para las bacterias y 5 mL de YPD para el hongo. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en agitación a 250 rpm, mientras que el hongo se cultivó a 30 °C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se realizaron inóculos a una OD_{600nm} de 0,2 en los medios correspondientes y se incubaron, en las mismas condiciones anteriormente descritas según el microorganismo, hasta que alcanzaron una OD_{600nm} de 0,4 - 0,6. Posteriormente, se añadieron 300 µL de *M. luteus* y 150 µL del resto de las



bacterias a 15 mL de medio TSA^{1/2} que se plaquearon. Igualmente se procedió con el hongo, inoculando 150 µL en 15 mL de YPD^{1/2}. Una vez solidificado el medio se colocaron, a una distancia prudencial, discos de antibiograma estériles impregnados con 20 µL de compuesto puro resuspendido en metanol. Se utilizaron las concentraciones 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 µg/mL. Se utilizó como control de crecimiento un disco de antibiograma impregnado con 20 µL de metanol. Una vez las placas se prepararon con los discos impregnados con el compuesto, se mantuvieron 1 hora a 4 °C para facilitar la difusión del compuesto al medio. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C en el caso de las bacterias y a 30 °C para el hongo durante un día.



IV. RESULTADOS





IV. RESULTADOS

1. Búsqueda de genes codificantes de Salicilato Sintasa

1.1. Identificación de aminoácidos conservados en proteínas tipo SsfH

Para identificar genes codificante de la enzima Salicilato Sintasa (SsfH), responsable de convertir el corismato en salicilato, se realizó el alineamiento de 13 secuencias aminoacídicas de proteínas tipo SsfH, utilizando el programa *online Clustal Omega*, para determinar las regiones conservadas entre dichas proteínas (Figura 28). Posteriormente, se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas correspondientes a esas regiones, oligonucleótidos degenerados así como específicos con los que se permitiría amplificar genes homólogos al gen *ssfH* y por tanto codificantes de proteínas tipo SsfH en *Streptomyces* (Tabla 1).

AVR52604.1	FAGGAAA	EIVLDHNGFRTI	51.....	WSLYGWTAFFA	93	LLHAIVPQVEI	118	PLAGTRAL	253	PKEVFEHAV	280
WP_086735864.1	IAGGIAAEVLLTPRCIRT		91.....	WSAYGWCAFELA	133	LAHLVVPETEV	158	PLAGTRAL	293	PKELHEHAI	319
WP_070020793.1	YGGGALATLTLDRREGARL		60.....	WRAYGWAAFELS	105	LLHLVVPRTTEI	130	PLAGTRAL	266	PKEVHEHAV	292
WP_031508994.1	YAGGVRAELTLDRTGARL		64.....	WRAYGWAAFELS	107	LMHLVVPRAEV	132	PLAGTRAL	267	PKEVVEHAI	293
ADE34507.1	YAGGALAEITLDRNGARLI		64.....	WRAYGWAAFELS	105	LLHLVVPQTEI	130	PLAGTRAL	265	PKEVVEHAI	291
WP_148648157.1	YAGGSLAEITLDRTGARLI		63.....	WRAYGWAAFELS	106	LLHLVVPHTTEI	131	PLAGTRAL	266	PKEIYEHAI	292
AVR52595.1	YAGGALAEITLDRTGARLI		63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEI	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
WP_103490343.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
WP_093676346.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
WP_028441039.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
WP_030623644.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
WP_037880184.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
KDQ70105.1	YAGGAAA	EITLDRTGARLI	63.....	WRAYGWAAFELS	104	LLHLVVPHTTEV	129	PLAGTRAL	264	PKEIYEHAI	290
	.	** * : *	*	*	*****	::	*	*	..**..*	*	*****	***:***:	
AVR52604.1	ALFPAVTASG	344	SPRGYGGAVF	370	GALDSALVLRVTFQQHGRTHLQAGAGIVADSTPDREFEETCEKM	419					
WP_086735864.1	AVFPAVTASG	358	ARGPYAGAVM	409	GTMDAALVLRSAAYARDGRTHLRAGAGVVEQSRARELEETREKLI	458					
WP_070020793.1	AVFPAVTASG	356	RRGLYSGAVL	382	GALDAALVLRSVFRAAGRTHLRAGAGVVSQSSADREFEETAEKLI	431					
WP_031508994.1	AVFPAVTASG	357	SRGLYSGAVL	383	GAMDAALVLRSAAYRKDGRTHLRAGAGIVHSTPEREFEEETCEKLI	432					
ADE34507.1	AVFPAVTASG	355	LRGLYSGAVL	381	GAMDAALVLRVAVYRQNGRTHLRAGAGIVGQSLPDREFEETCEKLI	425					
WP_148648157.1	AVFPAVTASG	356	TRGLYSGAVL	382	GAMDAALVLRVYRQHGRTHLRAGAGIVGHSRPERELEETCEKLI	426					
AVR52595.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVGQSRPERELEETCEKLI	429					
WP_103490343.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
WP_093676346.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
WP_028441039.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
WP_030623644.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
WP_037880184.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
KDQ70105.1	AVFPAVTASG	354	ARGLYSGAVL	380	GAMDAALVLRVYRQDGRTHLRAGAGIVVHSRPERELEETCEKLI	429					
	.	*****		** * ***:			*:*****:			*****	*****	* * :*** **:	

Figura 28. Regiones conservadas en las proteínas tipo SsfH seleccionadas del alineamiento con *Clustal Omega*. AVR52604.1: *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012; WP_086735864.1: *Streptomyces glucescens*; WP_070020793.1: *Streptomyces nanshensis* SCSIO 10429; 267; WP_031508994.1: *Streptomyces megasporus* NRRL B-16372; ADE34507.1: *Streptomyces sp. SF2575*; WP_148648157.1: *Streptomyces sp. CB01881*; AVR52595.1: *Streptomyces sp. FXJ1.235*; WP_103490343.1: *Streptomyces sp. SM5*; WP_093676346.1: *Streptomyces halstedii* NPDC093013; WP_028441039.1: *Streptomyces sp. SID4912*; WP_030623644.1: *Streptomyces griseolus* NRRL B-2925; WP_037880184.1: *Streptomyces sp. PpalLS-921*; KDQ70105.1: *Streptomyces sp. NTK 937*.



1.1.1. Amplificación por PCR de genes codificantes para Salicilato Sintasa

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar genes de *ssfH* se utilizaron en diferentes combinaciones, para realizar amplificaciones por PCR sobre los genomas de un total de 60 cepas de *Streptomyces* disponibles en el laboratorio. De estas cepas, 39 de ellas pertenecen a la colección CS de nuestro laboratorio (Malmierca *et al.*, 2018). Las 21 restantes pertenecen a colecciones públicas o fueron cedidas por distintos investigadores (Tabla 1). De los genomas utilizados, solo a partir de tres de las secuencias, se obtuvieron fragmentos de ADN que al clonarse en el vector pCR-Blunt y secuenciarse, confirmaron que eran tres genes homólogos a *ssfH*. Dos de los genes se obtuvieron en las cepa *Streptomyces sp.* CS123 y *Streptomyces olivaceus* Tü2352 utilizando los oligonucleótidos *ssfH_50_F1* y *ssfH_50_R1* (Tabla 10). El tercer gen amplificado se obtuvo del genoma de *Streptomyces sp.* NTK937 utilizando los oligonucleótidos *ssfH_63_F1* y *ssfH_63_R1* (Tabla 10). Dichos cuatro oligonucleótidos se corresponde con las secuencias proteicas subrayadas en la Figura 28.

1.2. Búsqueda bioinformática de genes codificantes para Salicilato Sintasa

Se realizó una búsqueda de genes codificantes de Salicilato Sintasa usando la secuencia proteica SsfH de *Streptomyces sp.* SF2575, con número de acceso ADE34507. Tras una búsqueda con BLASTP con esta secuencia, y cribando entre los resultados obtenidos, se identificaron cepas de *Streptomyces* disponibles en el laboratorio y que presentaban proteínas similares a SsfH. Las cepas identificadas con este análisis fueron seis, *Streptomyces sp.* CS113, *Streptomyces sp.* CS159, *Streptomyces lividans* TK24, *Streptomyces glaucescens* GLA.O, *Streptomyces sp.* NTK 937 y *Streptomyces olivaceus* Tü2352. También, se identificó un gen tipo *ssfH* en *Streptomyces sp.* CS123 utilizando el programa *SnapGene* (Insighful Science), con su herramienta “Alineamiento de Secuencias”, y tomando como referencia diferentes secuencias nucleotídicas de genes tipo *ssfH*. Como resultado de estas búsquedas bioinformáticas se identificaron un total de siete cepas. Tres de estas cepas, *Streptomyces sp.* NTK 937, *Streptomyces olivaceus* Tü2352 y *Streptomyces sp.* CS123, también habían sido identificadas en la búsqueda de genes homólogos a *ssfH* por PCR (apartado 1.1.1).



2. Análisis de las cepas *Streptomyces sp.* CS113, *Streptomyces sp.* CS159, *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces olivaceus* Tü2352

2.1. Análisis bioinformático

2.1.1. *Streptomyces sp.* CS113

Streptomyces sp. CS113 tiene un genoma de 8.695.358 pb, con número de acceso NZ_KZ195574.1 en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Dicho genoma se analizó utilizando la herramienta antiSMASH 7.1.0 (Antibiotic and Secondary Metabolite Analysis Shell) (Blin *et al.*, 2023) obteniéndose como resultado 32 posibles agrupaciones de genes de biosíntesis (BGCs). Un análisis manual más profundo de este genoma, en el que se estudiaron los resultados de *KnownClusterBlast* y los *SubClusterBlast* dados por antiSMASH para cada uno de los BGCs resultantes, permitió identificar varios BGCs que habían sido inicialmente etiquetados como un único BGC. Gracias a este análisis, se identificó un BGC adicional quedando un total de 33 BGCs (Tabla 22). Además, el BGC 1 que antiSMASH etiqueta como polioxipeptina de baja homología ha sido recientemente descubierto como responsable de la biosíntesis de diperamicina (García-Gutiérrez *et al.*, 2024)

Tabla 22. BGCs identificados en *Streptomyces sp.* CS113

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1* ¹	PKS-NRPS	Diperamicina* ¹	100
2	Otro* ²	-	-
3	NRPS	Coelichelina	100
4	RiPP-like	Informatipeptina	42
5	TIPKS	Arsenopolicétidos	84
6	Terpeno	Hopeno	100
7	Lantipéptido clase III	SnapB	100
8	Terpeno	Isorenierateno	10
9	Hidrógeno-cianida	Aboricina	21
10	Sideróforo	Enduracidina	10
11	Indol	7-prenilisatina	66
12	Terpeno	Geosmina	100
13	RiPP-like	-	-
14	TIPKS	Undecilprodigiosina	100



15	T2PKS	Hatomarubigina A, B,C y D	78
16	NRPS	BD-12	17
17	T2PKS	Curamicina	66
18	Terpeno	Albaflavonona	100
19	RRE-containing	Chejuenolide A y B	7
20	RRE-containing	Naptomicina A	9
21	Sideróforo	Desferrioxamina B y E	100
22	Melanina	Melanina	60
23	Ectoina	Ectoina	100
24	T2PKS	Antibióticos HKI 10311129 y A2121-1, Cervimicina A, C y D	90
25	T3PKS	Flaviolina y tetrahidroxinaftaleno	100
26	Sideróforo	Paenibactina	83
27	Terpeno	-	-
28	Butirolactona	Gaburedina	20
29	T3PKS	Germicidina	100
30	Terpeno	Isorenierateno	62
31	Indol	5-dimetilalilindol-3-acetonitrilo	100
32	Sideróforo	Coelibactina	100
33	hglE-KS, Lantipéptido clase I	Azinomycina B	6

Estudio realizado actualizando los datos de García-Gutiérrez, 2022. **NRPS**: Péptido Sintetasa No Ribosomal; **T1PKS**, **T2PKS**, **T3PKS**: Policétidos Sintetas tipo I, II y III respectivamente; **PKS-NRPS**: híbrido Policétido Sintetasa- Péptido Sintetasa No Ribosomal; **Lantipéptido clase I**: lantipéptido tipo nisina; **Lantipéptido clase III**: lantipéptido tipo labirintopeptina (FN178622); **RiPP-like**: producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; **RRE-containing**: elemento de reconocimiento de BGC; **hglE-KS**: Policétido Sintetasa tipo heterocisto glicolípido sintetasa. *1: estudios recientes confirman que este BGC codifica la biosíntesis de diperamicina (García-Gutiérrez et al., 2024). *2: BGC que contiene una proteína relacionada con un metabolito secundario y que no encaja en ninguna otra categoría.

2.1.2. *Streptomyces sp.* CS159

Streptomyces sp. CS159 tiene un genoma de 8.122.180 pb, cuyo número de acceso en NCBI es NZ_KZ195577.1. El análisis del genoma con antiSMASH 7.1.0 resultó en 30 posibles BGCs que analizándolos en mayor profundidad, revelaron ser 31 BGCs (Tabla 23).

Tabla 23. BGCs identificados en *Streptomyces sp.* CS159

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1	Sideróforo	Coelichelina	100
2	RiPP-like	Informatipeptina	42
3	T1PKS	Arsenopolicetidos	84
4	Terpeno	Hopeno	100
5	NRPS	Intomicina B	100



6	Terpeno	Isorenierateno	100
7	Hidrogeno-cianida	Aboricina	14
8	NRPS, Betalactona, sideróforo	Paulomicina	13
9	Betalactona	Skilamicina D y E	7
10	Terpeno	Geosmina	100
11	RiPP-like	-	-
12	Sideróforo	Coelibactina	100
13	T1PKS	Undecilprodigosina	100
14	Sideróforo	Kinamicina	19
15	T2PKS	Curamicina	66
16	Terpeno	Albaflavonona	100
17	RRE-containing	Chejuenolide A y B	7
18	RRE-containing	Naptomicina A	9
19	Otro* ¹	Colibrimicina	11
20	NRPS	Sarpeptina A y B	91
21	T2PKS	Arixantomicina A, B y C	22
22	Sideróforo	Desferrioxamina B y E	100
23	Melanina	Malanina	60
24	Ectoina	Ectoina	100
25	T3PKS	Flaviolina tetrahidroxinaftaleno	y 100
26	T3PKS	Germicidina	100
27	Terpeno	Carotenoide	54
28	Indol	5-dimetilalilindol-3- acetonitrilo	100
29	Terpeno	2-metilisoborneol	100
30	T2PKS, butirolactona	Lactonamicina	14
31	Otro* ¹	Nenestatin	45

Estudio realizado actualizando los datos de Prado-Alonso, 2021. **NRPS**: Péptido Sintetasa No Ribosomal; **T1PKS**, **T2PKS**, **T3PKS**: Policétidos Sintetas tipo I, II y III respectivamente; **RiPP-like**: producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; **RRE-containing**: elemento de reconocimiento de BGC. *¹: BGC que contiene una proteína relacionada con un metabolito secundario y que no encaja en ninguna otra categoría.

2.1.3. *Streptomyces lividans* TK24

Streptomyces lividans TK24 tiene un genoma de 8.345.283 pb, con el número de acceso NZ_CP009124.1 en la base de datos NCBI. La herramienta bioinformática antiSMASH 7.1.0 detecta sobre este genoma un total de 27 posibles BGCs (Tabla 24).



Tabla 24. BGCs identificados en *Streptomyces lividans* TK24

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1	Terpeno	A54145	8
2	Sideróforo	Coelibactina	100
3	Indol	5-dimetilalilindol-3-acetonitrilo	100
4	T3PKS	Germicidina	100
5	Terpeno	Hopeno	100
6	Lantipéptido clase III	SnapB	100
7	Tioamida-NRPS	Nogalamicina	40
8	T1PKS	Coelomicina P1	100
9	Sideróforo	Enduracidina	10
10	Terpeno	Geosmina	100
11	RiPP-like	-	-
12	T1PKS	Undecilprodigosina	100
13	Sideróforo	Kinamicina	19
14	T2PKS	Curamicina	100
15	Terpeno	Albaflavonona	100
16	T2PKS	Actinorodina	100
17	NRPS	CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b	87
18	Sideróforo	Desferrioxamina B	100
19	Melanina	Melanina	60
20	Ectoina	Ectoina	100
21	T3PKS	Flaviolina y tetrahidroxinaftaleno	100
22	RiPP-like	Informatipeptina	42
23	Sideróforo	Coelichelina	100
24	Lantipéptido clase I	Loboforina CR4	5
25	Terpeno	Isorenierateno	100
26	hglE-KS	Leinamicina	2
27	Terpeno	A54145	3

NRPS: Péptido Sintetasa No Ribosomal; **T1PKS, T2PKS y T3PKS:** Policétidos Sintetas tipo I, II y III respectivamente; **Lantipéptido clase I:** lantipéptido tipo nisina; **Lantipéptido clase III:** lantipéptido tipo labirintopeptina (FN178622); **RiPP-like:** producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; **hglE-KS:** Policétido Sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa.

2.1.1. *Streptomyces olivaceus* Tü2352

Streptomyces olivaceus Tü2352 tiene un genoma de 8.458.055 pb, con número de acceso NZ_CP043317.1 en la base de datos NCBI. El uso de antiSMASH 7.1.0 sobre este genoma revela 35 posibles BGCs que tras un análisis en mayor profundidad aumentan a 38 BGCs (Tabla 25).



Tabla 25. BGCs identificados en *Streptomyces olivaceus* Tü2352

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1	T1PKS	Tautomisetina	19
2	Sideróforo	Coelichelina	100
3	RiPP-like	Informatipeptina	42
4	Terpeno	Versipelostatina	5
5	NRPS	Cadaside A y B	19
6	T1PKS	Olimicina A y B	97
7	Lantipéptido clase I	-	-
8	Sideróforo	Mirubactina	78
9	Sideróforo	Coelibactina	100
10	Terpeno	Hopeno	100
11	Hidrogeno-cianida	Aboricina	21
12	PKS-like	Micemicinas A, B y C	91
13	NRPS	Antibiótico diisonitrilo SF2768	55
14	Sideróforo	Pualomicina	11
15	Lantipéptido clase I	Tobramicina	16
16	Terpeno	Geosmina	100
17	RiPP-like	Ciclotiazomicina	9
18	PKS-NRPS	Pactamidas	100
19	T2PKS	Rishirilide A y B	100
20	Lantipéptido clase III	SnapB	100
21	Sideróforo	Kinamicina	19
22	T2PKS	Curamicina	85
23	Terpeno	Albaflavonova	100
24	Betalactona	Julicrome Q3-3 y Q3-5	35
25	NRPS	Ishigamida	50
26	Lantipéptido clase II	Birimositida	87
27	Fenazina	-	-
28	Lasopéptido	SSV-2083	36
29	Melanina	Melanina	100
30	Ectoina	Ectoina	100
31	NRPS	Detoxina P1, P2 y P3	75
32	T3PKS	Flaviolina y tetrahidroxinaftaleno	100
33	Amglicicil	Validamicina A	22
34	Terpeno	Isorenierateno	75
35	Indol	5-dimetilalilindol-3-acetonitrilo	100
36	T3PKS	Germicina	100
37	Terpeno	Ebelactona	5
38	PKS	Loboforina A	93

NRPS: Péptido Sintetasa No Ribosomal; **PKS:** Policétido Sintetas; **T1PKS, T2PKS, T3PKS:** Policétidos Sintetas tipo I, II y III respectivamente; **PKS-like:** otro tipo de Policétido Sintetas; **Lantipéptido clase I:** lantipéptido tipo nisina; **Lantipéptido clase III:** lantipéptido tipo labirintopeptina (FN178622); **RiPP-like:** producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente.



2.2. Identificación de los BGCs con genes tipo *ssfH*

En los genomas de las cepas *Streptomyces sp.* CS113, *Streptomyces sp.* CS159, *S. lividans* TK24 y *S. olivaceus* Tü2352 se detectaron por BLASTP proteínas similares a SsfH. Las proteínas, genes y BGCs a los que corresponden en los correspondientes genomas son los indicados a continuación:

En *Streptomyces sp.* CS113 se identificó el gen B9W62_RS38595 que codifica la proteína WP_087811543.1 en el BGC 32 (Tabla 22), esta proteína presenta un 45 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH. En *Streptomyces sp.* CS159 se identificó el gen B9W64_RS08525 que codifica la proteína WP_087789267.1 en el BGC 12 (Tabla 23), dicha proteína presenta un 46 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH. En la cepa *S. lividans* TK24 se identificó, el gen SLIV_RS00890 que codifica la proteína WP_003971449.1 en el BGC 2 (Tabla 24), la cual presenta un 46 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH. En *S. olivaceus* Tü2352 se identificó el gen FYC74_RS05360 que codifica la proteína WP_194274967.1 en el BGC 9 (Tabla 25), la cual presenta un 47 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH. Además, en esta cepa se obtuvo la amplificación por PCR de un gen homólogo a *ssfH* (apartado 1.1.1.). Dicho gen, FYC74_RS07090, se localiza en el BGC 12 (Tabla 25), y codifica la proteína WP_194275228.1 con un 53 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH.

Todos estos genes identificados codificadores de proteínas similares a SsfH, a excepción del localizado por PCR en el BGC 12 de *S. olivaceus* Tü2352, se encuentran formando parte de un BGC del mismo tipo y con el que comparten homología del 100 %. Este es el BGC de biosíntesis de coelibactina de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) (Tabla 26 y Figura 29).

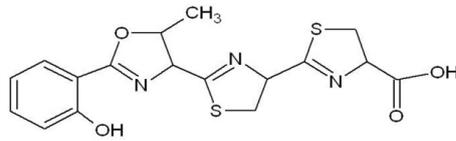
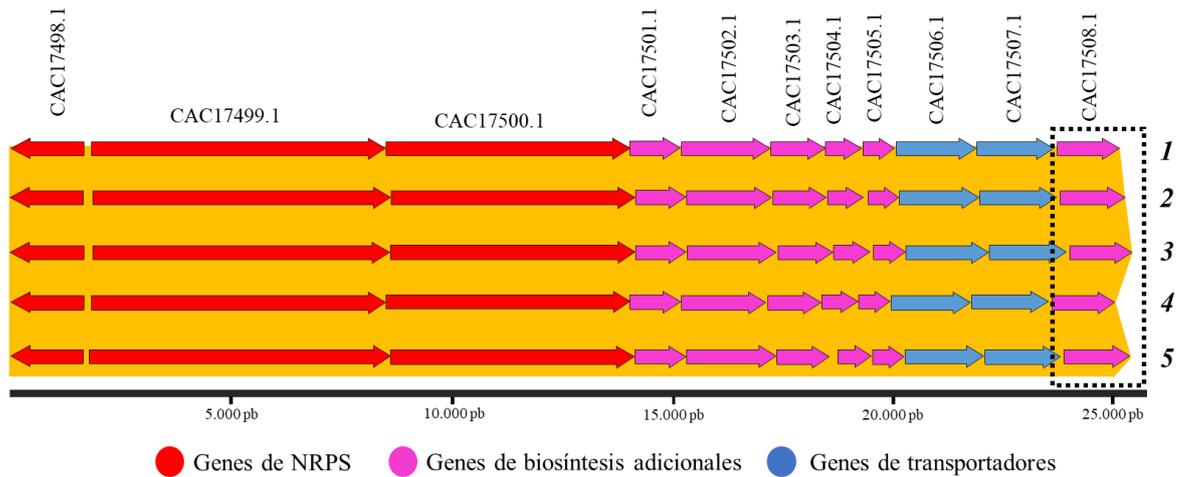
Finalmente, el gen restante de *S. olivaceus* Tü2352 localizado en el BGC 12 se encuentra formando parte del BGC responsable de la biosíntesis de micemicinas A, B y C con el que presentaba alta homología (91 %) y que ha sido descrito en *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 y *Streptomyces sp.* FXJ1.235 (Song *et al.*, 2018) (Tabla 27 y Figura 30).

Tabla 26. Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de coelibactina en *Streptomyces coelicolor* A3(2) y las de los BGCs de coelibactina identificados en *Streptomyces* sp. CS113, *Streptomyces* sp. CS159, *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces olivaceus* Tü2352

<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Función	<i>Streptomyces</i> sp. CS113 BGC 32		<i>Streptomyces</i> sp. CS159 BGC 12		<i>Streptomyces lividans</i> TK24 BGC 2		<i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352 BGC 9	
Nº de acceso		Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %
CAC17498.1	Ligasa de unión a AMP	WP_087811533.1	89	WP_087789276.1	85	WP_003971460.1	100	WP_194274975.1	82
CAC17499.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_087811534.1	88	WP_087789275.1	86	WP_038534181.1	100	WP_194274974.1	82
CAC17500.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_087811535.1	90	WP_087789274.1	89	WP_003971457.1	100	None* ¹	87
CAC17501.1	Deshidrogenasa	WP_087811536.1	89	WP_087789273.1	88	WP_003971456.1	99	WP_194274973.1	88
CAC17502.1	Oxidoreductasa	WP_087811537.1	87	WP_087789272.1	82	WP_016328184.1	100	WP_194274972.1	82
CAC17503.1	Citocromo P450	WP_087811538.1	96	WP_087789271.1	88	WP_016328185.1	94	WP_194274971.1	92
CAC17504.1	Hidrolasa	WP_087811539.1	90	WP_087789270.1	86	WP_003971453.1	100	WP_194279358.1	86
CAC17505.1	Metiltransferasa	WP_087811540.1	97	WP_042821867.1	97	WP_003971452.1	100	WP_194274970.1	94
CAC17506.1	Transportador tipo ABC	WP_087811541.1	92	WP_087789269.1	94	WP_003971451.1	98	WP_194274969.1	89
CAC17507.1	Transportador tipo ABC	WP_087811542.1	91	WP_087789268.1	87	WP_003971450.1	97	WP_194274968.1	88
CAC17508.1	Salicilato sintasa	WP_087811543.1	84	WP_087789267.1	80	WP_003971449.1	100	WP_194274967.1	80

Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos; *¹: proteínas sin número de acceso asignado.



**A****Coelibactina****B**

(1) *Streptomyces coelicolor* A3(2) (2) *Streptomyces* sp. CS113 BGC 32 (3) *Streptomyces* sp. CS159 BGC 12

(4) *Streptomyces lividans* TK24 BGC 2 (5) *Streptomyces olivaceus* Tü2352 BGC 9

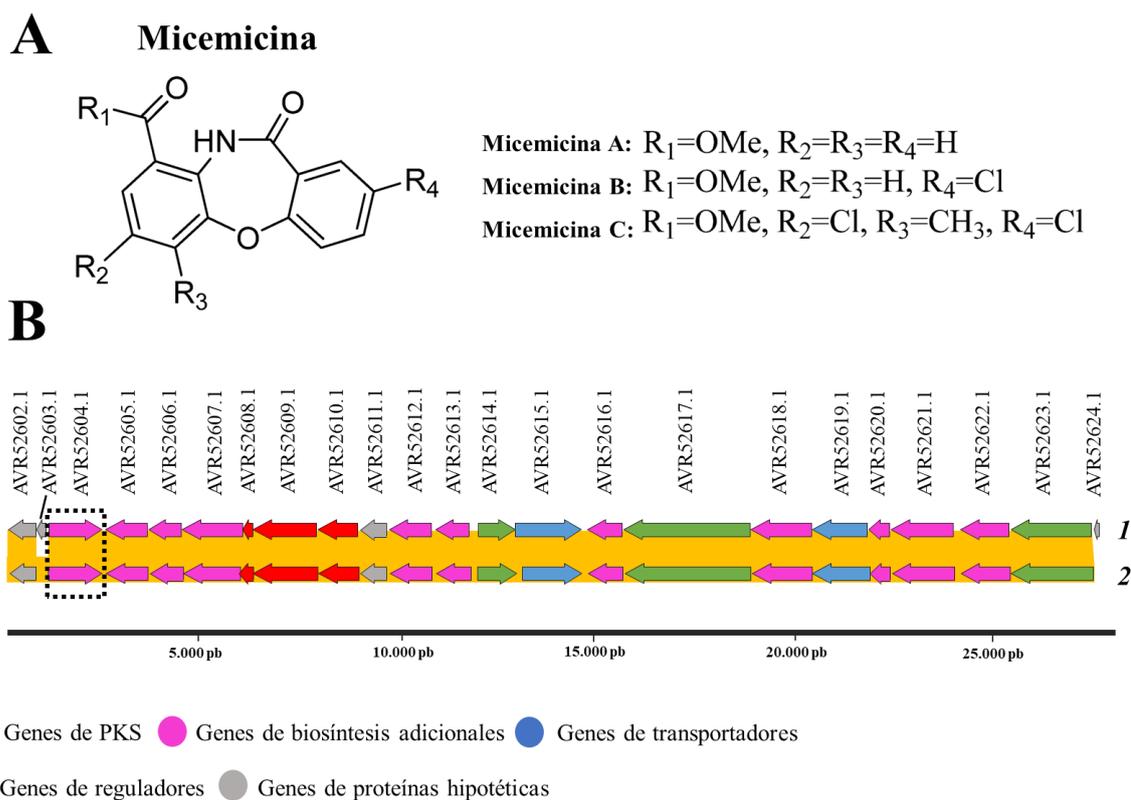
Figura 29. BGCs de coelibactina. **A:** Estructura de la coelibactina. **B:** Comparación de los BGCs de coelibactina de las cepas de *Streptomyces* estudiadas. En amarillo se muestran los genes homólogos. Se marca con un cuadro los genes tipo *ssfH*. Los BGCs se representan a escala.



Tabla 27. Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de micemicinas A, B y C de *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 y las del BGC 12 identificado en *Streptomyces olivaceus* Tü2352

<i>Streptomyces olivaceus</i> FXJ8.012	Función	<i>Streptomyces olivaceus</i> Tü2352 BGC12	
Nº de acceso		Nº de acceso	Ident. %
AVR52602.1	Proteína hipotética	WP_194275229.1	98
AVR52603.1	Proteína hipotética	x	x
AVR52604.1	Salicilato sintasa	WP_194275228.1	98
AVR52605.1	Metiltransferasa	WP_194275227.1	97
AVR52606.1	Triptófano 2.3 -dioxigenasa	WP_228123295.1	97
AVR52607.1	Amidohidrolasa	WP_228123576.1	98
AVR52608.1	Proteína de unión a fosfopanteteína	WP_228123294.1	100
AVR52609.1	Sintetasa dependiente de AMP	None* ¹	97
AVR52610.1	3-oxoacil-ACP sintasa	WP_194275226.1	99
AVR52611.1	Proteína hipotética	WP_194275225.1	98
AVR52612.1	3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa	WP_194275224.1	99
AVR52613.1	Metiltransferasa	WP_157852269.1	100
AVR52614.1	Regulador transcripcional de la familia Lrp/AsnC	WP_194275223.1	99
AVR52615.1	Transportador MFS	WP_194275222.1	100
AVR52616.1	Hidrolasa	WP_194275221.1	97
AVR52617.1	Regulador tipo SARP	WP_194275220.1	97
AVR52618.1	Triptófano halogenasa	WP_194275219.1	99
AVR52619.1	Transportador Na ⁺ /H ⁺	WP_194275218.1	97
AVR52620.1	Flavín reductasa	WP_194275217.1	98
AVR52621.1	Triptófano halogenasa	WP_194275216.1	99
AVR52622.1	Quinureninasa	WP_194275215.1	98
AVR52623.1	Regulador tipo SARP	WP_194275213.1	97
AVR52624.1	Proteína hipotética	x	x

x: proteína no presente en el BGC 12 de *Streptomyces olivaceus* Tü2352; **Ident. (%)**: porcentaje de aminoácidos idénticos; *¹: proteínas sin número de acceso asignado.



(1) *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 (2) *Streptomyces olivaceus* Tü2352 BGC 12

Figura 30. BGCs de micemicinas. **A:** Estructuras de las micemicinas. **B:** Comparación de los BGCs de micemicinas en las cepas de *Streptomyces* estudiadas. En amarillo se muestran los genes homólogos. Se marca con un cuadro los genes tipo *ssfH*. Los BGCs se representan a escala.

3. Análisis de la cepa *Streptomyces sp.* NTK937

3.1. Análisis bioinformático de la cepa *Streptomyces sp.* NTK937

La cepa *Streptomyces sp.* NTK 937 tiene un genoma de 7.003.153 pb, con el número de acceso JJOB01000001.1 en la base de datos NCBI. Utilizando la herramienta antiSMASH 7.1.0 sobre este genoma se obtienen 22 posibles BGCs que analizados en mayor profundidad resultan en un total de 23 BGCs (Tabla 28).



Tabla 28. BGCs identificados en *Streptomyces* sp. NTK937

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1	TIPKS	Notonesomicina A	3
2	NRPS	Griseusina	10
3	TIPKS, NRPS	Microtermolida A	53
4	Terpeno	Esteffimicina D	16
5	Ectoina	Ectoina	100
6	hgIE-KS	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	5
7	Hidrógeno-cianida	-	-
8	Lantipéptido clase II y clase III	-	-
9	Butilactona	Lactonamicina	5
10	TIPKS, NRPS-like	Arginomicina	20
11	RiPP-like	-	-
12	Terpeno	Carbapenem MM4550	10
13	Sideróforo	Kinamicina	13
14	NRPS-like	Amicetina	75
15	TIPKS	Auroramycin	4
16	Sideróforo, NRPS	Tiazostatina, watasemicina A y B, 2-hidroxi-feniltiazolina, enantiopiochelina y isopiochelina	73
17	PKS	Caboxamicina	100
18	Tiopéptido, Terpeno, LAP	Isorenierateno	85
19	RiPP-like	-	-
20	Terpeno	Hopeno	69
21	Sideróforo	Coelichelina	100
22	TIPKS	Bafilomicina B1	100
23	NRPS	Mirubactina	50

NRPS: Péptido Sintetasa No Ribosomal; **NRPS-like:** fragmento tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal; **PKS:** Policétido Sintasa; **TIPKS:** Policétidos Sintetas tipo I; **Lantipéptido clase II:** lantipéptido tipo mutacina II (U40620); **Lantipéptido clase III:** lantipéptido tipo labirintopeptina (FN178622); **RiPP-like:** producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; **RRE-containing:** elemento de reconocimiento de BGC; **hgIE-KS:** Policétido Sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa; **LAP:** péptidos lineales que contienen azol/pirrol o azolin.

3.2. Identificación del BGC con un gen tipo *ssfH* en *Streptomyces* sp. NTK937

Gracias a los cribados de PCR en esta cepa se detectó un posible gen codificador de Salicilato Sintasa (apartado 1.1.1.). Dicha secuencia, obtenida de forma experimental en el laboratorio, fue posteriormente localizada en el BGC 17 del genoma de *Streptomyces* sp. NTK937. El gen se identificó en el locus DT87_23840 y correspondía a la proteína KDQ70105.1. Esta proteína muestra un 74 % de aminoácidos idénticos con la proteína



SsfH. El gen que la codifica se localiza en el BGC 17 (Tabla 28). El BGC 17 se ha caracterizado previamente como el responsable de la producción de caboxamicina (Losada *et al.*, 2017) (Tabla 29 y Figura 31). El gen homólogo *ssfH* localizado por nuestro cribado de PCR es parte fundamental del BGC de la caboxamicina.

Tabla 29. Tabla de proteínas que componen el BGC responsable de la producción de caboxamicina en *Streptomyces sp. NTK937*

<i>Streptomyces sp. NTK937</i>	
Nº de acceso	Función
KDQ70105.1	Salicilato sintasa
KDQ70106.1	3-oxoacil-ACP sintasa
KDQ70107.1	Triostina sintetasa I
KDQ70108.1	Proteína hipotética
KDQ70109.1	Amidohidrolasa
KDQ70110.1	fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa
KDQ70111.1	2,3-dihidroxibenzoato-2,3-deshidrogenasa
KDQ70112.1	Isocorismatasa
KDQ70113.1	Antranilato sintasa

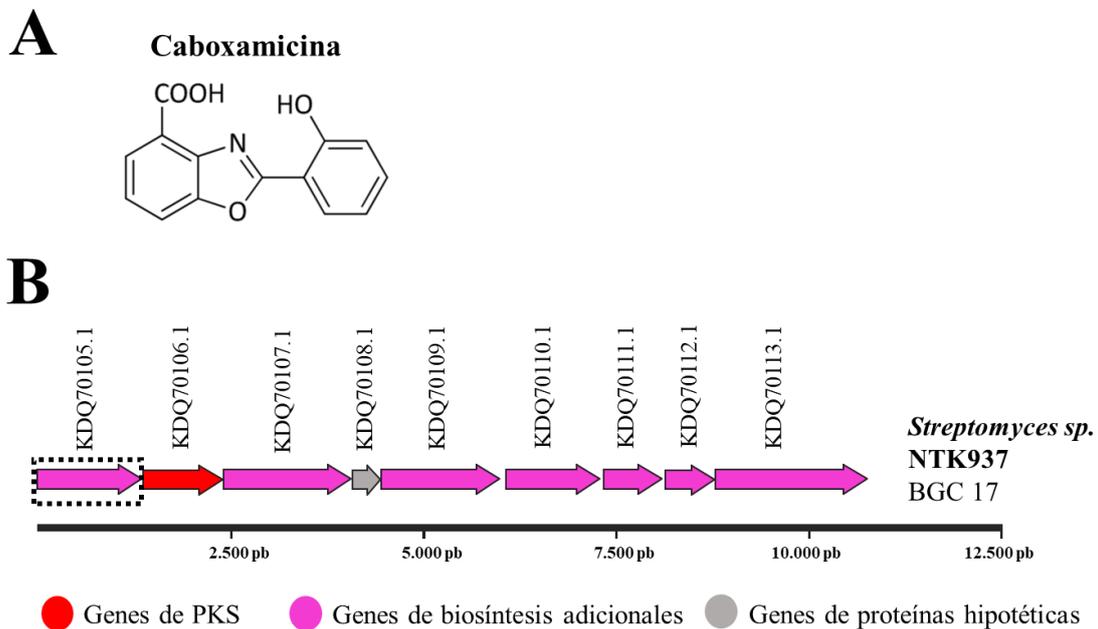


Figura 31. BGC de caboxamicina. **A:** Estructura de la caboxamicina. **B:** Esquema del BGC de caboxamicina en la cepa de *Streptomyces sp. NTK937*. Se marca con un cuadro el gene tipo *ssfH*. El BGC se representa a escala.



4. Análisis de la *Streptomyces sp.* CS123

4.1. Análisis bioinformático de la cepa *Streptomyces sp.* CS123

El genoma de la cepa *Streptomyces sp.* CS123 no se encuentra depositado en ninguna base pública y en su lugar se dispone de un genoma fragmentado e incompleto en numerosos *contigs* (1130 *contigs*), siendo el de mayor tamaño de 122.649 pb y el menor de 123 pb. Cuando se analizan estos *contigs* con la herramienta antiSMASH se identifican un total de 68 BGCs. Sin embargo, debido al reducido tamaño de muchos de los *contigs*, alrededor de la mitad de estos BGCs están asignados de forma incorrecta. Ha sido por ello necesario un análisis en mayor profundidad de estos BGCs, obteniéndose así un total de 36 posibles BGCs, en su mayoría incompletos. De estos 36 BGCs tres se encuentran divididos en dos *contigs* diferentes: un BGC de tipo PKS tipo 1 con homología al BGC de divergólido (BGCs 3A y 3B), incluidos en los nodos 5 y 49 respectivamente; dos BGCs tipo NRPS: uno con homología al BGC de coelichelina (BGCs 17A y 17B), incluidos en los nodos 69 y 220 respectivamente; y otro con homología al BGC de coelibactina (BGCs 31A y 31B), incluidos en los nodos 245 y 544 respectivamente. Un cuarto BGC se encuentran dividido en cuatro *contigs* diferentes. Este BGC correspondería al tipo híbrido PKS-NRPS con homología al BGC de totopotensamida A y B (BGCs 36A, 36B y 36C), incluidos en los nodos 624, 669 y 725 respectivamente. Ninguno de estos cuatro BGCs fragmentados contiene la secuencia completa de los BGCs homólogos correspondientes (Tabla 30).

Tabla 30. BGCs identificados en *Streptomyces sp.* CS123

<i>Nodo-BGC</i>	<i>Tipo</i>	<i>BGC conocido más similar</i>	<i>Homología (%)</i>
<i>1-1</i>	<i>Cofactor-redox</i>	-	-
<i>2-2</i>	<i>Lantipéptido clase I</i>	-	-
<i>5-3 A</i>	<i>TIPKS</i>	<i>Divergólido A, B, C y D</i>	34
<i>49-3 B</i>	<i>TIPKS</i>	<i>Divergólido A y B</i>	51
<i>9-4*1</i>	<i>PKS-like</i>	<i>Nataxazol</i>	18
<i>10-5</i>	<i>Oligosacárido, TIPKS</i>	<i>Loboforina A</i>	35
<i>13-6</i>	<i>PKS-like</i>	<i>Arseno-poliketido</i>	72
<i>18-7</i>	<i>Terpeno</i>	-	-
<i>21-8</i>	<i>NRPS</i>	<i>Mirubactina</i>	50
<i>23-9</i>	<i>TIPKS</i>	<i>Efomicina K y L</i>	25
<i>26-10</i>	<i>Amiglicicil</i>	<i>Jinggangmycin</i>	100



33-11	Terpeno	Hopeno	100
37-12	T1PKS, Otro* ²	Loboforina CR4	32
39-13	T2PKS	Curamicina	85
53-14	Lantipéptido clase III	SAL-2242	88
55-15	Fenacina	-	-
57-16	T3PKS	Flaviolina tetrahidroxinaftaleno	y 100
69-17 A	NRPS	Coelichelina	36
220-17 B	NRPS	Coelichelina	45
75-18	NRPS	Ishigamida	22
80-19	Terpeno	Albaflavonona	100
98-20	NRPS	Detoxina P1, P2 y P3	50
115-21	Indol	5-dimetilalilindol-3- acetoniitrilo	88
128-22	Betalactona	-	-
140-23	PKS-NRPS	Pactamidas	77
150-24	Lasopéptido	SSV-2083	33
163-25	T1PKS	Loboforina B	30
164-26	Terpeno	Carotenoide	45
166-27	Ectoina	Ectoina	100
169-28	Terpeno	2-metilisoborneol	100
184-29	NRPS	Nogalamicina	40
189-30	Hidrógeno-cianida	Aboricina	21
245-31 A	NRPS	Coelibactina	36
544-31 B	NRPS	Coelibactina	18
265-32	RIPP-like	Hexacosalactona A	4
305-33	Melanina	Melanina	100
443-34	Terpeno	Geosmina	100
614-35	T3PKS	Germicidina	100
624-36 A	NRPS	Totopotensamida A y B	7
669-36 B	NRPS-like	Totopotensamida A y B	7
725-36 C	T3PKS	Totopotensamida A y B	7

Cofactor-redox: cofactor redox como pirroquinolina derivados de péptidos. **NRPS:** Péptido Sintetasa No Ribosomal; **NRPS-like:** fragmento tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal; **PKS:** Policétido Sintasa; **T1PKS, T2PKS y T3PKS:** Policétidos Sintetas tipo I, II y III respectivamente; **PKS-like:** otro tipo de Policétido Sintetas; **PKS-NRPS:** híbrido Policétido Sintasa- Péptido Sintetasa No Ribosomal; **Lantipéptido clase I:** lantipéptido tipo nisina; **Lantipéptido clase III:** lantipéptido tipo labirintopeptina (FN178622); **RiPP-like:** producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; *¹: Estudios posteriores revelan que el BGC 4 es un BGC de micemicinas; *²: BGC que contiene una proteína relacionada con un metabolito secundario y que no encaja en ninguna otra categoría.

4.2. Identificación de BGCs con un gen tipo *ssfH* en *Streptomyces* sp. CS123

Gracias a los cribados de PCR se identificó en *Streptomyces* sp. CS123 un gen similar a *ssfH* (apartado 1.1.1. de Resultados) que se denominó *cs_ssfH-1* y que no pudo



ser identificado inicialmente en el genoma parcial de CS123. Además de este gen, se identificó otro más utilizando el programa *SnapGene* (Insighful Science) (apartado 1.2. de Métodos y Materiales). Este segundo gen similar a *ssfH* se localiza en el extremo del *contig* 362 y se ha denominado gen *cs_ssfH-2*. Un estudio de homología en BLATN, del fragmento génico amplificado del gen *cs_ssfH-1* y el gen *cs_ssfH-2* identificado en el *contig* 362, reveló que no se trataban del mismo gen. Así, la cepa *Streptomyces* *cp.* CS123 contiene dos genes homólogos *ssfH*. El estudio realizado por antiSMASH inicialmente no pudo asociar estos genes a ningún BGC.

4.3. Generación del mutante Δ CS_ssfH-1

Con el fin de asignar un papel al gen *cs_ssfH-1*, se generó un mutante en el mismo utilizando el fragmento obtenido mediante amplificación de PCR del gen *cs_ssfH-1* que se clonó en el plásmido suicida en *Streptomyces* pOJ260, generándose la construcción, pOJ260- Δ cs_ssfH-1 (Figura 13). La introducción de pOJ260- Δ cs_ssfH-1 en CS123 permitió su recombinación con el gen *cs_ssfH-1* presente en el cromosoma de CS123, resultando en la interrupción del gen al insertarse en el mismo y por tanto inactivándolo (Figura 32A). Este mutante se construyó con el fin de encontrar compuestos diferenciales al comparar los perfiles metabólicos de la cepa silvestre y de esta cepa mutante a la que se denominó Δ cs_ssfH-1.

Los transconjugantes se seleccionaron con el antibiótico apramicina y se comprobaron genéticamente realizando distintas reacciones de PCR, a partir de ADN genómico extraído tanto de los mutantes como de la cepa silvestre. Finalmente, los amplicones de esas PCRs se comprobaron por secuenciación.

Debido al desconocimiento de la secuencia nucleotídica de ambos extremos del gen *cs_ssfH-1*, la comprobación de la cepa mutante se realizó en base a la ausencia o presencia del plásmido. Para ello se realizaron dos PCRs que no mostraría amplificación en la cepa silvestre y sí en la cepa Δ cs_ssfH-1 y en el plásmido utilizado para introducir la mutación, ya que en ambas PCRs se utiliza un oligonucleótido comercial que anilla en el *polilinker* del plásmido pOJ260, (M13F o M13R), y un oligonucleótido diseñado para anillar en alguno de los extremos del fragmento génico usado para la interrupción, (*ssfH_50_F1* o *ssfH_50_R1*). Con esta comprobación se deben obtener amplificaciones



de aproximadamente 1 Kb tanto para el ADN plasmídico pOJ260- Δcs_ssfH-1 , como para el ADN cromosómico del mutante Δcs_ssfH-1 , pero no para el ADN cromosómico de la cepa silvestre. De esta forma se confirma la interrupción del gen *cs_ssfH-1* por el plásmido pOJ260- Δcs_ssfH-1 en la cepa Δcs_ssfH-1 (Figura 32B y 32C).

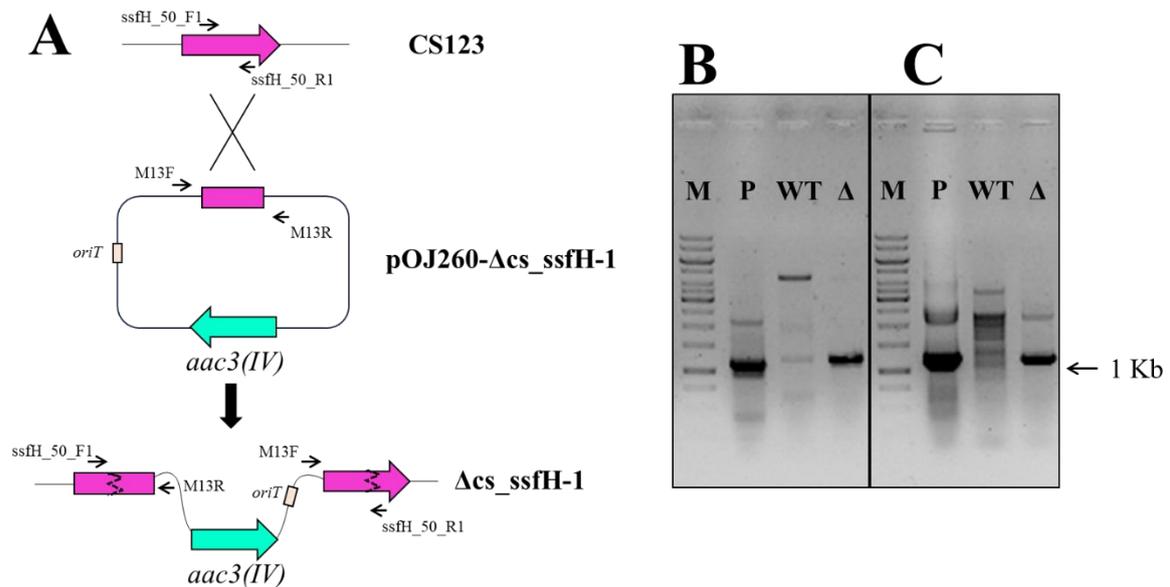


Figura 32. Generación de la cepa mutante Δcs_ssfH-1 . **A:** Esquema de la interrupción del gen *cs_ssfH-1* utilizando la construcción pOJ260- Δcs_ssfH-1 . Comprobación por PCR de la interrupción (B y C); **B:** amplificación con los oligonucleótidos M13R y *ssfH_50_F1*; **C:** amplificación con los oligonucleótidos M13F y *ssfH_50_R1*. **M:** Marcador de peso molecular; **P:** Plásmido pOJ260- Δcs_ssfH-1 ; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa Δcs_ssfH-1 . *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina. *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*.

4.3.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δcs_ssfH-1

La cepa silvestre CS123 y la cepa mutante Δcs_ssfH-1 se cultivaron en ocho medios de cultivo diferentes (R5A, TSB, SM1, SM7, SM10, SM20, SM25 y SM30). De estos cultivos de 50 mL se tomaron muestras de 1 mL a los 3, 5 y 7 días. Las muestras se extrajeron de forma independiente con tres solventes orgánicos diferentes (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol). Los extractos resultantes se analizaron por UPLC, lo que permitió comparar los perfiles metabólicos de ambas cepas entre sí. Para todas las condiciones de cultivo y extracción ensayadas, los perfiles cromatográficos no revelaron diferencias significativas de interés cuando se comparaban



ambas cepas, como se muestra para los extractos a día 5 de cultivo en alguno de los medios ensayados (Figura 33).

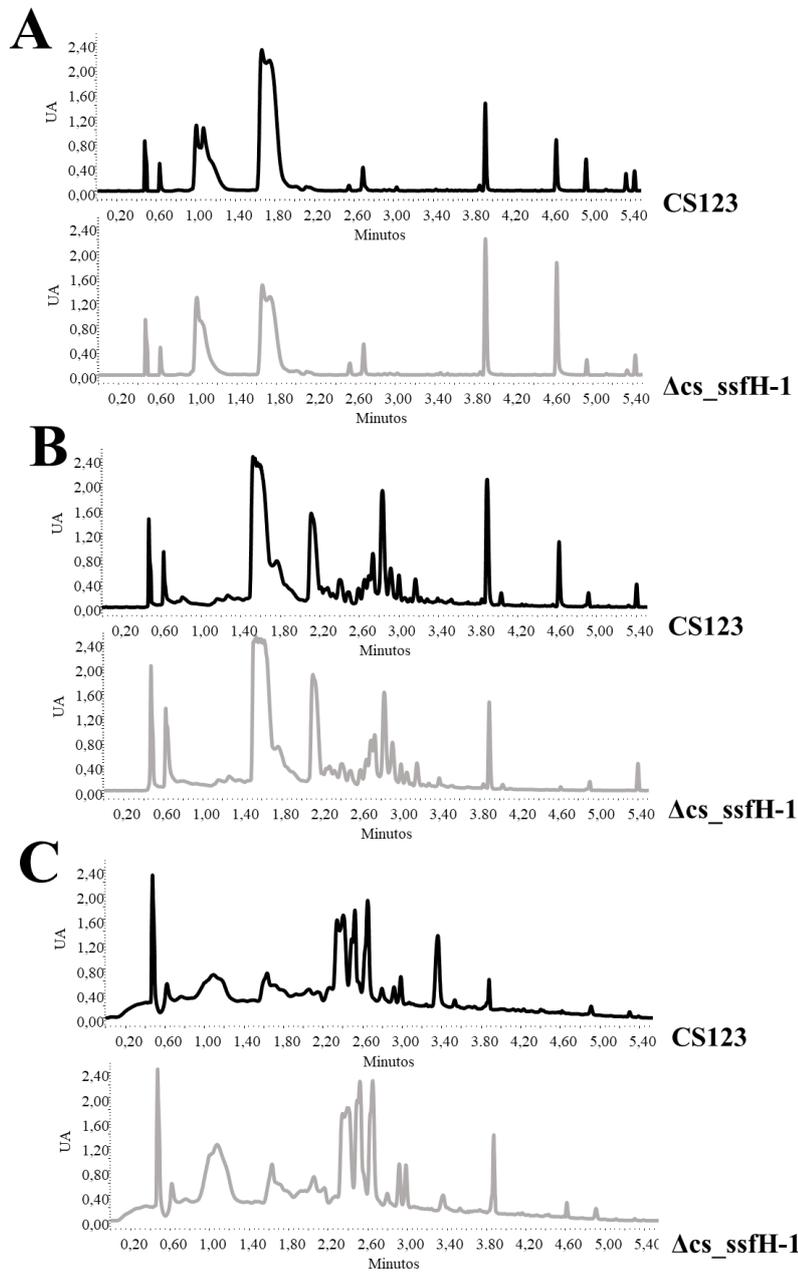


Figura 33. Comparación de perfiles metabólicos del mutante Δcs_ssfH-1 y la cepa silvestre CS123. Cromatogramas de UPLC (Maxplot). **A:** Extractos de acetato de etilo de cultivos de 5 días en SM10. **B:** Extractos de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico de cultivos de 5 días en SM20. **C:** Extractos de butanol de cultivos de 5 días en SM7.



4.3.2. Reanálisis de la secuencia del gen *cs_ssfH-1* y su localización en un BGC de micemicinas

La imposibilidad de localizar en el genoma de CS123 el gen *cs_ssfH-1*, hizo necesaria la obtención de una secuenciación de mejor calidad de dicho gen. El análisis con BLASTN de la nueva secuencia mostró una alta homología del gen *cs_ssfH-1* con genes codificantes de salicilatos sintasas características de BGCs de micemicinas. Gracias a la última actualización de antiSMASH se pudo detectar en el *contig* 9 un BGC con homología del 91 % al de micemicinas (Tabla 31 y Figura 34). Este BGC contiene un gen que codifica una Salicilato Sintasa con una homología de 98,35 % y una cobertura de 78 % con el gen *cs_ssfH-1*, puesto que la secuencia del gen *cs_ssfH-1* está incompleta. Por tanto, el gen *cs_ssfH-1* formaría parte del BGC 4 de micemicinas (Tabla 31 y Figura 34).

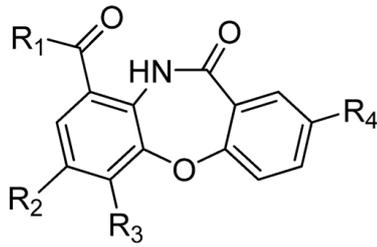
Tabla 31. Similitud entre las proteínas codificadas por el BGC de micemicinas A, B y C de *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 y las del BGC 4 detectado en el *contig* 9 de *Streptomyces* sp. CS123

<i>Streptomyces olivaceus</i> FXJ8.012	Función	<i>Streptomyces</i> sp. CS123	
Nº de acceso		nt <i>contig</i> 9	Ident. %
AVR52602.1	Proteína hipotética	37.635 - 39.593	97
AVR52603.1	Proteína hipotética	x	x
AVR52604.1	Salicilato sintasa	36.362 - 37.597	98
AVR52605.1	Metiltransferasa	34.597 - 36.189	97
AVR52606.1	Triptófano 2.3 -dioxigenasa	34.031 - 34.558	97
AVR52607.1	Amidohidrolasa	32.583 - 33.977	98
AVR52608.1	Proteína de unión a fosfopanteteína	31.033 - 32.568	100
AVR52609.1	Sintetasa dependiente de AMP	27.798 - 31.007	98
AVR52610.1	3-oxoacil-ACP sintasa	26.868 - 27.752	99
AVR52611.1	Proteína hipotética	25.181 - 26.728	98
AVR52612.1	3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa	24.052 - 25.065	99
AVR52613.1	Metiltransferasa	23.009 - 23.854	100
AVR52614.1	Regulador transcripcional Lrp/AsnC	21.824 - 22.882	99
AVR52615.1	Transportador MFS	21.078 - 21.758	99
AVR52616.1	Hidrolasa	20.001 - 21.026	98
AVR52617.1	Regulador tipo SARP	18.340 - 20.004	97
AVR52618.1	Triptófano halogenasa	18.095 - 18.343	99
AVR52619.1	Transportador NA/H	16.557 - 18.098	97
AVR52620.1	Flavín reductasa	15.712 - 16.560	98
AVR52621.1	Triptófano halogenasa	14.604 - 15.659	99
AVR52622.1	Quinureninasa	13.122 - 14.513	98
AVR52623.1	Regulador tipo SARP	12.142 - 12.744	97
AVR52624.1	Proteína hipotética	x	x

nt: nucleótido; Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos; x: proteína no presente en el *contig* 9.



A Micemicina

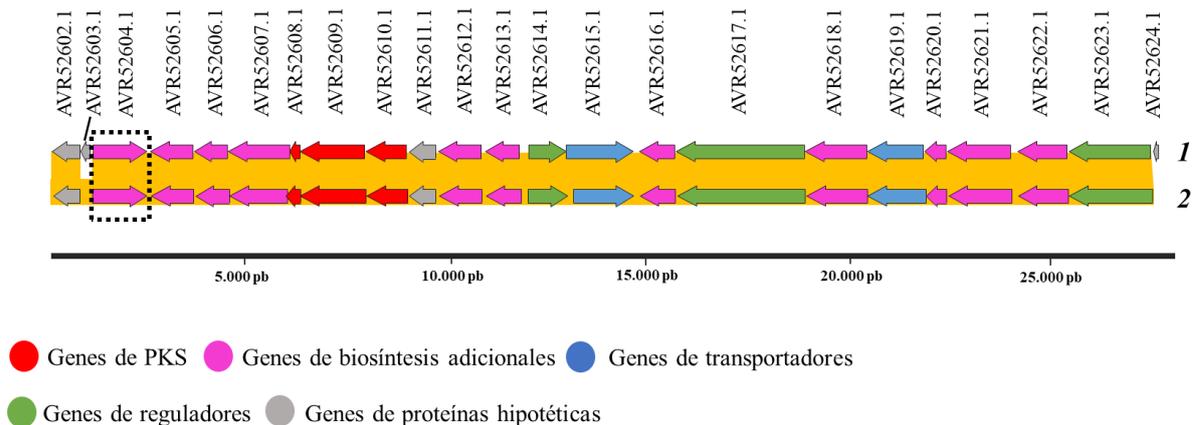


Micemicina A: R₁=OMe, R₂=R₃=R₄=H

Micemicina B: R₁=OMe, R₂=R₃=H, R₄=Cl

Micemicina C: R₁=OMe, R₂=Cl, R₃=CH₃, R₄=Cl

B



(1) *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 (2) *Streptomyces* sp. CS123 BGC 4

Figura 34. BGCs de micemicinas. **A:** Estructuras de las micemicinas. **B:** Comparación de los BGCs de micemicinas de *S. olivaceus* FXJ8.012 y *Streptomyces* sp. CS123. En amarillo se muestran los genes homólogos. Se marca con un cuadro los genes tipo *ssfH*. Los BGCs se representan a escala.

4.4. Generación del mutante Δ362

Por otro lado, también se generó un mutante en la región del AND que contiene el gen *cs_ssfH-2* (*c1*), que está incluido en el *contig* 362. Para ello, se construyó el plásmido pHZ-Δcontig362 (Figura 18), diseñado para la eliminación completa de los genes *c3*, *c4*, el extremo 5' de *c5* y el extremo 3' de *c2*, presentes en el *contig* 362. Se decidió eliminar estos genes en lugar del gen *c1* (*cs_ssfH-2*), ya que estos están situados hacia la mitad del *contig* 362 y por ello facilitaban el reemplazamiento génico, lo que no sucede con el gen *c1* que se localiza en un extremo del *contig*. El plásmido pHZ-Δcontig362 se introdujo en la cepa CS123 mediante conjugación intergenérica y se seleccionaron los transconjugantes por su resistencia a apramicina y sensibilidad a tioestreptona (Figura 35A), en los que se había producido un reemplazamiento génico de



un total de 3,9 Kb correspondientes a los genes presentes en pHZ- Δ contig362, por el *cassette aac(3)IV*. De esta forma se obtuvo la cepa mutante Δ 362. El reemplazamiento génico se comprobó por amplificación por PCR sobre ADN genómico extraído tanto de los mutantes Δ 362 como de la cepa silvestre. Se realizaron dos reacciones de PCR para comprobar dichos mutantes, usando dos parejas de oligonucleótidos, contig_F2 junto a contig_R5 y contig_F2 junto a contig_R1. La primera pareja de oligonucleótidos anilla fuera de la zona reemplazada, lo que resulta en una amplificación de un fragmento de ADN de 4,1 Kb en la cepa silvestre y de 1,7 Kb en la cepa mutante Δ 362 (Figura 35B). Mientras que en la segunda pareja, uno de los oligonucleótidos realiza el anillamiento fuera de la zona reemplazada y el otro dentro de ella, que solo existiría en la cepa silvestre. Así, en la cepa silvestre se amplifica una banda de 1,9 Kb mientras que hay ausencia de amplificación en la cepa Δ 362 (Figura 35C). Los fragmentos de PCR obtenidos se confirmaron por secuenciación.

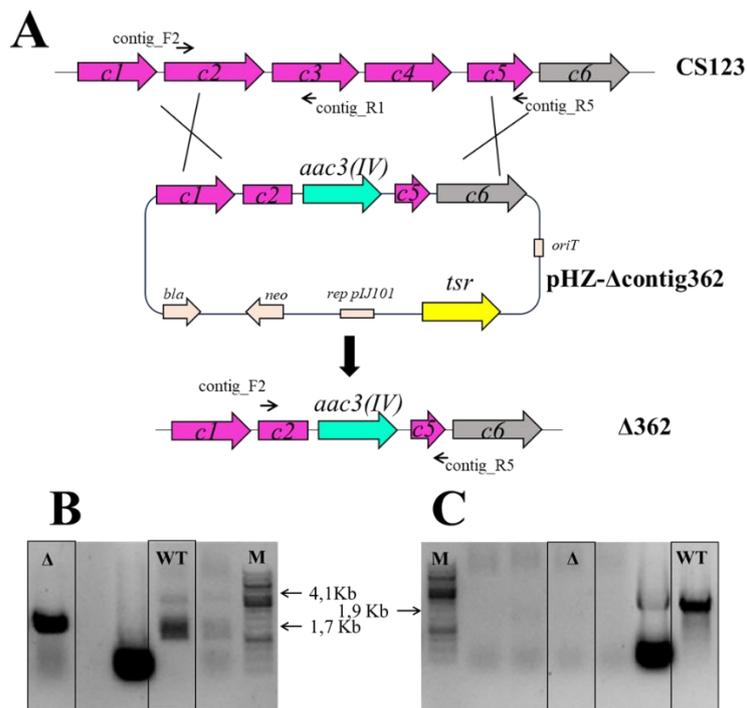


Figura 35. Generación de la cepa mutante Δ 362. **A:** Esquema de reemplazamiento génico utilizando el plásmido pHZ- Δ contig362. **B:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos contig_F2 y contig_R5. **C:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos contig_F2 y contig_R1. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa Δ 362. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación de *Streptomyces* inestable.



4.4.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante $\Delta 362$

Se estudiaron los perfiles metabólicos de las cepas CS123 y $\Delta 362$ cultivadas en 50 mL de medio R5A. Para ello se tomaron muestras de los cultivos a los 3, 5 y 7 días que se extrajeron con cuatro solventes orgánicos de forma independiente (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol). Los extractos resultantes se analizaron por UPLC permitiendo la comparación de los perfiles metabólicos de ambas cepas en las diferentes condiciones. No se observaron diferencias entre los perfiles metabólicos de ambas cepas en ninguna de las condiciones ensayadas. Como ejemplo se muestra la extracción de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico, de cultivos a los 7 días de incubación (Figura 36).

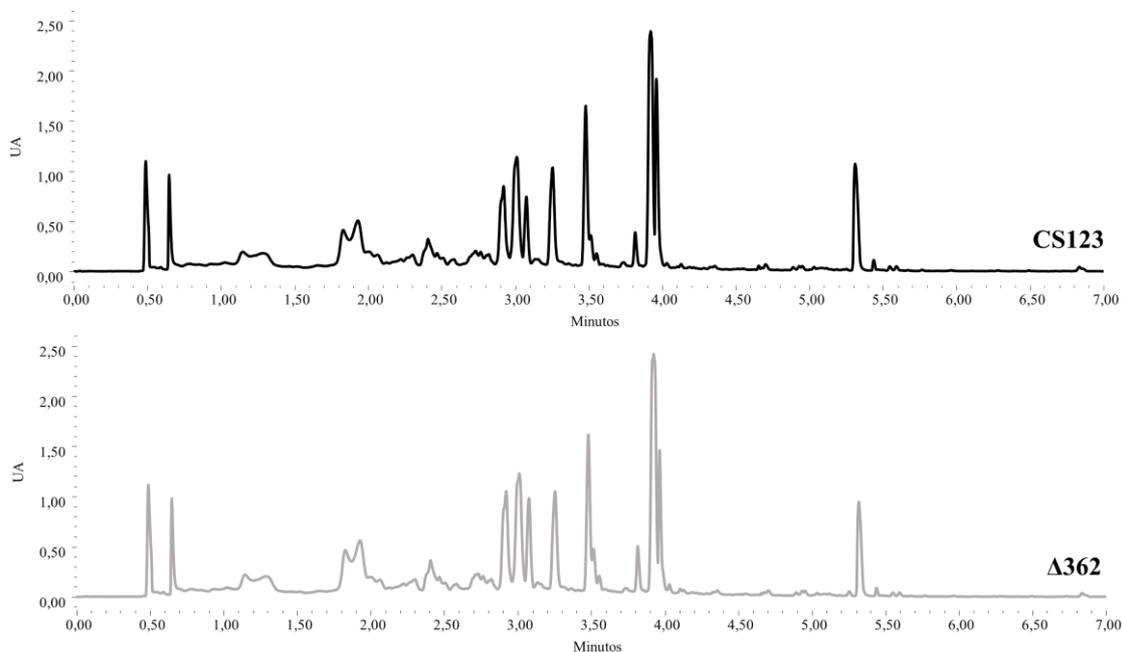


Figura 36. Comparación de perfiles metabólicos de la cepa CS123 y del mutante $\Delta 362$. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico de CS123 y $\Delta 362$, cultivados durante 7 días en R5A.

4.4.2. Análisis del *contig 362*

Sin resultados diferenciales en el cultivo de la cepa mutante $\Delta 362$, que presenta afectados cuatro de los seis genes del *contig 362*, y sin información por parte de antiSMASH para asociar estos genes a un BGC, se optó por un análisis bioinformático más profundo del *contig 362* para hipotetizar sobre el BGC al que podrían pertenecer dichos genes. Este análisis consiste en detectar zonas conservadas en los genomas de



Streptomyces, que contengan los mismos genes que tiene el *contig* 362 y estudiar las secuencias aguas arriba y aguas abajo de estos genes, para detectar si existe un BGC cercano al que se pueda asociar la presencia de estos genes.

Para ello se realizaron análisis por BLASTP de las proteínas que eran codificadas por cada uno de los seis genes que ocupan las 8.175 pb del *contig* 362. Los genes fueron nombrados de *c1* a *c6*, siendo *c1* el gen *cs_ssfH-2*. Entre los resultados de los BLASTP se cribaron las cepas de *Streptomyces* que contuvieran al menos 5 de estas 6 proteínas con una alta homología, y que, además los genes codificantes de dichas proteínas se encontraran consecutivos en el genoma de la cepa, compartiendo el entorno génico. Siguiendo estos criterios se seleccionaron ocho cepas, *Streptomyces sp.* B146, *Streptomyces sp.* CT1 - 17 26, *Streptomyces sp.* STCH 565 A, *Streptomyces sp.* VN1, *Streptomyces olivaceus* NRRL B-3009, *Streptomyces sp.* CB09030, *Streptomyces sp.* A13 y *Streptomyces sp.* NBC_00830 (Tabla 32). Se identificaron los genes en el genoma de cada una de las ocho cepas, así como los genes aguas arriba y aguas abajo de estos, obteniéndose el entorno génico. Los entornos génicos de todas ellas fueron comparados detectándose alta homología entre las ocho cepas y la cepa CS123 de los genes *c1* a *c5* y de los genes aguas arriba de los mismos. Se observó también, la presencia de dos grupos diferentes, uno que incluía el gen *c6* y los genes aguas abajo de este y otro que carecía del gen *c6* y contenían otros genes conservados entre sí aguas abajo del gen *c5* (Figura 37). El análisis por antiSMASH 7.1.0 de estas regiones génicas permitió determinar que el gen *c1* y los genes aguas arriba del mismo, corresponden al BGC de coelibactina, homólogo al descrito en *S. coelicolor*. Los genes *c2-c5* están presentes en todas las cepas analizadas y en el caso de las cepas *Streptomyces sp.* B146, *Streptomyces sp.* CT1 - 17 26, *Streptomyces sp.* STCH 565 A y *Streptomyces sp.* VN1 también está el gen *c6* (Figura 37). Los genes *c2-c6* no se encuentran en el BGC de coelibactina de *S. coelicolor* ni en sus inmediaciones. Sin embargo, el hecho de que los genes *c2* a *c5* estén tan conservados en CS123 y en las otras cepas de *Streptomyces* identificadas en este trabajo, sugiere que los mismos forman parte de este BGC de tipo coelibactina. De la misma forma se conservan los bloques de genes A o B en las diferentes cepas estudiadas (Figura 37), lo que podría sugerir que también forman parte de este BGC, pudiendo dar diferentes variantes del compuesto coelibactina.



Finalmente, en el genoma de CS123 no se ha identificado un *contig* que contenga el BGC de coelibactina con los genes agua arriba de *c1*. Sin embargo, sí se han identificado en el *contig* 477 los genes *c7-c14*. Este *contig* presenta un 99% de homología con respecto al fragmento de ADN correspondiente a los genes *c7-c14* del bloque de genes A de *Streptomyces sp.* B146. Esto sugiere que el BGC tipo coelibactina de CS123 podría pertenecer a aquellos que contienen el bloque de genes A.

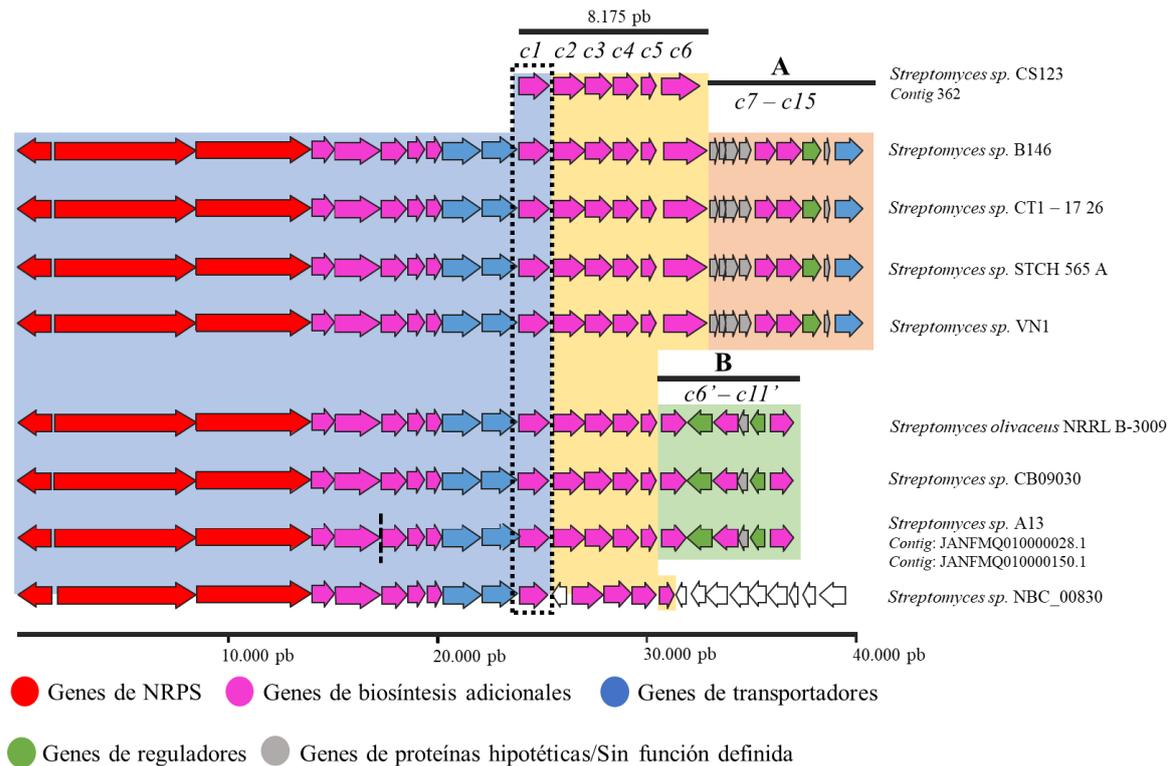


Figura 37. Homologías de los genes del *contig* 362 e identificación del entorno génico en las cepas de *Streptomyces* seleccionadas. En amarillo genes homólogos a *c2-c6*. En azul BGC coelibactina. En naranja y verde dos bloques de genes conservados entre las cepas. Los genes en blanco representan genes sin homólogos entre las cepas comparadas. Representación a escala. Se marca con un cuadro los genes tipo *ssfH*.

Tabla 32. Identificación en ocho cepas de *Streptomyces* de las proteínas homólogos a los productos codificados por los genes del contig 362

<i>orf contig 362</i>	c1		c2		c3		c4		c5		c6	
Tamaño (aa)	640		445		445		407		270		454	
Función	<i>Salicilato Sintasa</i>		<i>Descarboxilasa</i>		<i>Cisteína Sintasa</i>		<i>Aminotransferasa</i>		<i>Metiltransferasa</i>		<i>Histidina Kinasa</i>	
	Nº de acceso	Ident. (%)	Nº de acceso	Ident. (%)	Nº de acceso	Ident. (%)	Nº de acceso	Ident. (%)	Nº de acceso	Ident. (%)	Nº de acceso	Ident. (%)
<i>Streptomyces</i> sp. B146	WP_277724 135.1	99	WP_194274 966.1	100	WP_031035 934.1	100	WP_277724 134.1	100	WP_194274 964.1	100	WP_277724 133.1	98
<i>Streptomyces</i> sp. CT1 - 17 26	WP_037770 883.1	98	WP_070389 697.1	97	WP_037770 885.1	99	WP_070389 699.1	98	WP_037770 886.1	99	WP_227730 803.1	97
<i>Streptomyces</i> sp. STCH 565 A	WP_252103 584.1	99	WP_194274 966.1	100	WP_031035 934.1	100	WP_224298 887.1	100	WP_194274 964.1	100	WP_252103 585.1	98
<i>Streptomyces</i> sp. VN1	WP_228773 839.1	97	WP_166625 459.1	97	WP_070389 698.1	99	WP_166625 460.1	98	WP_031035 938.1	99	WP_228773 840.1	98
<i>Streptomyces</i> olivaceus NRRL B-3009	WP_195890 002.1	99	WP_031035 934.1	99	WP_031035 934.1	100	WP_195890 004.1	99	WP_194274 964.1	100	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. CB09030	WP_243781 279.1	98	WP_243781 280.1	99	WP_031035 934.1	100	WP_243781 281.1	99	WP_224298 888.1	100	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. A13	WP_263243 025.1	99	WP_224334 011.1	99	WP_224334 012.1	99	WP_224348 125.1	98	WP_224298 888.1	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. NBC_00830	WTB29678.1	78	WTB29676.1	84	WTB29675.1	94	WTB29674.1	85	WTB29673.1	82	-	-

Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos.





5. Análisis de *Streptomyces glaucescens* GLA.O

5.1. Análisis bioinformático de la cepa *Streptomyces glaucescens* GLA.O

Streptomyces glaucescens GLA.O tiene un genoma de 7.453.200 pb, cuyo número de acceso en el NCBI es NZ_CP009438.1. El análisis con antiSMASH 7.1.0 de este genoma identifica 27 posibles BGCs que analizados en mayor profundidad resultan en un total de 28 BGC (Tabla 33).

Tabla 33. BGCs identificados en *Streptomyces glaucescens* GLA.O

BGC	Tipo	BGC conocido más similar	Homología (%)
1	Tiopéptido, LAP	Lactazole	55
2	NRPS-like, Betalactona	Acarviostatina I03, II03, III03 y IV03	33
3	Amglicil	Hidroxiestreptomicina	90
4	Hidrógeno-cianida	Aboricina	21
5	Terpeno	Isorenierateno	100
6	RiPP-like	Streptamidina	75
7	Melanina	Melanina	57
8	Sideróforo, NRPS	Tiazostatina, watasemicina A y B, 2-hidroxifeniltiazolina, enantiopiochelina y isopiochelina	73
9	Otro* ¹	Griseusina	12
10	hglE-KS	Nataxazol	7
11	Ectoina	Ectoina	100
12	Melanina	Melanina	100
13	Sideróforo	Desferrioxamina B y E	100
14	Terpeno	Albaflavonona	100
15	Sideróforo	Kinamicina	13
16	Lasopéptido	-	-
17	Butirolactona	-	-
18	RiPP-like	-	-
19	Terpeno	Geosmina	100
20	T2PKS	Tetracenomicina C	100
21	Sideróforo	Paulomicina	9
22	Terpeno	Hopeno	69
23	T2PKS	Curamicina	100
24	T2PKS	Alociclinona	45
25	Terpeno	-	-



26	RiPP-like	Informatipeptina	42
27	Lasopéptido	Citrusinasina E	100
28	NRPS	Ciclofaulknamicina	8

LAP: péptidos lineales que contienen azol/pirrol o azolin; **NRPS:** Péptido Sintetasa No Ribosomal; **NRPS-like:** fragmento tipo Péptido Sintetasa No Ribosomal; **T2PKS:** Policétidos Sintetas tipo II; **RiPP-like:** producto peptídico no especificado, sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente; **hgIE-KS:** Policétido Sintetasa tipo heterocisto glicolípido sintetasa. *¹: BGC que contiene una proteína relacionada con un metabolito secundario y que no encaja en ninguna otra categoría.

5.2. Identificación del BGC con un gen tipo *ssfH* en *Streptomyces glaucescens* GLA.O

En el genoma *S. glaucescens* se detectó por BLASTP una proteína similar a SsfH. Esta proteína es WP_244315172.1, presenta un 54 % de aminoácidos idénticos con la proteína SsfH. El gen responsable de codificar esta proteína es el gen SGLAU_RS04345 que se localiza en el BGC 8 (Tabla 33). El estudio por antiSMASH muestra que el BGC 8 presenta una homología del 73 % con un BGC en *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 que es responsable de la biosíntesis de tiazostatina, watasemicina, isopiochelina (tres variantes de la misma molécula con diferentes metilaciones), además de otras variaciones de estas moléculas en las que se pierde parte de la estructura (Inahashi *et al.*, 2017). Siendo el BGC 8 de *S. glaucescens* el que presenta menos homología a otro ya descrito, de todos los identificados en nuestra búsqueda de BGCs que contengan genes homólogos a *ssfH*, y por tanto potencialmente interesante por ser desconocido, se decidió estudiarlo en mayor profundidad.

5.3. BGC 8 de cepa *Streptomyces glaucescens* GLA.O

En *S. glaucescens* se encontró un gen homólogo al gen *ssfH*. Este gen se localiza en el BGC 8 que antiSMASH identifica y clasifica como de tipo NRPS, sideróforo. Según este programa este BGC consta de una secuencia de aproximadamente 108.800 pb y se compone de 74 genes (Figura 38).

Entre las funciones de los productos génicos del BGC 8 encontramos ocho genes para NRPS (*orf14*, *orf22*, *orf23*, *orf24*, *orf35*, *orf57*, *orf59* y *orf60*), seis genes codificantes de transportadores (*orf16*, *orf17*, *orf19*, *orf20*, *orf35* y *orf38*), once genes a los que se les pueden asociar funciones reguladoras (*orf1*, *orf5*, *orf8*, *orf11*, *orf26*, *orf29*, *orf36*, *orf37*, *orf40*, *orf56* y *orf61*), seis genes que se etiquetan como proteínas hipotéticas



(*orf2*, *orf10*, *orf28*, *orf41*, *orf52* y *orf64*) y las restantes 45 *orfs* son posibles genes de biosíntesis adicional, entre ellos la *orf12* que es la *ssfH* homóloga encontrada (Tabla 34).

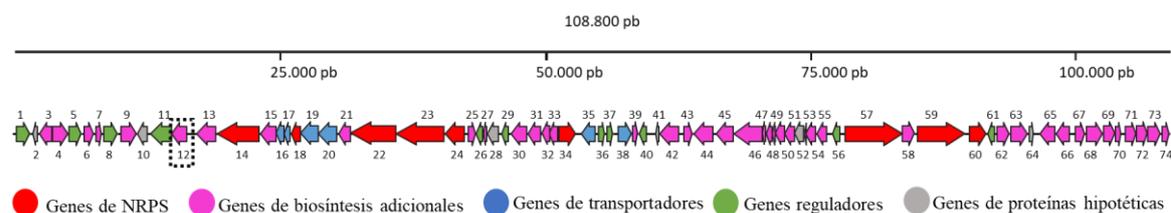


Figura 38. Esquema del BGC 8 detectado en *Streptomyces glaucescens*. Se marca con un cuadro el gen tipo *ssfH*.

El BGC 8 presenta homología con el BGC de biosíntesis de tiazostatina, watasemicina A y B, 2-hidroxifeniltiazolina, enantiopiochelina y isopiochelina en *S. venezuelae*. La homología con este BGC es del 73 % y esto sumado a la presencia de genes de biosíntesis diferentes a los del BGC de *S. venezuelae*, así como la ausencia de otros presentes en el BGC de *S. venezuelae*, indica que se trataría de un BGC que codificaría la biosíntesis de un compuesto diferente a los anteriormente mencionados.

Tabla 34. Tabla de genes del BGC 8 de *Streptomyces glaucescens* GLA.O

<i>orf</i>	Número de aas	Nº de acceso	Función	Proteína más similar	Ident. (%)
1	430	WP_043498518.1	Helicasa de la familia SWF o SNF	WP_365767904.1	80
2	157	WP_078957584.1	Proteína hipotética	WP_324939836.1	76
3	388	WP_043498519.1	Xilosa isomerasa	WP_086741651.1	99
4	481	WP_043498521.1	Xylulokinasa	WP_324939830.1	100
5	402	WP_043498524.1	Regulador transcripcional de la familia ROK	WP_324939827.1	99
6	339	WP_043498526.1	Proteína de la familia de las acetamidasa /formamidasa	WP_365927979.1	97
7	199	WP_043498529.1	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	WP_365766969.1	95
8	454	WP_078957585.1	Regulador transcripcional con dominio GAF	WP_078632551.1	86
9	507	WP_043498530.1	Aldehído deshidrogenasa	WP_073943590.1	94
10	313	WP_244315171.1	Proteína hipotética	MDQ1022612.1	83
11	658	WP_078957586.1	Regulador transcripcional tipo SARP	WP_319676293.1	75
12	452	WP_244315172.1	Salicilato sintasa	MFI6403227.1	76
13	614	WP_043498533.1	Aspargagina sintasa	WP_324937042.1	92
14	1321	WP_078957587.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WTX66786.1	72
15	498	WP_052413608.1	Transportador ABC	MFI5798204.1	82



16	256	WP_208868882.1	Componente T del transportador tipo ECF	MFI5798203.1	83
17	191	WP_052414045.1	Componente S del transportador tipo ECF	WP_086735879.1	98
18	267	WP_063838864.1	Tioesterasa	WP_324937033.1	85
19	571	WP_043498537.1	Transportador ABC	WP_324937031.1	94
20	586	WP_208868883.1	Transportador ABC	WP_324937029.1	93
21	361	WP_052413609.1	Oxidoreductasa	WP_324937027.1	93
22	1414	WP_052413610.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_324937025.1	88
23	1537	WP_052413611.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_324937023.1	90
24	603	WP_052413612.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_324937021.1	93
25	235	WP_244315319.1	Triptófano 2,3-dioxigenasa	MYY19760.1	82
26	162	WP_052413614.1	Regulador transcripcional con dominio HTH	MFI1190977.1	89
27	75	WP_043498542.1	Proteína accesoria MbtH	MFI5798193.1	83
28	335	WP_159072762.1	Proteína hipotética	WP_189179804.1	81
29	201	WP_159072763.1	Regulador transcripcional LuxR	WP_356941838.1	85
30	522	WP_078957590.1	Triptófano halogenasa	WP_324937005.1	89
31	415	WP_043506264.1	Aminotransferasa	MFI5798189.1	92
32	248	WP_043498546.1	Oxidoreductasa	WP_391801638.1	88
33	255	WP_244315174.1	Hidroxilasa	MFI5798191.1	76
34	536	WP_043498548.1	Proteína de unión a AMP	WP_352191728.1	87
35	450	WP_244315175.1	Transportador MFS	SCK52745.1	82
36	219	WP_043498549.1	Regulador transcripcional TetR	WP_229815955.1	80
37	181	WP_244315176.1	Regulador transcripcional con dominio HxlR	MFI5798185.1	78
38	439	WP_043498551.1	Antiporter catión:protón	WP_389574645.1	80
39	177	WP_078957594.1	Flavin reductasa	WP_389574647.1	87
40	230	WP_043498553.1	Regulador transcripcional tipo TetR	WP_361674740.1	78
41	100	WP_159072764.1	Proteína hipotética	WP_327419589.1	69
42	599	WP_043498557.1	Carbamoiltransferasa	WP_356941824.1	90
43	303	WP_052413618.1	Hidrolasa	GAA2049004.1	76
44	576	WP_244315177.1	Ácido graso AMP-ligasa	WP_356941826.1	76
45	546	WP_052413619.1	Ácido graso AMP-ligasa	WP_314219530.1	81
46	906	WP_052413620.1	Aminotransferasa	WP_356941828.1	85
47	92	WP_043498560.1	Proteína acyl-carrier	WP_344107051.1	85
48	188	WP_052413621.1	4'-fosfopanteteinil transferasa	WP_360895927.1	75
49	88	WP_043498561.1	Proteína acyl-carrier	WP_363252771.1	81
50	288	WP_043498563.1	Hidrolasa	WP_148648170.1	79
51	334	WP_052413622.1	Nitrato monoxigenasa	WP_367485317.1	84
52	275	WP_043498565.1	Proteína hipotética	WP_356941834.1	86
53	81	WP_043498567.1	Proteína acyl-carrier	WP_324937084.1	93



54	292	WP_043498568.1	Metaloenzima	WP_363252776.1	92
55	326	WP_043498569.1	Proteína hipotética	WP_363646174.1	87
56	201	WP_043498570.1	Regulador transcripcional con dominio REC y LuxR	WP_356941838.1	85
57	1827	WP_043498571.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_066933842.1	77
58	380	WP_052413623.1	Sacaropina deshidrogenasa dependiente de NAD	MFI6403198.1	71
59	1496	WP_052413624.1	Péptido sintetasa no ribosomal	WP_066933853.1	70
60	532	WP_043498573.1	Proteína de unión a AMP	WP_066933859.1	82
61	221	WP_043498576.1	Regulador transcripcional tipo TetR	MFI6403202.1	77
62	403	WP_043498578.1	Citocromo P450	WP_324939820.1	94
63	522	WP_159072765.1	Flavin monooxigenasa	WP_324939818.1	92
64	161	WP_043498580.1	Proteína con función desconocida	WP_324939815.1	93
65	486	WP_043498584.1	Oxidoreductasa dependiente de FAD	WP_324939812.1	95
66	408	WP_043498587.1	Polisacárido piruvil transferasa	WP_365766648.1	90
67	320	WP_043506283.1	Epimerasa	WP_324939806.1	94
68	554	WP_043498589.1	Carbamoiltransferasa	WP_324939803.1	96
69	362	WP_052413626.1	Glicosiltransferasa	WP_324939801.1	85
70	554	WP_078957600.1	Histidinol fosfatasa	WP_324939798.1	91
71	371	WP_078957601.1	Glicosiltransferasa (heptosyltransferase)	MFI9345616.1	91
72	321	WP_043498591.1	Glicosiltransferasa	WP_324939792.1	94
73	422	WP_052413627.1	Glicosiltransferasa	WP_324939789.1	96
74	209	WP_043506289.1	Isomerasa de azúcar	WP_365768515.1	95

aas: aminoácidos; Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos.

5.3.1. Análisis de las NRPS del BGC 8

En el BGC 8 existen nueve genes de tipo NRPS. Seis de estos genes, *orf14*, *orf22*, *orf23*, *orf24*, *orf57* y *orf59* codifican para NRPS con al menos dos dominios, mientras que las tres restantes, *orf18*, *orf34* y *orf60*, codifican para NRPS con un único dominio. Además, la *orf27* codifica una proteína tipo MbtH que podría colaborar con las NRPS en la síntesis de la cadena peptídica. En el caso de la *orf18* el dominio que codifica es de tioestera (TE), mientras que las *orf34* y *orf60* es de adenilación (A) (Figura 39). Las NRPS codificadas por la *orf23* y la *orf59*, presentan la misma organización conteniendo los dominios PCP₁-Cy-A-PCP₂. El dominio de condensación es de tipo ciclación (Cy) lo que hace que el aminoácido añadido al dominio de tiolación (PCP) se cicle. Por otro lado, el resto de las NRPS tienen dominios específicos. Así, vemos que la NRPS codificada por



la *orf57* además del dominio Cy, PCP y A, posee un dominio accesorio de metilación (cMT) que realiza la metilación en la molécula unida al PCP y un dominio TE para liberar el compuesto. Lo que hace que la organización de los dominios de la NRPS codificada por la *orf57* sea Cy-A-PCP-cMT-TE. Similar a esta, encontramos la NRPS codificada por la *orf22*, que a excepción del dominio accesorio cMT, su organización es idéntica a la anterior, siendo sus dominios los siguiente Cy-A-PCP-TE. Además de la *orf22* y *orf58*, la NRPS codificada por la *orf14* también tiene un dominio TE mostrando la siguiente sucesión de dominios, C-A-PCP-TE, siendo también la única de las NRPS del BGC cuyo dominio de condensación es del tipo clásico, C. Finalmente, la NRPS codificada por la *orf24* posee dos dominios, uno de adenilación seguido de uno de tiolación (A-PCP) (Figura 39).

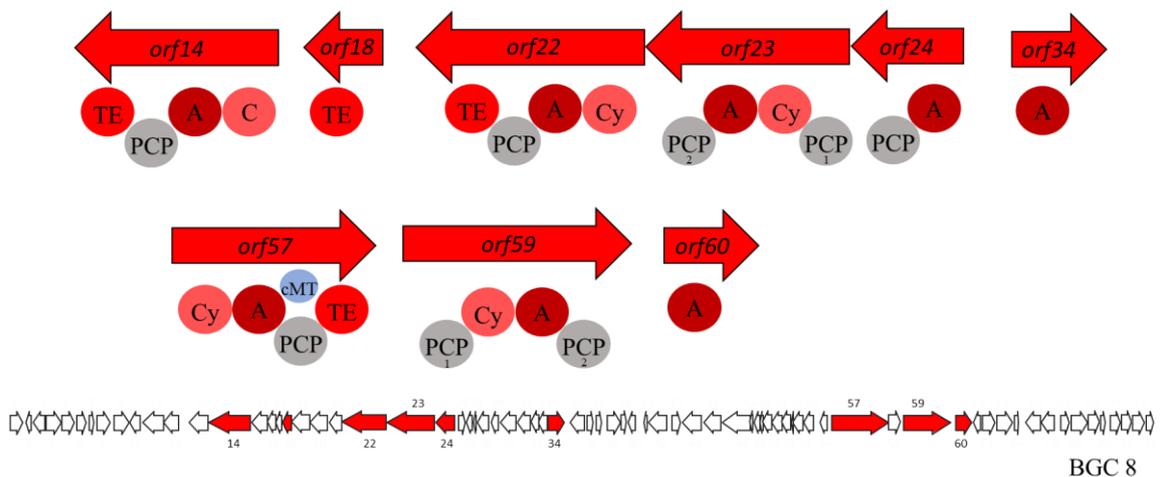


Figura 39. Esquema de los genes NRPS del BGC 8 de *Streptomyces glaucescens* GLA.O y su localización dentro del BGC. Se muestran los dominios codificados por cada una de las NRPS. **A:** dominio de adenilación; **C:** dominio de condensación; **Cy:** dominio de condensación tipo ciclación; **PCP:** dominio de tiolación; **cMT:** dominio metiltransferasa; **TE:** dominio tioesterasa.

Los dominios A son los encargados de activar y seleccionar de forma específica un aminoácido con o sin modificaciones, convirtiéndolo en un aminoacil adelinado, antes de que se una al dominio PCP, donde tendrá lugar la extensión de la cadena peptídica. Los dominios A contienen en su secuencia proteica diez motivos conservados que se encuentran involucrados en la estructura tridimensional responsable de la selección del aminoácido que reconoce (Khayatt *et al.*, 2013). A su vez, el aminoácido que es reconocido es determinado por unos residuos aminoacídicos que forman, en la estructura tridimensional del dominio A, el denominado *binding pocket*. El *binding pocket* consta



de diez residuos aminoacídicos que se conservan en mayor o menor medida para cada sustrato aminoacídico (Khayatt *et al.*, 2013, Stachelhaus *et al.*, 1999).

En el estudio de los dominios A de las ocho NRPS del BGC 8 se han logrado identificar en todas ellas estos diez motivos, observándose un alto grado de conservación en todas menos en las dos NRPS monomodulares que son codificadas por la *orf34* y la *orf60*, que presentan mayor discrepancia en los motivos 2, 4, 6 y 7 (Tabla 35). Es reseñable que en todas las NRPS, ya estuvieran constituidas por un solo dominio o por varios, el motivo 10 se encuentra antes en la secuencia que el motivo 9, mientras que todos los demás motivos siguen el orden lógico numérico.

Tabla 35. *Motivos conservados de los dominios A de las NRPS del BGC 8*

<i>orf</i>	<i>orf14</i>	<i>orf22</i>	<i>orf23</i>	<i>orf24</i>
Motivo 1	LTYEEL	LTYGQWL	LSGNLL	VDYAEL
Motivo 2	LKSGAAYLPVD	LLAGGVYVPVD	LAAGAAYVPIG	LKAGGAYLPD
Motivo 3	TAYVIYTSGSTGRPKG	LAYVMHTSGSTGVPKG	PAYVIFTSGSTGLPKG	LMYVIYTSGSTGVPKG
Motivo 4	FDFS	FDLS	FDLS	FDAW
Motivo 5	NMYGITE	SLGGATE	ALGGATE	NAYGPTE
Motivo 6	GEIYVAGDQVARGYL	GELYIAGTGLATGYL	GELWIGGTGVALGYR	GELFLAGSGVARGYL
Motivo 7	YRSGDL	YRTGDL	YRTGDL	YRSGDC
Motivo 8	GRADDQVKIRGHRIELGEIE	GRADQVKIRGHRIELGEIE	GRLDHQVKINGFRVELGEIE	GRVDNQVKVRGFRIELGEIE
Motivo 9	NGKLDLDR	NGKVDR	NGKVDR	NGKLDLDR
Motivo 10	LPSHMVP	LPSHMVP	LPDHMVP	LPEHMVP

<i>orf</i>	<i>orf34</i>	<i>orf57</i>	<i>orf59</i>	<i>orf60</i>
Motivo 1	VTYAEL	LDYAEL	VTHREL	LTYGRL
Motivo 2	GSAARELPVD	LLAGGAYLPVD	LAAGGTYVPVG	PLAEVAADPVD
Motivo 3	VALLLSGGTTGVPKL	LAYVIHTSGSTGTPKG	TAYVVFTSGSTGTPKG	VALFLLSGGTSPPKL
Motivo 4	FDDS	FDLS	FDLS	LDAA
Motivo 5	NVYGIGE	ALGGATE	GLGGATE	QVYGMAE
Motivo 6	GELLTRGPYTIRGYF	GELYIGGAGLALGYL	GELWIGGDGVALGYR	GELYTRGPYTIRGYF
Motivo 7	YRTGDL	YRTGDL	YRTGDL	YRTGDL
Motivo 8	GRLKDIHHHLGKVSAAEVE	GRADAQVKLNHRVEPAEVE	GRTDHQVKLNRYRVEPEVE	GRVNDVINRGGEKVPQAQVE
Motivo 9	VGKIDK	NGKVDR	NGKVDR	VGKMDK
Motivo 10	LASYKLP	LPAYMVP	LPSHMVP	IAPYKLP

Se resaltan en negrita los aminoácidos que no coinciden con la secuencia consenso de los motivos del dominio A.



Los *binding pocket* de cada dominio A han sido obtenidos comparando datos resultantes entre los programas AntiSMASH 7.1.0 y PKS/NRPS Analysis Web-site. Posteriormente, se han adjudicado a estos *binding pocket* un aminoácido según estudios comparativos con los *binding pocket* disponibles en bibliografía (Khayatt *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2005; Stachelhaus *et al.*, 1999) (Tabla 36).

Tabla 36. *Binding pocket* de los dominios A de las NRPS del BGC 8

<i>orf</i>	<i>orf14</i>	<i>orf22</i>	<i>orf23</i>	<i>orf24</i>
<i>Binding pocket</i>	DFWSVGMVHK	DLYNLSLIWK	DLWNLSLIWK	DAWVTTAVGK
aa cargado	Thr	Cys	Cys	Kyn

<i>orf</i>	<i>orf34</i>	<i>orf57</i>	<i>orf59</i>	<i>orf60</i>
<i>Binding pocket</i>	ALPTQGVITK	DLYNLSLIWK	DLWNLSLIWK	ALPSQGVLNK
aa cargado	Sal/Dhb	Cys	Cys	Sal

Se resaltan en negrita los aminoácidos que no coinciden con la secuencia consenso de los *binding pocket*. **aa:** aminoácido; **Kyn:** quinuurenina; **Sal:** salicilato; **Dhb:** 2,3-dihidroxibenzoato.

Los dominios C son los responsables de formar enlaces peptídicos entre intermediarios acil-S-PCP permitiendo el crecimiento de la cadena peptídica. Estos dominios presentan un motivo conservado con el que poder identificarlos, HHxxxDG (De Crécy-Lagard *et al.*, 1995). Por otro lado, el dominio Cy es un dominio C especial que permite la ciclación del aminoácido que se incorpora a la cadena mediante una ciclodeshidratación, actuando sobre el grupo tiol o hidroxilo del aminoácido. Al igual que el resto de los dominios de una NRPS, el dominio Cy tiene un motivo con el cual reconocerlo, DxxxxD (Bloudoff y Schmeing, 2017). Para el dominio C y los cuatro dominios Cy de las NRPS del BGC 8 se han encontrado en sus secuencias los motivos indicados, sin alteraciones en la secuencia consenso (Tabla 37).

El dominio cMT es un dominio accesorio responsable de la transferencia de un grupo metilo a uno de los carbonos de la cadena peptídica que se forma en el PCP. Los estudios *in silico* muestran la presencia de cuatro motivos que permiten la identificación de este dominio. Entre el motivo I y el motivo post-I habría unos veinte residuos



aminoacídicos de separación y la secuencia sería LExGxG(x20)YxxTD. Estos dos motivos son los más conservados. En cuanto a los motivos II y III se encuentran separados entre sí por 30 residuos aminoacídicos de diferencia y con respecto al motivo post-I. Las secuencias serían YDxxA(30x)LLRxxGxLVV (Ansari *et al.*, 2008). Estos cuatro motivos se han localizado en la secuencia del dominio cMT que es codificado por la *orf57*, sin alteraciones en el caso de los motivos I y post-I, pero con algunas variaciones en los motivos II y III (Tabla 37).

Los dominios PCP son los responsables del transporte del intermediario aminoacil-AMP, que reacciona con el grupo tiol de la fosfopanteteína ligada a un residuo de serina altamente conservado en el PCP. De esta forma se genera el intermediario aminoacil tioéster (Strieker *et al.*, 2010). Este residuo de serina forma parte del motivo que permite reconocer al PCP, GGxS (Lambalot *et al.*, 1996). Este motivo se ha identificado sin variaciones en seis de los ocho PCP del BGC 8. Solo en el caso del PCP1 codificado por la *orf23* y la *orf59*, las dos únicas NRPS con dos PCP, se han visto alteraciones sus secuencias, pero manteniéndose el residuo de serina indispensable para la unión al grupo fosfopanteteína del PCP (Tabla 37).

Finalmente, el dominio TE que se encarga de transferir del aminoacil-PCP al propio dominio TE y posteriormente liberar la cadena peptídica, debe presentar un motivo que contiene una triada catalítica que le permita realizar estas funciones. El motivo que contiene dicha triada catalítica es normalmente GxSxG...GxH, dando lugar a un enlace tioéster peptidil-O-Te, usando el residuo de serina de la triada. Sin embargo, en su lugar puede encontrarse el motivo GxCxG...GxH, cuya triada catalítica contiene un residuo de cisteína. Este motivo es menos frecuente pero igualmente válido ya que permite realizar un enlace peptidil-S-Te (Süssmuth y Mainz, 2017). En los dominio TE de las NRPS del BGC 8 encontramos ambos casos. Mientras que el TE codificado por la *orf22* es de tipo clásico GxSxG...GxH, los TE codificado por las *orf18*, *orf14* y *orf57* contienen el motivo GxCxG...GxH menos frecuente (Tabla 37).



Tabla 37. *Secuencias conservadas en los dominios C, Cy, cMT, PCP y TE del BGC 8*

Dominio C	
<i>orf14</i>	HHLVADG
Consenso	HHxxxDG

Dominio Cy	
<i>orf22</i>	DATFRD
<i>orf23</i>	DPGALD
<i>orf57</i>	DLICD
<i>orf59</i>	DAIVAD
Consenso	DxxxxD

Dominio de cMT	
<i>orf57</i> motivo I	LEIGAG
Consenso motivo I	LExGxG
<i>orf57</i> motivo post-I	YRFTD
Consenso motivo post-I	YxxTD
<i>orf57</i> motivo II	RDYRA
Consenso motivo II	YDxxA
<i>orf57</i> motivo III	ALRRLGELVA
Consenso motivo III	LLRxxGxLVV

Dominio TE	
<i>orf14</i>	GHCAG ... GLH
<i>orf18</i>	GHSMG ... GGH
<i>orf22</i>	GYCLG.....GDH
<i>orf57</i>	GYCMG.....GMH
Consenso	GxS/CxG.....GxH

PCP		
<i>orf14</i>	GGDS	
<i>orf22</i>	GGNS	
<i>orf23</i>	PCP ₁	GLQS
	PCP ₂	GGDS
<i>orf24</i>	GGHS	
<i>orf57</i>	GGDS	
<i>orf59</i>	PCP ₁	GLQS
	PCP ₂	GGDS
Consenso	GGxS	

C: dominio de condensación; *Cy*: dominio de condensación tipo ciclación; *PCP*: dominio de tiolación; *cMT*: dominio metiltransferasa; *TE*: dominio tioesterasa. Se resaltan en negrita los residuos conservados.

5.3.2. Análisis de homologías del BGC 8

El BGC 8 que detecta antiSMASH presenta un gran tamaño, 108.800 pb, y se compone por 74 genes. Como cualquier otro *software*, antiSMASH presenta limitaciones y de igual manera que no es capaz de detectar absolutamente todos los BGCs en todos los genomas, puede errar en la limitación de los mismos. De esta forma encontrar un BGC de tan gran tamaño, como es el BGC 8, en el que además encontramos múltiples hipotéticas unidades de transcripción o incluso bastantes NRPS que aparentemente no son secuenciales entre sí, como se muestra en el apartado anterior 5.3.1., sugiriéndose que los límites que antiSMASH predice para este BGC no son adecuados o incluso que podría tratarse de más de un BGC que se encuentran cercanos en el genoma.

Para poder predecir unos límites más realistas del BGC se ha realizado un estudio de homología basado en la premisa de la conservación de los BGC entre diferentes cepas. Para realizar este estudio fue necesario analizar las funciones de cada uno de los 74 genes del BGC 8 mediante BLASTP y determinar la especie de *Streptomyces* a la que pertenecía cada proteína homóloga resultante. Finalmente, se seleccionaron las especies coincidentes para la mayoría de las 74 proteínas. De esta forma se seleccionaron siete



cepas de *Streptomyces*. Sin embargo, solo los genomas de cuatro de estos *Streptomyces* fueron aptos para el análisis; *Streptomyces daqingensis* CGMCC 4.7178, *Streptomyces paludis* GSSD 12, *Streptomyces sp.* SM18 y *Streptomyces pratensis* S10 (Tabla 38). Las otras tres cepas, *Streptomyces pharetrae* CZA14, *Streptomyces halstedii* SID11342 y *Streptomyces sp.* WMMB 714, si bien muestran también homólogos para un gran número de estos 74 genes, (incluso en el caso de la cepa *S. pharetrae* se localizan 70 de los 74 genes), sus secuencias genómicas se encuentran tan fragmentadas que no permiten realizar este estudio (Anexo I, Tabla 42).

Este estudio mostró, la existencia de genes homólogos de la *orf11* a la *orf63* del BGC 8 entre las cepas de *Streptomyces*, aunque estos genes homólogos no están organizados de forma semejante. A pesar de ello, si se analizan los genes del BGC como bloques se pueden observar similitudes en los genomas de las cuatro cepas analizadas con la cepa *S. glaucescens*. De esta forma se identifican dos grupos principales de genes. Uno de ellos, el *cluster 1*, se corresponde con los genes *orf13* a *orf43*, que se encuentra presente en todas las cepas analizadas, aunque con algunas diferencias. El otro bloque de genes, el *cluster 2*, se observa en tres de las cepas (*S. daqingensis*, *S. paludis* y *Streptomyces sp.* SM18) y comprende desde la *orf45* hasta la *orf60*. Se identificaron también un tercer bloque de menor tamaño, comprendido solo por la *orf62* y la *orf63*, en todas las cepas con la excepción de *S. paludis* que solo presenta la *orf63*. Aunque en el BGC 8 estos dos genes se encuentran alejados de uno de los bloques principales (*cluster 1*) en el resto de las cepas, ambos genes están insertados en mitad de dicho grupo de genes. Finalmente, también se identifican genes homólogos para las *orf11*, *orf12* y *orf61* en dos de las cepas (*S. daqingensis* y *Streptomyces* SM18) (Figura 40).

Este análisis, pone de manifiesto que hay cinco *orfs* para las que no se encuentran homólogos en ninguna de las cepas identificadas, aunque forman parte del *cluster 1*. Estos serían la *orf28* que codifica para una proteína hipotética, la *orf40* para un regulador tipo TetR, la *orf44* para un ácido graso AMP-ligasa y las *orf14* y *orf57* que codifican para NRPS (Figura 40). También se observa que las únicas *orfs* que están presentes en todas las cepas son las *orfs* correspondientes a genes de NRPS (*orf18*, *orf22*, *orf23*, *orf24* y *orf34*) y *orfs* que codifican para otros genes de biosíntesis *orf13* (asparagina sintasa); *orf21* (oxidoreductasa); *orf31* (aminotransferasa); *orf32* (oxidoreductasa); *orf33* (hidroxilasa) y *orf63* (flavin monooxigenasa) (Figura 40).



Tabla 38. Comparación de los productos génicos del BGC 8 de *S. glaucescens* con otras cepas de *Streptomyces*

<i>S. glaucescens</i>		<i>Streptomyces</i> sp. SM18		<i>Streptomyces daqingensis</i>		<i>Streptomyces paludis</i>		<i>Streptomyces pratensis</i>	
orf*	Número aa	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %
11	658	WP_103489126.1	71	WP_189035320.1	62	-	-	-	-
12	452	WP_103490343.1	56	WP_189035319.1	63	-	-	-	-
13	614	WP_103493798.1	88	WP_189036048.1	85	WP_114659276.1	83	WP_203182949.1	90
14	1321	-	-	-	-	-	-	-	-
15	498	-	-	WP_189036047.1	76	-	-	-	-
16	256	-	-	WP_229711649.1	70	-	-	-	-
17	191	-	-	WP_229711648.1	78	-	-	-	-
18	267	WP_181012466.1	82	WP_189036046.1	79	WP_181957438.1	73	WP_238441889.1	81
19	571	-	-	-	-	-	-	WP_203182948.1	85
20	586	WP_219818819.1	86	WP_189036044.1	86	-	-	WP_238441888.1	85
21	361	WP_103493801.1	80	WP_189036043.1	79	WP_114659281.1	75	WP_203182947.1	81
22	1414	WP_103493802.1	76	WP_189036042.1	72	WP_228447064.1	75	WP_203182946.1	78
23	1537	WP_103493803.1	78	WP_189036041.1	75	WP_114659283.1	71	WP_203182945.1	78
24	603	WP_258038078.1	79	WP_189036040.1	76	WP_162793735.1	77	WP_238441887.1	81
25	235	WP_164343045.1	80	WP_308424119.1	72	-	-	WP_203182944.1	80
26	162	-	-	WP_189036039.1	90	WP_162793737.1	71	WP_203182943.1	90
27	75	-	-	WP_308424118.1	70	WP_114659294.1	71	WP_203182942.1	68
28	335	-	-	-	-	-	-	-	-
29	201	-	-	-	-	WP_162793731.1	67	WP_203182950.1	68
30	522	WP_103493816.1	83	WP_189036038.1	85	-	-	WP_203182932.1	85
31	415	WP_258038079.1	85	WP_189036037.1	87	WP_114659288.1	81	WP_203182933.1	86
32	248	WP_103493814.1	83	WP_189036036.1	78	WP_114659287.1	80	WP_203182934.1	81
33	255	WP_181012469.1	68	WP_189036035.1	67	WP_162793733.1	63	WP_203182935.1	70
34	536	WP_103493812.1	84	WP_189036034.1	84	WP_114659286.1	8	WP_203182936.1	85
35	450	-	-	WP_189036031.1	81	-	-	-	-
36	219	-	-	WP_229711647.1	80	-	-	-	-
37	181	WP_219818820.1	71	WP_229711646.1	74	WP_114659290.1	70	-	-
38	439	WP_103493818.1	79	WP_189036029.1	74	-	-	WP_203182930.1	79
39	177	-	-	WP_189036028.1	80	-	-	-	-
40	230	-	-	-	-	-	-	-	-
41	100	-	-	WP_189035312.1	57	-	-	-	-
42	599	-	-	WP_189035311.1	82	-	-	-	-
43	303	WP_103488514.1	57	WP_189035310.1	69	WP_162793739.1	72	-	-
44	576	-	-	-	-	-	-	-	-
45	546	WP_103490075.1	74	WP_189035309.1	73	-	-	-	-
46	906	WP_103504946.1	82	WP_189035308.1	79	-	-	-	-
47	92	-	-	WP_189035307.1	74	-	-	-	-
48	188	WP_146060092.1	72	WP_189035306.1	68	WP_162793754.1	69	-	-
49	88	-	-	WP_189035305.1	79	WP_162793756.1	70	-	-
50	288	WP_164344151.1	69	WP_189035304.1	73	WP_114659309.1	59	-	-
51	334	WP_103490081.1	82	WP_268241309.1	79	WP_114659310.1	75	-	-
52	275	WP_103490082.1	82	WP_189035302.1	78	WP_114659311.1	80	-	-
53	81	-	-	-	-	WP_114659312.1	78	-	-
54	292	-	-	WP_189035301.1	89	WP_114659313.1	86	-	-
55	326	-	-	WP_189035300.1	67	WP_114659314.1	72	-	-
56	201	-	-	WP_189035299.1	73	-	-	WP_203182950.1	68
57	1827	-	-	-	-	-	-	-	-
58	380	WP_103504949.1	67	-	-	-	-	-	-
59	1496	WP_103493803.1	56	WP_189035315.1	58	-	-	WP_203182945.1	55
60	532	-	-	WP_189035314.1	77	-	-	-	-
61	221	WP_103489125.1	72	WP_189035318.1	56	-	-	-	-
62	403	WP_103493807.1	84	WP_189036032.1	83	WP_114659291.1	81	WP_203182941.1	83
63	522	WP_103493808.1	82	WP_189036033.1	79	WP_114659315.1	81	WP_203182940.1	78

Los productos codificados por las orfs 1 a 10 y 64 a 74 no presentan homólogos en las cepas analizadas.
 aa: aminoácido; Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos; *: funciones génicas en la tabla 34.

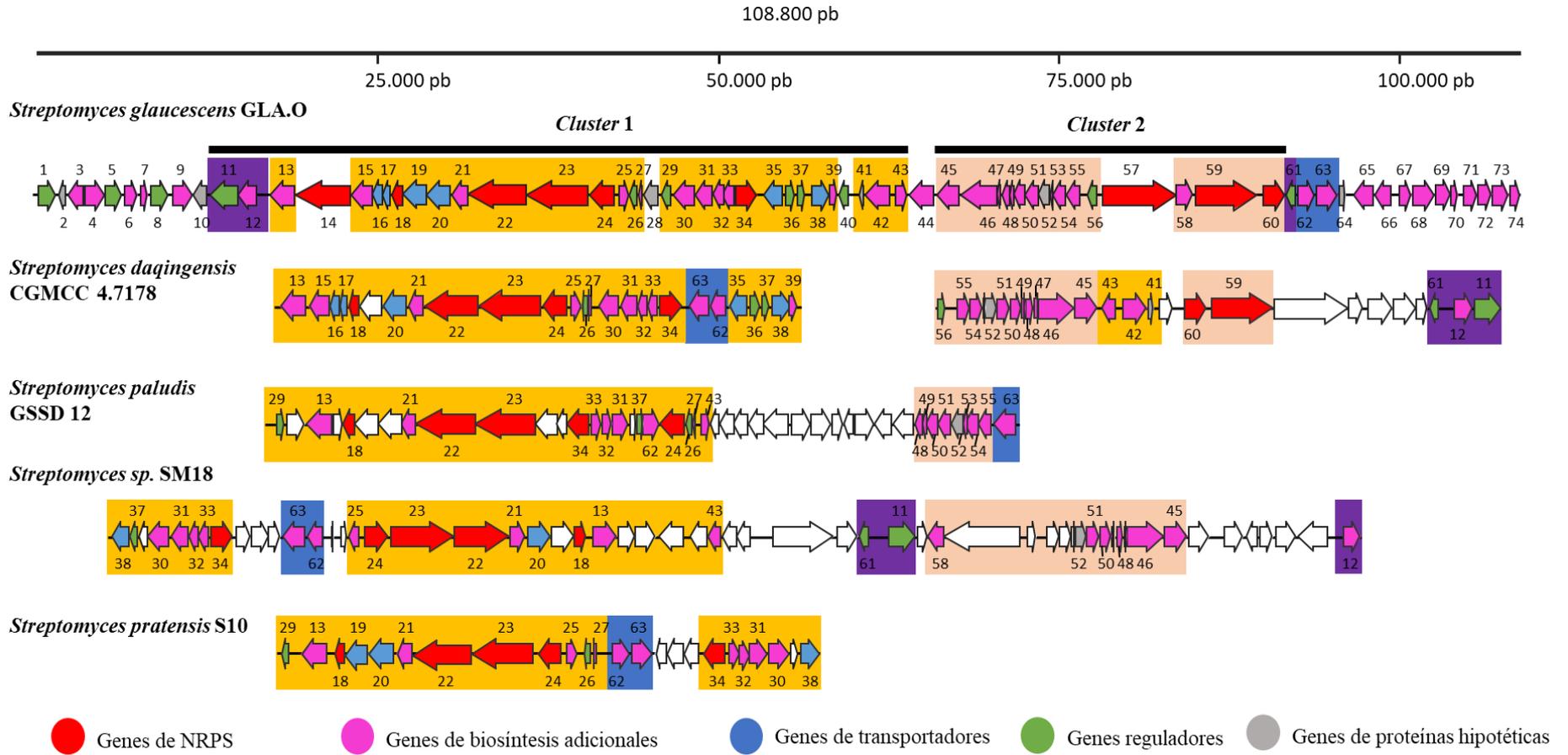


Figura 40. Comparación del BGC 8 de *S. glaucescens* con otras cepas de *Streptomyces*. Se muestran en diferentes colores las agrupaciones de genes homólogos que comparten entre las cepas comparadas: *cluster 1* (naranja); *cluster 2* (rosa claro). Las flechas en blanco representan genes no homólogos. Representación a escala.





5.4. Cepas mutantes en el BGC 8 de *Streptomyces glaucescens* GLA.O

5.4.1. Mutante en genes estructurales

5.4.1.1. Generación del mutante $\Delta orf12g$

El gen *orf12* de *S. glaucescens* codifica una proteínas similar a la Salicilato Sintasa SsfH. Este gen sería esencial en la biosíntesis de un compuesto que contuvieran salicilato en su estructura, y debido a que esta molécula es considerada una molécula iniciadora en la biosíntesis de compuestos (Mishra y Baek, 2021), la pérdida de la funcionalidad de la *orf12* resultaría en la ausencia de la producción del compuesto final codificado por del BGC 8. Por ello se seleccionó la *orf12* como primera diana para generar un mutante al que se denominó $\Delta orf12g$.

Para eliminar la *orf12* se construyó el plásmido pHZ- $\Delta orf12$ (Figura 16), que permite el reemplazamiento génico de la *orf12* por la gen *aac(3)IV* que confiere resistencia a apramicina. El plásmido pHZ- $\Delta orf12$ se introdujo en la cepa *S. glaucescens* mediante conjugación intergenérica, las colonias transconjugantes con el reemplazamiento génico se seleccionaron por su resistencia a apramicina y sensibilidad a tioestreptona (Figura 41A). El reemplazamiento de la *orf12* se comprobó por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos F_Full_ssfH_glau y R_Full_ssfH_glau, que hibridan con los extremos de la *orf12*. Estos oligonucleótidos permiten la amplificación tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante $\Delta orf12g$, pero en la cepa silvestre amplificarían la *orf12* dando una banda de 1,6 Kb, mientras que en $\Delta orf12g$ amplificarían los extremos de la *orf12* y el *cassette aac(3)IV* dando una banda de 2,2 Kb (Figura 41B). Los fragmentos de PCR obtenidos se confirmaron por secuenciación, y a la cepa mutante confirmada se la denominó $\Delta orf12g$ (Figura 41B).

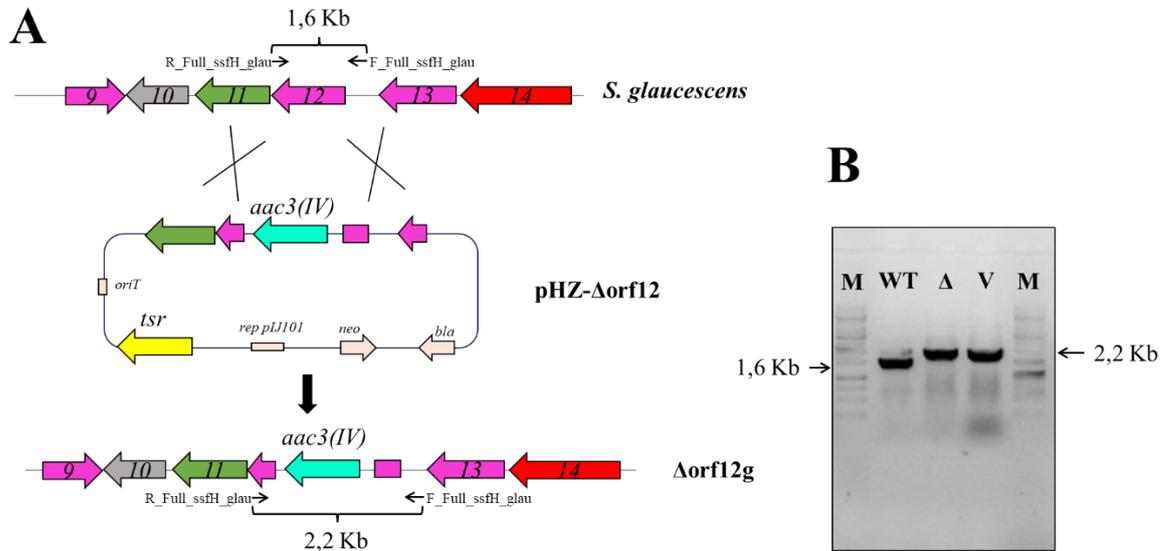


Figura 41. Generación del mutante Δ orf12g. **A:** Esquema de reemplazamiento génico utilizando el plásmido pHZ- Δ orf12. **B:** Comprobación por PCR del mutante Δ orf12g, utilizando los oligonucleótidos F_Full_ssfH_glau y R_Full_ssfH_glau. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa Δ orf12g; **V:** plásmido pHZ- Δ orf12. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.

5.4.1.1.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf12g

Se cultivaron la cepa silvestre y la cepa Δ orf12g en diferentes medios de cultivo líquidos para estudiar sus perfiles metabólicos y localizar compuestos diferenciales que se no se produjeran en la cepa Δ orf12g y sí en la silvestre. Se ensayaron un total de veintidós medios de cultivo diferentes (R5A, MMI, MMs, TSB, MS, SV2, SM1, SM3, SM4, SM5, SM7, SM8, SM9, SM10, SM12, SM19, SM20, SM24, SM25, SM30, SM31). Además, puesto que el estudio de los dominios A de las NRPS del BGC, sugerían la presencia de *binding pocket* específicos para cisteínas, y dado que estos aminoácidos son típicos de la biosíntesis de sideróforos (Ho *et al.*, 2018), se añadió en cinco de estos medios (R5A, SM3, SM4, SM5, SM7) el quelante de hierro 2,2-bipiridilo (Nakouti *et al.*, 2012). De todos estos cultivos se tomaron muestras a los días 3, 5 y 7, que fueron procesadas de forma independiente con tres solventes orgánicos diferentes (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol). Los extractos resultantes de este tratamiento se analizaron cromatográficamente en UPLC. Los perfiles cromatográficos obtenidos para cada condición se comprobaron entre las dos cepas



estudiadas, sin observarse cambios significativos en la producción de compuestos relacionados con el salicilato, en la mayoría de los análisis entre la cepa silvestre y el mutante $\Delta orf12g$. Sin embargo, en los cultivos en SM10 y SM20 extraídos con acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico o con butanol a lo largo de 5 a 7 días de cultivo, se detecta la producción de salicilato en la cepa silvestre y la ausencia de este compuesto en la cepa $\Delta orf12g$ (Figura 42A y 42B). Esto se dedujo al comparar el espectro de absorción y el tiempo de retención de los picos de mutante $\Delta orf12g$, con el tiempo de retención y el espectro del compuesto (Figura 42C). Ningún otro compuesto relacionado es detectado como diferencial (Figura 42). Estos resultados confirman que la *orf12* codifica una Salicilato Sintasa, así como que este gen se está expresando en los medios SM10 y SM20.

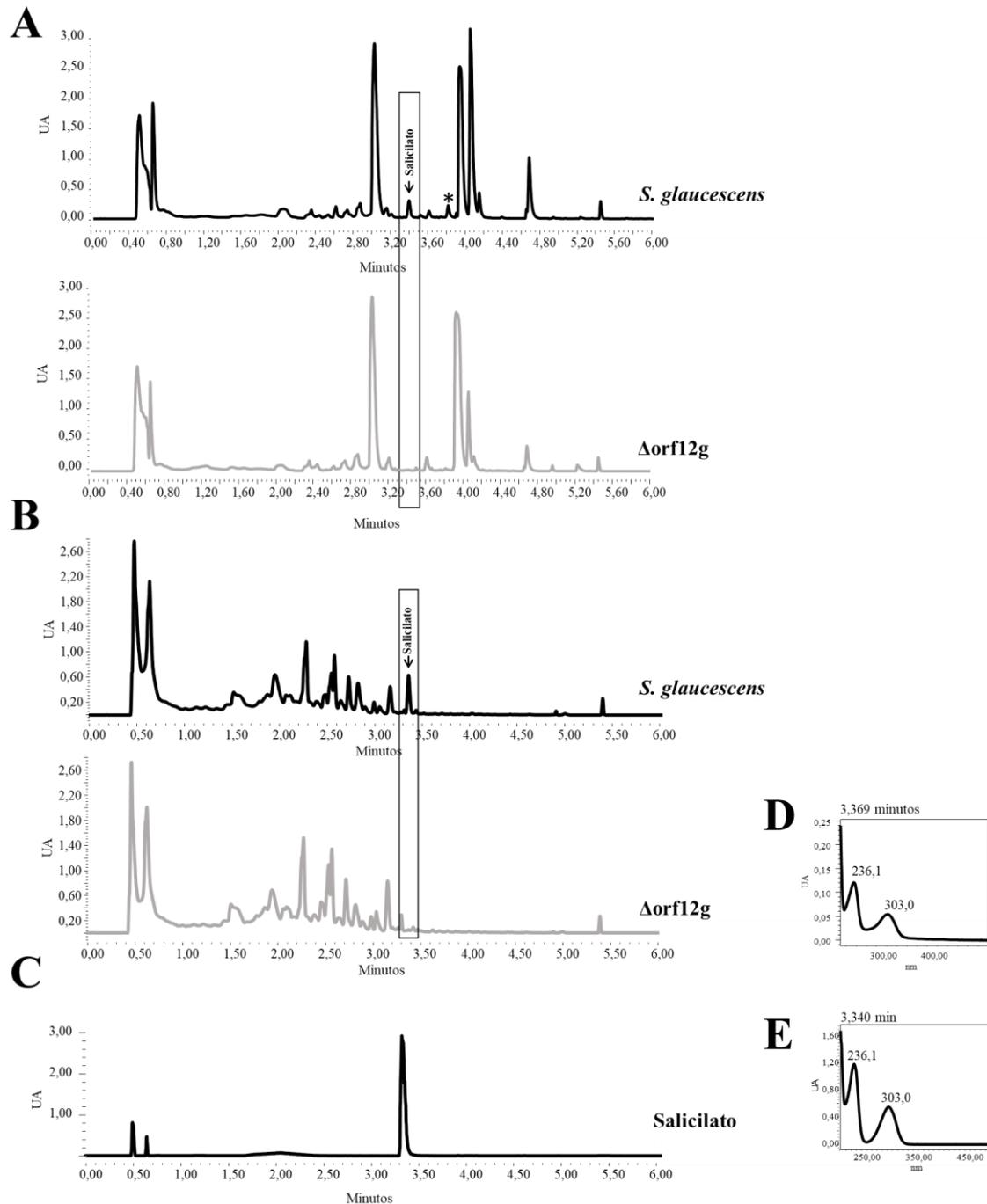


Figura 42. Comparación de perfiles metabólicos de *s. glaucescens* y del mutante Δ orf12g. **A:** Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico de *S. glaucescens* y Δ orf12g cultivados durante 5 días en SM10. **B:** Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de butanol de cultivos de 7 días, de *S. glaucescens* y Δ orf12g cultivados en SM20. **C:** salicilato puro en metanol (100 mg/mL). **D:** Espectro UV del pico identificado como salicilato en el cultivo de SM10 de la cepa silvetre. **E:** Espectro UV del salicilato, *: Pico correspondiente al compuesto tetracenomicina C.



5.4.1.2. Generación del mutante $\Delta orf14g$

La *orf14* codifica para una NRPS con todos los dominios para ser funcional por sí misma. Por ello esta *orf* fue seleccionada para mutarla por reemplazamiento génico con el *cassette aac(3)IV* del gen de resistencia a apramicina y comparar los perfiles metabólicos del mutante y de la cepa silvestre, en busca de compuestos diferenciales.

Para ello se utilizó el plásmido pHZ- $\Delta orf14g$ (Figura 19). Se introdujo este plásmido en la cepa silvestre mediante conjugación intergenérica y los mutantes se seleccionaron por su resistencia a apramicina y su sensibilidad a tioestreptona (Figura 43A). Dichos mutantes se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos F_comp_ $\Delta 4355$ _XbaI y R_comp_ $\Delta 4355$ _NotI, usando ADN genómico extraído de la cepa silvestre y de los transconjugantes. En la cepa mutante denominada $\Delta orf14$ se obtuvo un amplicón de 1,9 Kb, correspondiente al *cassette aac(3)IV* y los extremos 3' y 5' de la *orf14*, mientras que en la cepa silvestre se amplificó un fragmento de 4,1 Kb, correspondiente al tamaño de la *orf14* (Figura 43B), ya que los oligonucleótidos anillan fuera de la zona reemplazada. Los fragmentos de PCR se comprobaron por secuenciación.

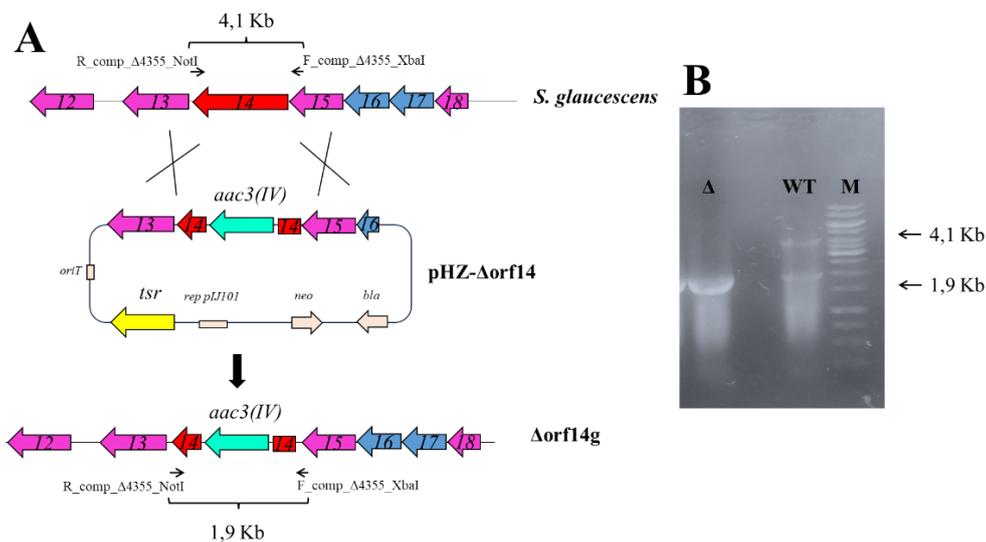


Figura 43. Generación del mutante $\Delta orf14g$. **A:** Esquema de reemplazamiento génico utilizando el plásmido pHZ- $\Delta orf14g$. **B:** Comprobación por PCR del mutante $\Delta orf14g$, utilizando los oligonucleótidos F_comp_ $\Delta 4355$ _XbaI y R_comp_ $\Delta 4355$ _NotI. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa $\Delta orf14g$. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



5.4.1.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante $\Delta orf14g$

La cepa silvestre y la cepa mutante $\Delta orf14g$ se cultivaron para comparar sus perfiles metabólicos por UPLC. Se ensayaron un total de ocho medios de cultivo líquidos (R5A, MM9, SM1, SM3, SM4, SM5, SM7 y SM10). Además, cuatro de estos medios (SM3, SM4, SM5 y SM7) también se utilizaron para cultivar las cepas en ausencia de hierro, utilizando el quelante de hierro 2,2-bipiridilo (Nakouti *et al.*, 2012). De cada uno de estos cultivos se tomó 1 mL de muestra en los días 3, 5 y 7. Estas muestras se extrajeron con tres solventes orgánicos diferentes y por separado (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol). Los extractos resultantes fueron analizados por UPLC. No se observaron diferencias significativas entre los cromatogramas de ambas cepas, en ninguno de los medios de cultivo. La adición del quelante 2,2-bipiridilo tampoco indujo la producción de ningún compuesto diferencial entre ambas cepas, en ningún medio ensayado como se ejemplifica en la Figura 44.

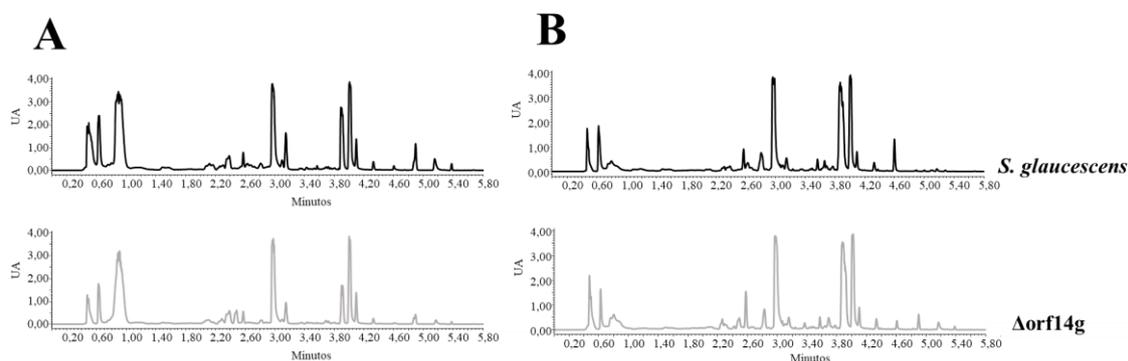


Figura 44. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y del mutante $\Delta orf14g$. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico de *S. glaucescens* y $\Delta orf14g$ cultivados durante 7 días en SM7. **A:** en presencia de 2,2-bipiridilo. **B:** en ausencia de 2,2-bipiridilo.

5.4.1.3. Generación del mutante $\Delta orf23-24g$

Se generó una cepa mutante reemplazando las *orf23* y *orf24*, que codifican NRPS, por el *cassette aac(3)IV* del gen de resistencia a apramicina. Se esperaba que en este mutante la biosíntesis del compuesto codificado por el BGC 8 se viera interrumpida, por lo que se identificaría la ausencia de un compuesto en el perfil metabólico de esta cepa al compararlo con el de la cepa silvestre.



Para obtener este mutante, que se denominó $\Delta orf23-24g$, se construyó el plásmido pHZ- $\Delta orf23-24$ (Figura 20). Con este plásmido se realizó la conjugación intergenérica de la cepa silvestre permitiendo el reemplazamiento de las *orf23* y *orf24* por el *cassette aac(3)IV*. Los mutantes obtenidos se seleccionaron por resistencia a apramicina y sensibilidad a tioestreptona (Figura 45A). Los mutantes se comprobaron por PCR a partir de ADN genómico extraído de los mismos y de la cepa silvestre como control. Se utilizaron los oligonucleótidos R_NRPS4400EcoRI y F_NRPS4400BamHI para realizar la PCR de comprobación. Estos oligonucleótidos hibridan en el extremo 3' de la *orf23* y en el extremo 5' de la *orf24*. Se obtuvo una banda de 6,7 Kb a partir de la cepa silvestre correspondiente a los genes de NRPS y una banda de 1,8 Kb a partir de la cepa $\Delta orf23-24g$ correspondiente al *cassette aac(3)IV* y uno de los extremos de cada *orf* sustituida (Figura 45B). Los fragmentos obtenidos por PCR se comprobaron por secuenciación.

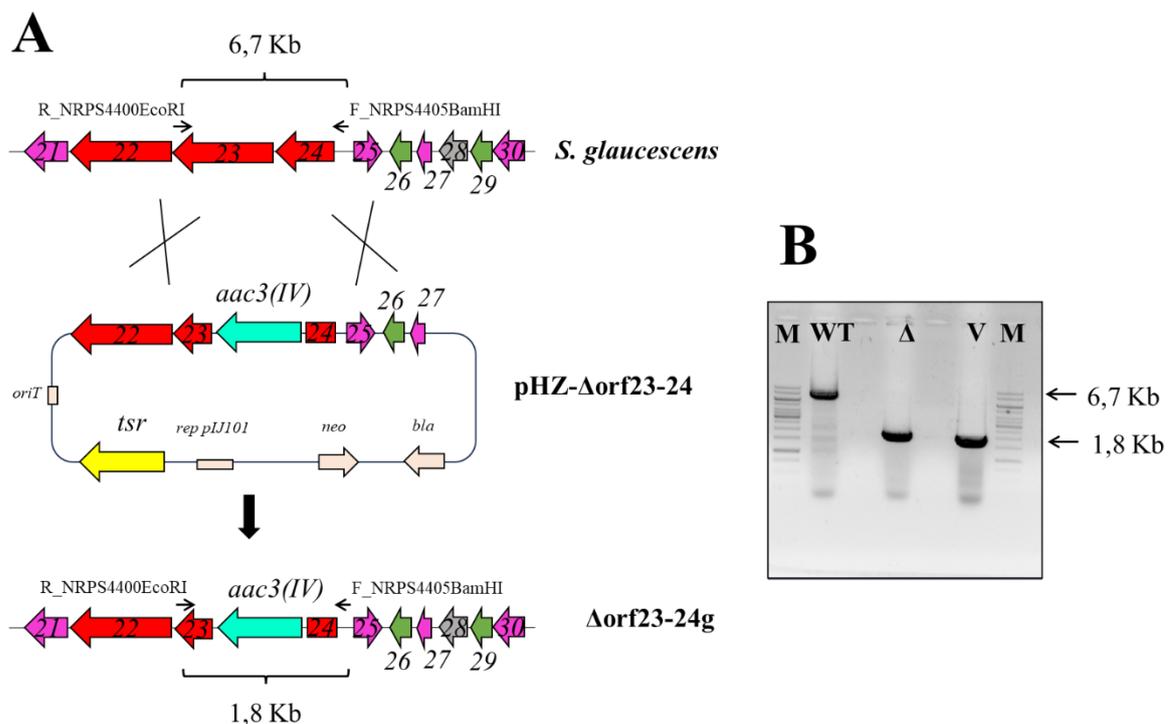


Figura 45. Generación del mutante $\Delta orf23-24g$. **A:** Esquema de reemplazamiento génico utilizando el plásmido pHZ- $\Delta orf23-24$. **B:** Comprobación por PCR del mutante $\Delta orf23-24g$, utilizando los oligonucleótidos F_NRPS4405BamHI y R_NRPS4400EcoRI. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa $\Delta orf23-24g$; **V:** plásmido pHZ- $\Delta orf23-24$. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.



5.4.1.3.1. Cultivos líquidos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf23-24g

Se cultivaron las cepas silvestre y el mutante Δ orf23-24g en diez medios de cultivo líquidos distintos (R5A, MM9, MMI sin hierro, MMs sin hierro, SM1, SM3, SM4, SM5, SM7 y SM10). De estos diez medios se seleccionaron seis para cultivar las cepas en ausencia de hierro, utilizando el quelante de hierro 2,2-bipiridilo (Nakouti *et al.*, 2012). Estos medios fueron R5A, SM1, SM3, SM4, SM5 y SM7. Se tomaron muestras de 1 mL a los días 3, 5 y 7 de estos cultivos. Estas muestras se extrajeron con tres solventes orgánicos diferentes y por separado (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol). En el caso de los medios mínimos MMs y MMI, ambos sin hierro, también se utilizó el etanol como solvente orgánico de extracción. Los extractos resultantes se analizaron por UPLC. No se observaron diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante Δ orf23-24g en ninguna de las condiciones ensayadas, como se ejemplifica en la Figura 46.

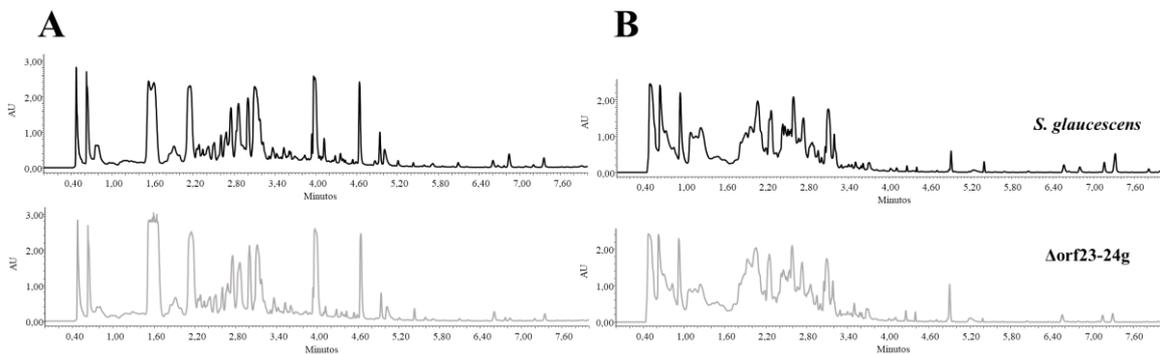


Figura 46. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y del mutante Δ orf23-24g. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de butanol de *S. glaucescens* y Δ orf23-24g cultivados durante 7 días en SM5. **A:** en ausencia de 2,2-bipiridilo. **B:** en presencia de 2,2-bipiridilo.

5.4.1.3.2. Cultivos sólidos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf23-24g

Se realizaron ensayos con cultivos sólidos en los medios mínimos MMs y MMI así como en el medio R5A. Las cepas cultivadas fueron Δ orf23-24g y la cepa silvestre. Se tomaron muestras a día 6 y mientras que las muestras procedentes de los medios mínimos fueron extraídas con etanol las muestras del medio R5A se extrajeron con cuatro solventes (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol).



Los extractos resultantes se analizaron por cromatografía en UPLC para comparar los perfiles cromatográficos de ambas cepas. Los medios mínimos no mostraron producción diferencial de compuestos entre las cepas, sin embargo, en el extracto de butanol del cultivo en medio R5A se observaron un conjunto de picos diferenciales entre los minutos 5 y 7 que se producen en la cepa silvestre y no en el mutante $\Delta orf23-24g$. Estos picos diferenciales mostraban, en las condiciones ensayadas, una producción extremadamente baja, encontrando valores por debajo de 0,1 unidades arbitraria (UA) en sus espectros de absorción. Por lo tanto, para el correcto análisis de dichos picos fue necesario concentrar las muestras realizando una semi-purificación de los cultivos de ambas cepas como se indica en el apartado de Materiales y Métodos 13.2. Esto permitió obtener la fracción deseada de estudio y a una concentración mayor para su análisis por desreplicación (Figura 47).

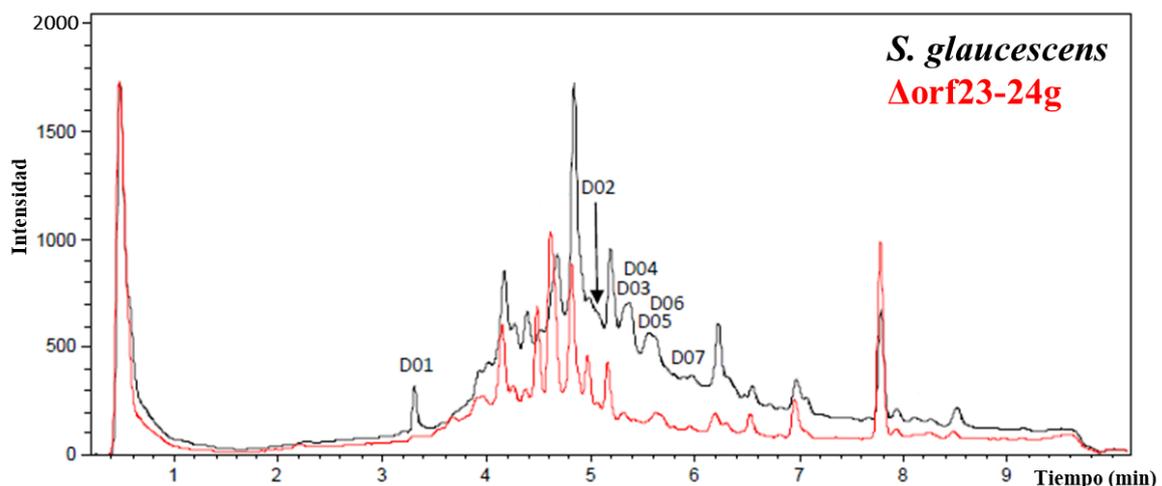


Figura 47. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y del mutante $\Delta orf23-24g$. Cromatogramas de HPLC Agilent 1200 (Maxplot) realizado por la Fundación MEDINA. Los picos diferenciales producidos por la cepa silvestre se indican como D01-D07.

Los extractos de butanol semi-purificados de los cultivos en R5A sólidos, de la cepa silvestre y el mutante $\Delta orf23-24g$, se enviaron a la Fundación Medina donde se sometieron a un análisis comparativo de los perfiles metabólicos y de desreplicación de los compuestos resultantes de este análisis. Los resultados mostraron la presencia de un total de veintitrés picos. De estos, trece eran comunes entre ambas cepas. Tres eran solo producidos por el mutante $\Delta orf23-24g$ y los siete restantes nombrados como D01 a D07 eran producidos solo por la cepa silvestre (Figura 47). De estos siete picos el D01 se



identificó como tetracenomicina C, producido por la cepa silvestre, pero que en cultivos previos se observa que también es producido por la cepa $\Delta orf23-24g$ revelándose como no diferencial. El resto de los picos de D02 a D07 se identificaron como compuestos desconocidos por sus masas y espectros de absorción (Figura 48 y Tabla 39).

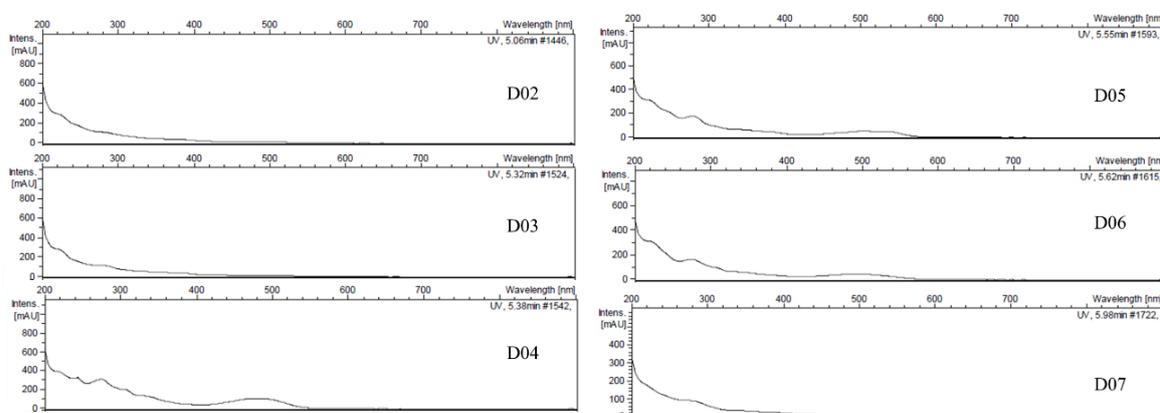


Figura 48. Espectros de absorción de los compuestos diferenciales de D02 a D07 producidos por la cepa silvestre de *S. glaucescens* y no por el mutante $\Delta orf23-24g$.

Tabla 39. Características de los compuestos diferenciales detectados

Compuesto	Fórmula molecular	<i>m/z</i>	Máximos UV (nm)
D02	$C_{21}H_{44}NO_7P$	454,2930	225, 290
D03	$C_{21}H_{44}N_2O_2$	369,3477	230, 290
D04	$C_{16}H_{35}N$	242,2844	225, 280, 360, 520
D05	$C_{16}H_{32}O$	258,2792	225, 280, 360, 520
D06	$C_{17}H_{37}N$	256,3030	225, 280, 360, 520
D07	$C_{22}H_{47}NO_4$	358,3682	280

El mutante $\Delta orf23-24g$ carece de dos genes que codifican NRPS que podrían funcionar conjuntamente con la NRPS de la *orf22*. Estas tres NRPS presentan dominios de adenilación para los aminoácidos quinurenina y dos cisteínas, como se ha visto en el apartado de Resultados 5.3.1. Por tanto las fórmulas moleculares de los compuestos que sintetizarían deberían contener al menos tres nitrógeno y dos azufres. Ninguno de los compuestos diferenciales (D02-D07) identificados poseen fórmulas moleculares con dicha característica, por lo que estos compuestos no parecen estar codificados por el BGC 8.



5.4.2. Cepas con expresión constitutiva

5.4.2.1. Generación de la cepa Eorf24g

La *orf24* se corresponde con un gen que codifica una NRPS que posiblemente forme una unidad de transcripción junto a las *orf22* y *orf23*, también genes que codifican NRPS. Esta unidad de transcripción posiblemente incluya varios genes situados aguas abajo de los mencionados, ya que todos ellos se transcriben en la misma dirección y en algunos casos se solapan sus regiones codificadoras. Por ello, se decidió insertar un promotor constitutivo fuerte delante de la *orf24* en un intento de activar o aumentar la expresión de este grupo de genes. Con este fin se generó la cepa Eorf24g, introduciendo por conjugación de la cepa silvestre, el plásmido pOJ260*p_Eorf24 (Figura 26). Este plásmido permite la inserción del promotor *ermE**p aguas arriba de la *orf24* por recombinación homóloga. Las colonias transconjugantes obtenidas se seleccionaron por resistencia a apramicina (Figura 49A).

Para la comprobación de este transconjugante se realizó una PCR sobre los genomas de las cepas transconjugantes y de la cepa silvestre como control. Se utilizaron los oligonucleótidos *ermE*_up y *ermE*_compro_24, que anillan al principio del promotor *ermE**p y aguas abajo de la *orf24* respectivamente, por lo que la amplificación solo podrá darse en la cepa que contenga el plásmido pOJ260*p_Eorf24 integrado. Se obtuvo una banda de 3,5 Kb, que se corresponde con el tamaño esperado, y que se comprobó posteriormente por secuenciación (Figura 49B).

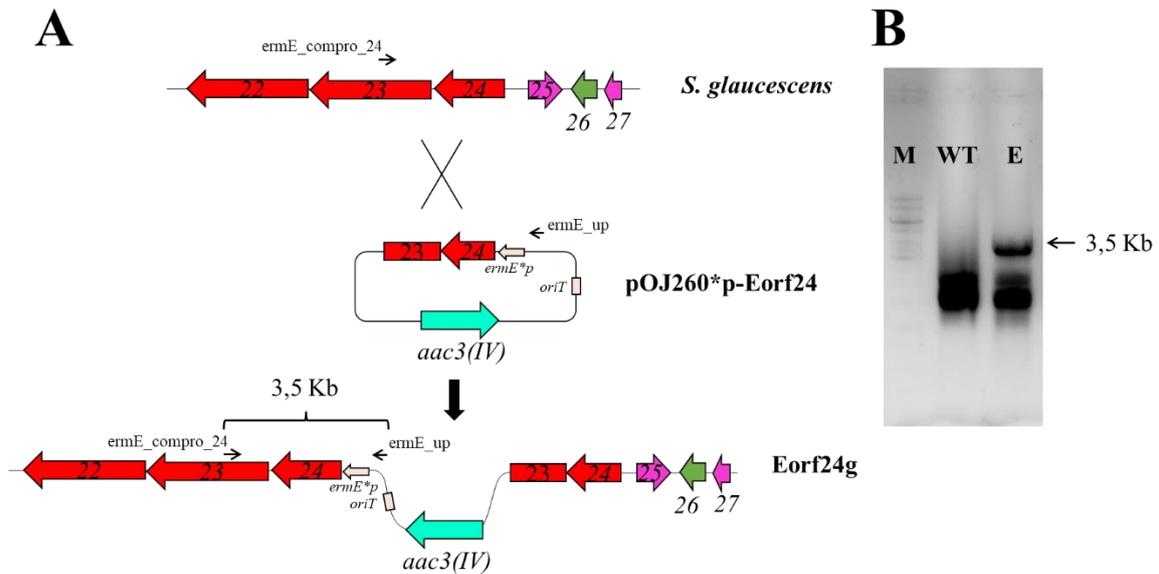


Figura 49. Generación de la cepa Eorf24g. **A:** Esquema de recombinación homóloga simple entre el plásmido pOJ260*p-Eorf24 y la cepa silvestre. **B:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos ermE_up y ermE_compro_24. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **E:** cepa Eorf24g. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *ermE*p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.2.1.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa Eorf24g

La cepa silvestre y la cepa Eorf24g se cultivaron en los medios de cultivo líquidos SM10 y R5A. Se tomaron muestras a los días 5 y 7 que se extrajeron con los solventes orgánicos acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol o etanol. Los extractos resultantes se analizaron por UPLC sin detectarse la producción de nuevos compuestos por parte de la cepa Eorf24g respecto a la cepa silvestre, como se ejemplifica con el medio R5A (Figura 50).

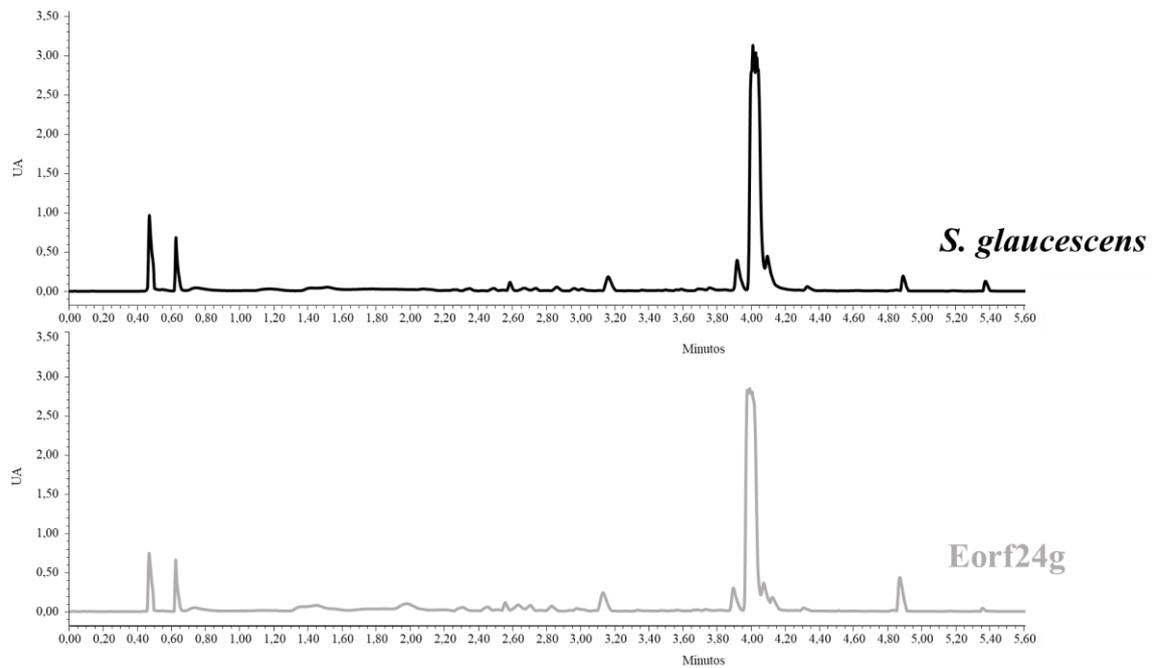


Figura 50. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y Eorf24g. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de acetato de etilo de *S. glaucescens* y Eorf24g cultivados durante 7 días en R5A.

5.4.2.2. Generación de la cepa Eorf33g

La cepa Eorf33g contiene el promotor *ermE***p* insertado aguas arriba de la *orf33*. Para generar dicha cepa se introdujo por conjugación de la cepa silvestre de *S. glaucescens* el plásmido pOJ260*p_Eorf33 (Figura 27). Las colonias transconjugantes obtenidas se seleccionaron por resistencia a apramicina (Figura 51A).

Para comprobar dichos transconjugantes, se realizó una PCR sobre los genomas de las cepas transconjugantes y de la cepa silvestre. Se utilizaron los oligonucleótidos *ermE*_up y *ermE*_compro_33, que anillan al principio del promotor *ermE***p* y aguas abajo de la *orf33* respectivamente. De esta forma la amplificación solo sería efectiva en los transconjugantes que tuvieran integrado el promotor *ermE***p* aguas arriba de la *orf33*. El fragmento amplificado poseía el tamaño esperado de 3,5 Kb. Dicho fragmento se comprobó posteriormente por secuenciación (Figura 51B).

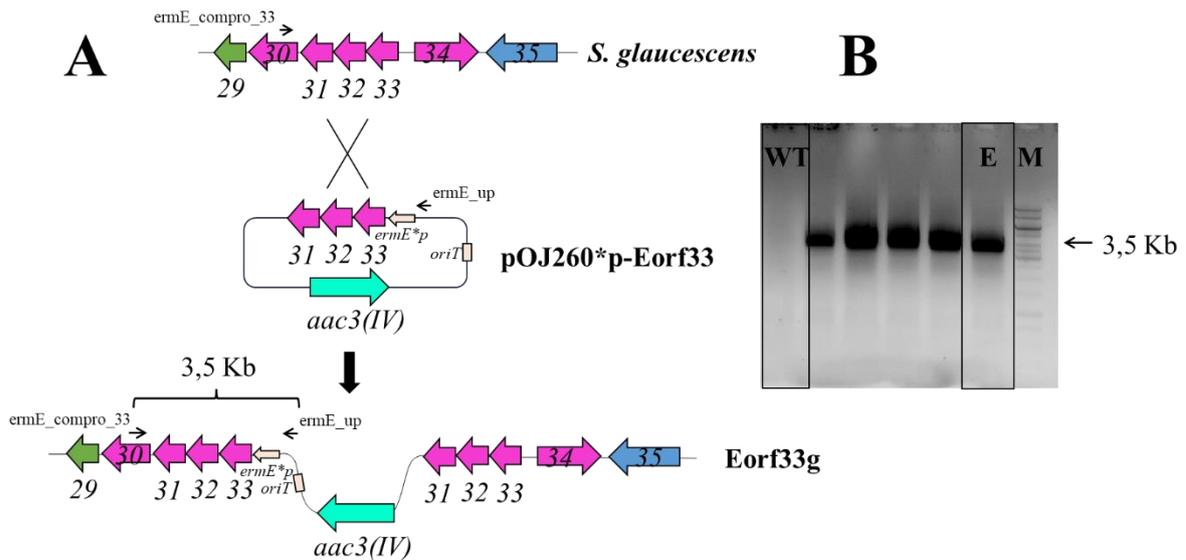


Figura 51. Generación de la cepa Eorf33g. **A:** Esquema de recombinación homóloga simple entre el plásmido pOJ260*p-Eorf33 y la cepa silvestre. **B:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos ermE_up y ermE_compro_33. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **E:** cepa Eorf33g. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *ermE**p**: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.2.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa Eorf33g

La cepa silvestre y la cepa Eorf33g se cultivaron en los medios de cultivo líquidos R5A, MMs y MMI. Los medios de cultivo tipo MM se prepararon en ausencia de hierro. Se tomaron muestras a los días 5 y 7 que se extrajeron con los solventes orgánicos acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol. También se ensayaron los medios sólidos MMs y MMI, que se extrajeron con etanol a 6 días de cultivo. Se analizaron por UPLC los extractos sin observarse producción de nuevos compuestos en la cepa Eorf33g como se ejemplifica para el cultivo en R5A (Figura 52).

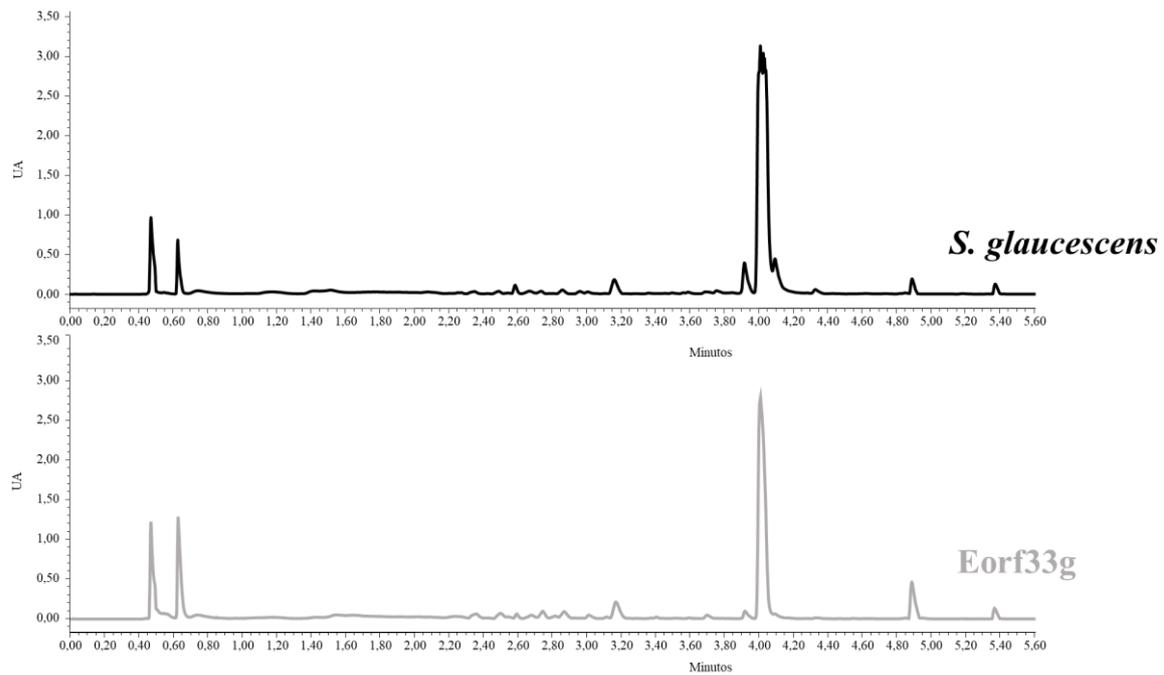


Figura 52. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y Eorf33g. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de acetato de etilo de *S. glaucescens* y Eorf33g cultivados durante 7 días en R5A líquido.

5.4.3. Cepas con genes reguladores sobreexpresados y/o mutados (orf11, orf29 y orf36)

En el BGC 8 existen varios reguladores transcripcionales, tanto reguladores de tipo activador como represor (Tabla 34). Tres de estos reguladores se encuentran dentro del *cluster 1* próximos a los genes que codifican NRPS (Figura 40). Dado que el BGC 8 aparentemente está silenciado o se expresa poco, se decidió sobreexpresar los activadores e inactivar los represores con el fin de activar o incrementar la expresión del BGC 8.

5.4.3.1. Generación de la cepa +orf11g

La *orf11* codifica un regulador tipo SARP, concretamente de tipo AfsR. Los reguladores AfsR son reguladores descritos como activadores de la expresión de BGCs, así como reguladores pleiotrópicos (Yan y Xia, 2024; Xia *et al.*, 2020). Por ello, se ha seleccionado la *orf11* como un gen candidato para realizar su expresión constitutiva, con la intención de inducir la activación del BGC 8.

Para generar la cepa con expresión constitutiva de la *orf11*, y a la que se le ha denominado +orf11g, se ha hecho uso del plásmido integrativo pSETETc-orf11 (Figura



23). Este plásmido procede de un plásmido pSET152ETc que contiene el promotor constitutivo de eritromicina modificado (*ermE***p*), bajo cuyo control se ha clonado la *orf11* (Figura 14). El plásmido pSETETc-*orf11* resultante permite la recombinación sitio-específica entre el sitio *attP* del plásmido y el sitio *attB* del cromosoma de *Streptomyces* (Figura 53A). Los transconjugantes se seleccionaron con los antibióticos apramicina y tioestreptona, ambas marcas de resistencias presentes en el plásmido pSETETc-*orf11*. Los transconjugantes se confirmaron por PCR usando los oligonucleótidos *ermE_up* y *R_AfsR_glau* sobre ADN genómico extraídos de la cepa silvestre como control y de los transconjugantes. Esta pareja de oligonucleótidos anilla dentro de la construcción pSETETc-*orf11*, el oligonucleótido *ermE_up* lo hace aguas arriba del promotor *ermE***p* y el oligonucleótido *R_AfsR_glau* sobre el codón *stop* de la *orf11*. Por ello solo encontramos amplificación en la cepa +*orf11*, concretamente una banda de 2,6 Kb que corresponde al promotor *ermE***p* seguido de la *orf11* (Figura 53B). El fragmento de PCR también se comprobó por secuenciación. Como control, se introdujo el vector pSET125ETc en *S. glaucescens*, generando la cepa *S. glau*+pset (Figura 53C), que se confirmó amplificando por PCR el gen de resistencia a tioestreptona del vector pSET152ETc. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Tsr 1 y Tsr 2 (Tabla 15), estos anillan en los extremos de dicho gen dando una banda de 1 Kb, por lo que solo se observa amplificación en los transconjugantes (Figura 53D).

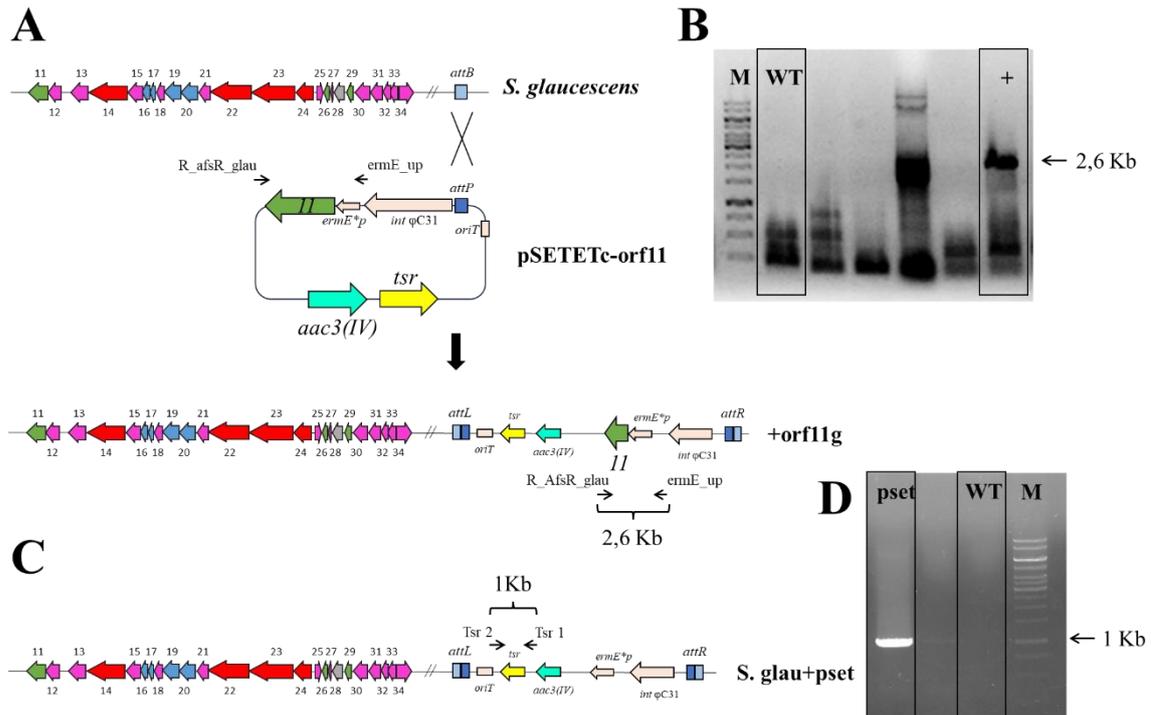


Figura 53. Generación de la cepa +orf11g. **A:** Esquema de recombinación entre el plásmido pSETETc-orf11 y el genoma de *S. glaucescens* a través de los sitios *attP* y *attB* respectivamente. **B:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos ermE_{up} y R_AfsR_{glau}. **C:** Esquema del genoma de la cepa *S. glau+pset*. **D:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos Tsr 1 y Tsr 2. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **+**: cepa +orf11g; **pset:** cepa *S. glau+pset*; *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *intΦC31*: gen que codifica una integrasa ΦC31; *ermE^{*p}*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.3.1.1. Generación de la cepa Δorf12g+orf11g

Para crear la cepa Δorf12g+orf11g se realizó el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior, 5.4.2.1., utilizando el plásmido pSETETc-orf11 (Figura 23). En este caso, el antibiótico de selección fue necesariamente tioestreptona debido a que la cepa Δorf12g ya es resistente a apramicina. Para la comprobación de la cepa Δorf12g+orf11g se utilizaron los oligonucleótidos ermE_{up} y R_AfsR_{glau} con los que se obtiene una banda de 2,6 Kb correspondiente al promotor *ermE^{*p}* junto con la *orf11* en la cepa portadora del plásmido pSETETc-orf11 (Figura 54).

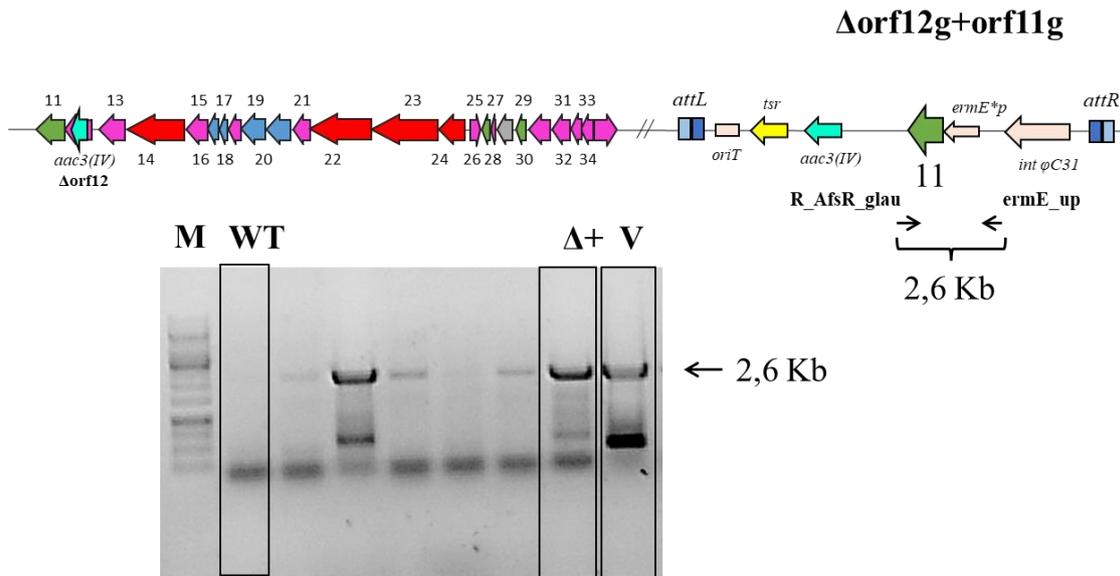


Figura 54. Esquema del genoma de la cepa $\Delta orf12g+orf11g$ y comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos *ermE_up* y *R_AfsR_glau*. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **$\Delta+$:** cepa $\Delta orf12g+orf11g$; **V:** plásmido pSETETc-*orf11*. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *intΦC31*: gen que codifica una integrasa ΦC31; *ermE*p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.3.1.2. Cultivos y perfiles metabólicos de las cepas sobreexpresando el regulador SARP *orf11*

La cepa *+orf11g* se cultivó junto a la cepa silvestre y la cepa *S. glaucescens+pSET125ETc*, en 18 medios líquidos durante 7 días (R5A, SM1, SM3, SM4, SM5, SM7, SM8, SM9, SM10, SM12, SM19, SM20, SM24, SM30, SM31, SV2, MMs y MMI). De estos cultivos se obtuvieron muestras que se extrajeron con cuatro solventes diferentes (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol) a excepción de los medios MMs y MMI que ensayaron tanto en líquido como en sólido y que se extrajeron con etanol. Además, para los medios SM3, SM4, SM5 y SM7 extraídos con los tres solventes usuales, se estudió también la presencia del quelante de hierro 2,2-bipiridilo (Nakouti *et al.*, 2012). Como se observa en la Figura 55, la expresión del regulador SARP codificado por la *orf11* en la cepa silvestre de *S. glaucescens* dio lugar a la producción de una serie de compuestos que no producían las cepas control. La producción de estos compuestos también se estudio en la cepa $\Delta orf12g+orf11g$, cultivada en 12 de estos medios (SM1, SM3, SM4, SM5, SM7, SM8, SM9, SM12, SM19, SM20, MMs y MMI), para comparar su perfil metabólico con el de la cepa *+orf11g*. Los



resultados de este estudio mostraron que estos compuestos se seguían produciendo en la mutante $\Delta orf12g+orf11g$, como se ejemplifica para la extracción con butanol en SM12 (Figura 55), lo que indica que estos compuestos no están codificados por el BGC 8.

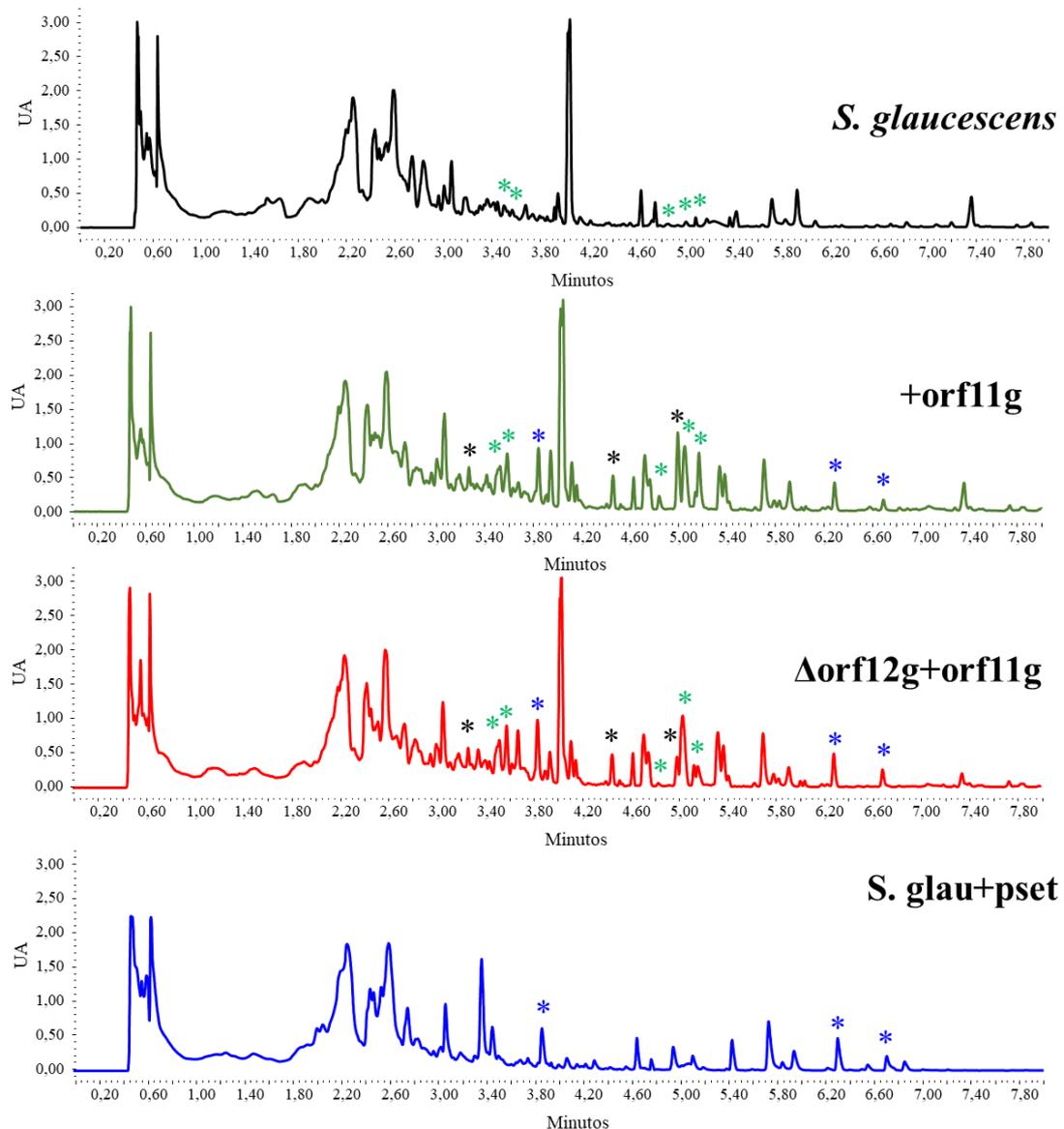


Figura 55. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens*, cepas mutantes con expresión del regulador SARP (*orf11*) y la cepa control con el plásmido pSET152ETc. Cromatogramas de UPLC (Maxplot) de extractos de butanol de *S. glaucescens*, +*orf11g*, $\Delta orf12g+orf11g$ y *S. glaucescens* con el plásmido pSET152ETc en cultivados de 6 días en SM12. Se indican con (*) los picos diferenciales producidos a casusa de la sobreexpresión del regulador SARP codificado por la *orf11*; con (*) los picos diferenciales a causa de la sobreexpresión del regulador SARP, *orf11*; con (*) los picos diferenciales producidos a casusa de la presencia del vector pSET152ETc.



5.4.3.2. Eliminación del regulador TetR; generación del mutante $\Delta orf36g$

La *orf36* se ha identificado como un regulador transcripcional tipo TetR (Tabla 34). Estos reguladores actúan generalmente como represores (Cuthbertson y Nodwell, 2013). Además, se ha descrito la necesidad de la eliminación de un represor de este tipo para la expresión de un BGC en *Streptomyces*, responsable de la biosíntesis de un sideróforo cuya unidad iniciadora es salicilato y que se encuentra también regulado positivamente por un regulador tipo afsR (Seipke *et al.*, 2011). Debido a estas similitudes con el BGC 8 se seleccionó la *orf36* para crear un mutante al que denominamos $\Delta orf36g$. Se hipotetizó que en esta nueva cepa se produciría la activación del BGC 8, por lo que se detectaría la producción de compuestos diferenciales por la cepa $\Delta orf36g$ y no por la cepa silvestre.

Para crear la cepa $\Delta orf36g$ se utilizó el plásmido pHZ- $\Delta orf36g$ (Figura 21) con el que se conjugó la cepa silvestre. Este plásmido permitió el reemplazamiento de la *orf36* sustituyéndola por el *cassette aac(3)IV*. Las colonias mutantes se seleccionaron por resistencia a apramicina y sensibilidad a tioestreptona (Figura 56A). Estos mutantes se comprobaron por PCR utilizando los oligonucleótidos F_ter_36_NotI y R_ter_36_EcoRI que anillan en los extremos de la *orf36*. Se obtuvo una amplificación de un fragmento de 0,8 Kb en la cepa silvestre correspondiente a la *orf36* y una amplificación mayor de 1,8 Kb, correspondiente al *cassette* de resistencia de apramicina y los extremos del gen *orf36*, en la cepa $\Delta orf36g$ (Figura 56B). Además, los fragmentos resultantes de la PCR se comprobaron por secuenciación.

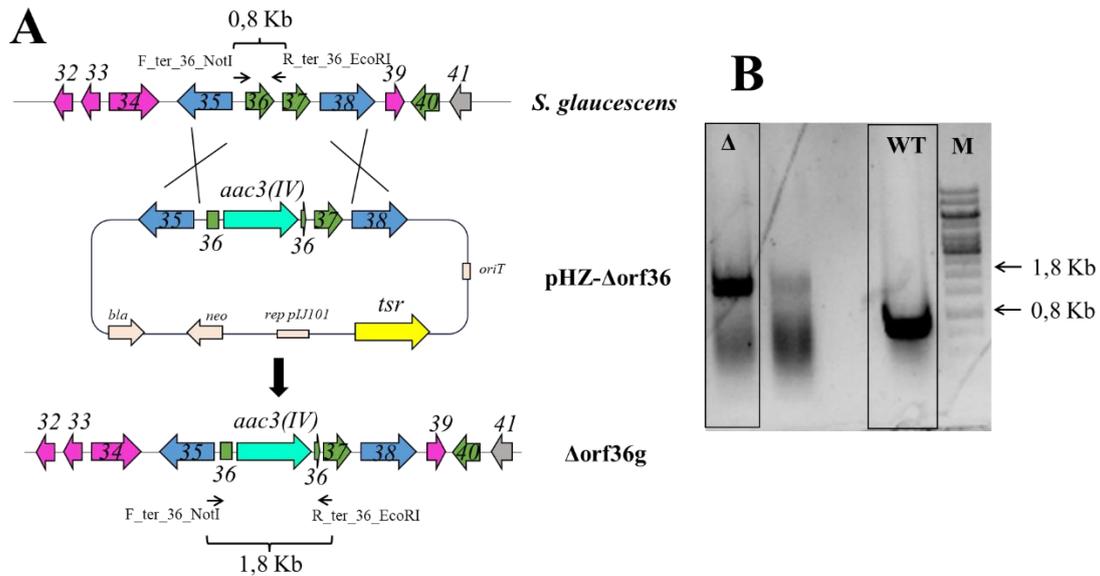


Figura 56. Generación del mutante Δ orf36g. **A:** Esquema de reemplazamiento génico utilizando el plásmido pHZ- Δ orf36g. **B:** Comprobación por PCR del mutante Δ orf36g, utilizando los oligonucleótidos F_ter_36_NotI y R_ter_36_EcoRI. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **Δ :** cepa Δ orf36g; **V:** plásmido pHZ- Δ orf36g. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *bla*: gen de la β -lactamasa; *neo*: resistencia a neomicina; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *rep pIJ101*: origen de replicación inestable de *Streptomyces*.

5.4.3.2.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa mutante Δ orf36g

La cepa Δ orf36g se cultivó en paralelo con la cepa silvestre en nueve medios de cultivo líquidos diferentes, (R5A, MMs, MS, Ent, SM1, SM3, SM7, SM10, SM25). Se tomaron muestras de 1 mL a los días 3, 5 y 7 que se extrajeron de forma independiente con cuatro solventes orgánicos diferentes (acetato de etilo, acetato de tilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol) y posteriormente se analizaron por UPLC. De los nueve medios ensayados solo se observó producción de nuevos compuestos en el cultivo en R5A (Figura 57 y 58). Así, cuando el mutante Δ orf36g se cultivó en R5A se observó la presencia de un total de siete picos diferenciales con respecto a la cepa silvestre. Cuatro de estos picos se detectaban en tres de los cuatro extractos orgánicos obtenidos (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol), como se muestra en la Figura 57A para la extracción con acetato de etilo a día 7. Mientras que los tres picos restantes solo se observaban en extractos de etanol a tiempos tempranos, día 3 (Figura 58A). Los espectros de absorción de estos picos mostraron cuatro tipos de espectros: el



pico 1 con tres máximos de absorbancia a 212 nm, 220 nm y 280 nm; los picos 2, 3 y 4 con un máximo entre 200-215 nm (Figura 57B): los picos 5 y 7 que con una máximo a 200 nm y otro pequeño a 260 nm; y finalmente, el pico 6 con un máximo a 220 nm y otro a 280 nm (Figura 58B).

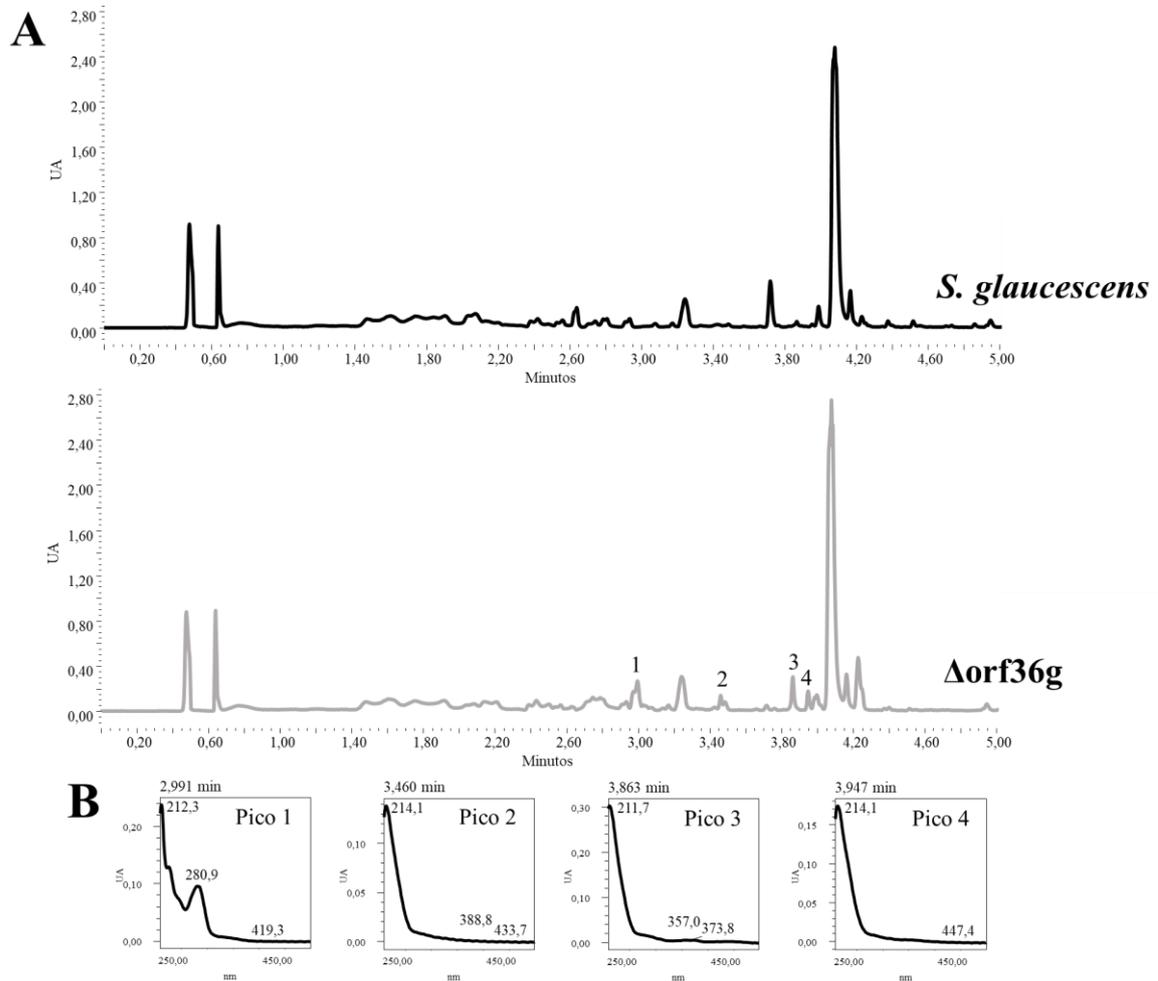


Figura 57. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y el mutante Δorf36g . **A:** Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de acetato de etilo de cultivos en R5A líquido a día 7, de las cepas *S. glaucescens* y Δorf36g . **B:** Espectros de absorción de los compuestos diferenciales 1-4 producidos por la cepa Δorf36g .

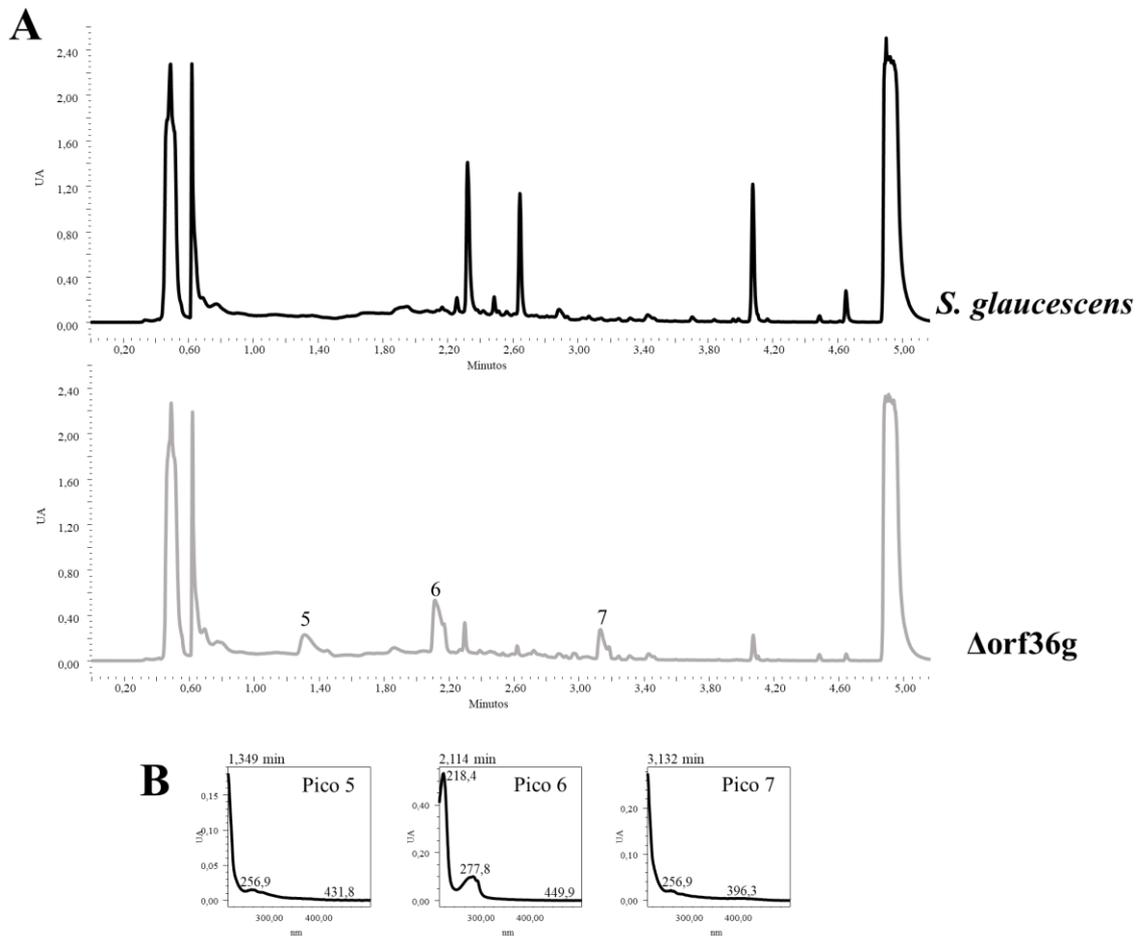


Figura 58. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y el mutante Δ orf36g. **A:** Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de etanol de cultivos en R5A líquido a día 3 de las cepas *S. glaucescens* y Δ orf36g. **B:** Espectros de absorción de los compuestos diferenciales 5-7 producidos por la cepa Δ orf36g.

5.4.3.3. Sobreexpresión del regulador *LuxR*: generación de la cepa +*orf29g*

La *orf29* codifica un regulador transcripcional tipo *LuxR* (Tabla 34), que han sido descritos como activadores transcripcionales (Bara *et al.*, 2018; Chen y Xien, 2011). Para generar la cepa +*orf29g* se construyó el plásmido pSETETc-*orf29* que contiene la *orf29* bajo el control del promotor *ermE***p* del vector pSET152ETc (Figura 24). El plásmido resultante se introdujo en la cepa silvestre mediante conjugación y recombinación sitio-específica entre el sitio *attP* del plásmido y el sitio *attB* del cromosoma de *S. glaucescens*. Los transconjugantes obtenidos por recombinación se seleccionaron con los antibióticos apramicina y tioestreptona (Figura 59A). Las cepas recombinantes se confirmaron por PCR utilizando los oligonucleótidos *ermE*_up y R_*Lux29*_NotI que anillan aguas arriba



del promotor *ermE***p* y sobre el codón *stop* de la *orf29*, respectivamente. Así, solo se produce la amplificación en la cepa +*orf29*, obteniéndose una banda de 0,9 Kb que se corresponde con el promotor *ermE***p* junto con la *orf29* (Figura 59B). El fragmento de PCR se comprobó por secuenciación.

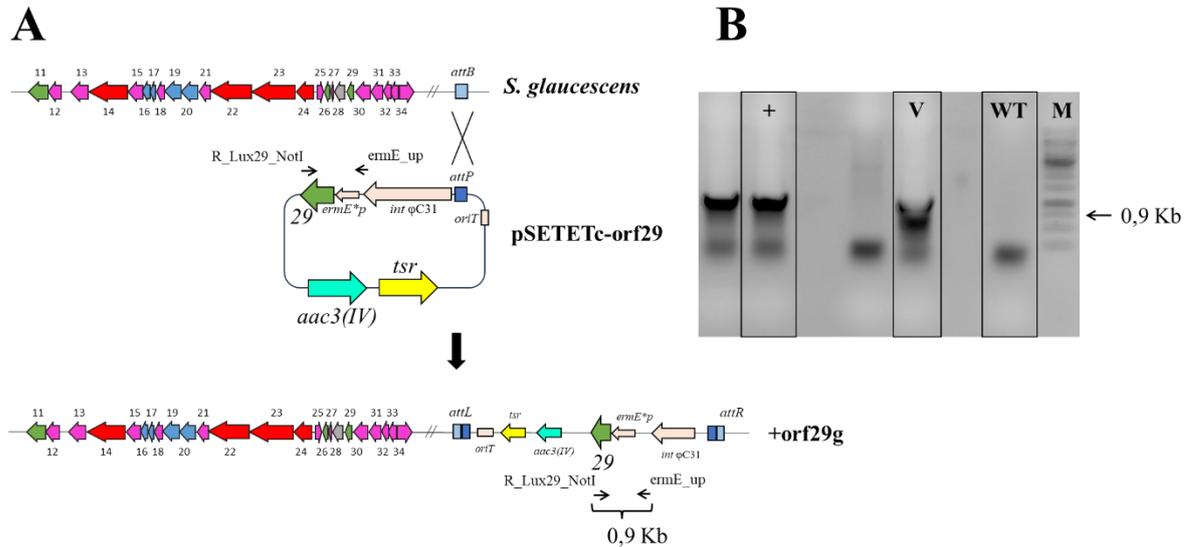


Figura 59. Generación de la cepa +*orf29g*. **A:** Esquema de recombinación entre el plásmido pSETETc-*orf29* y el genoma de *S. glaucescens* a través de los sitios *attP* y *attB* respectivamente. **B:** Comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos *ermE*_up y *R_Lux29*_NotI. **M:** Marcador de peso molecular; **WT:** cepa silvestre; **+**: cepa +*orf29g*; **V:** plásmido PSETETc-*orf29*; *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *intΦC31*: gen que codifica una integrasa ΦC31; *ermE***p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.3.3.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa +*orf29g*

La cepa +*orf29g* se cultivaron en paralelo con la cepa silvestre en R5A y en SM10. Se tomaron muestras de 1 mL a día 5 y 7. Estas muestras se extrajeron con cuatro solventes orgánicos diferentes (acetato de etilo, acetato de tilo con 1 % de ácido fórmico, butanol y etanol). Los extractos se analizaron por UPLC y los perfiles cromatográficos obtenidos de ambas cepas se compararon. Mientras que en el medio de cultivo SM10 no se detectaron diferencias significativas, sí pudieron verse en el medio R5A. De esta forma se detectaron en la cepa +*orf29g* y no en la cepa silvestre, un total de siete picos diferenciales en R5A cuando la muestra es extraída con acetato de etilo (Figura 60A). Tres de estos picos son los picos identificados como 2, 3 y 4 en el perfil metabólico de la cepa Δ*orf36g* (Figura 57). Pero además de estos picos diferenciales se observaron cuatro



picos, más nombrados del 8 al 11, y cuyos espectros presentan un único máximo entorno a 200 nm (Figura 60C). Los siete picos identificados parecen corresponder a compuestos de la misma familia debido a la similitud entre sus espectros (Figuras 60B y 60C).

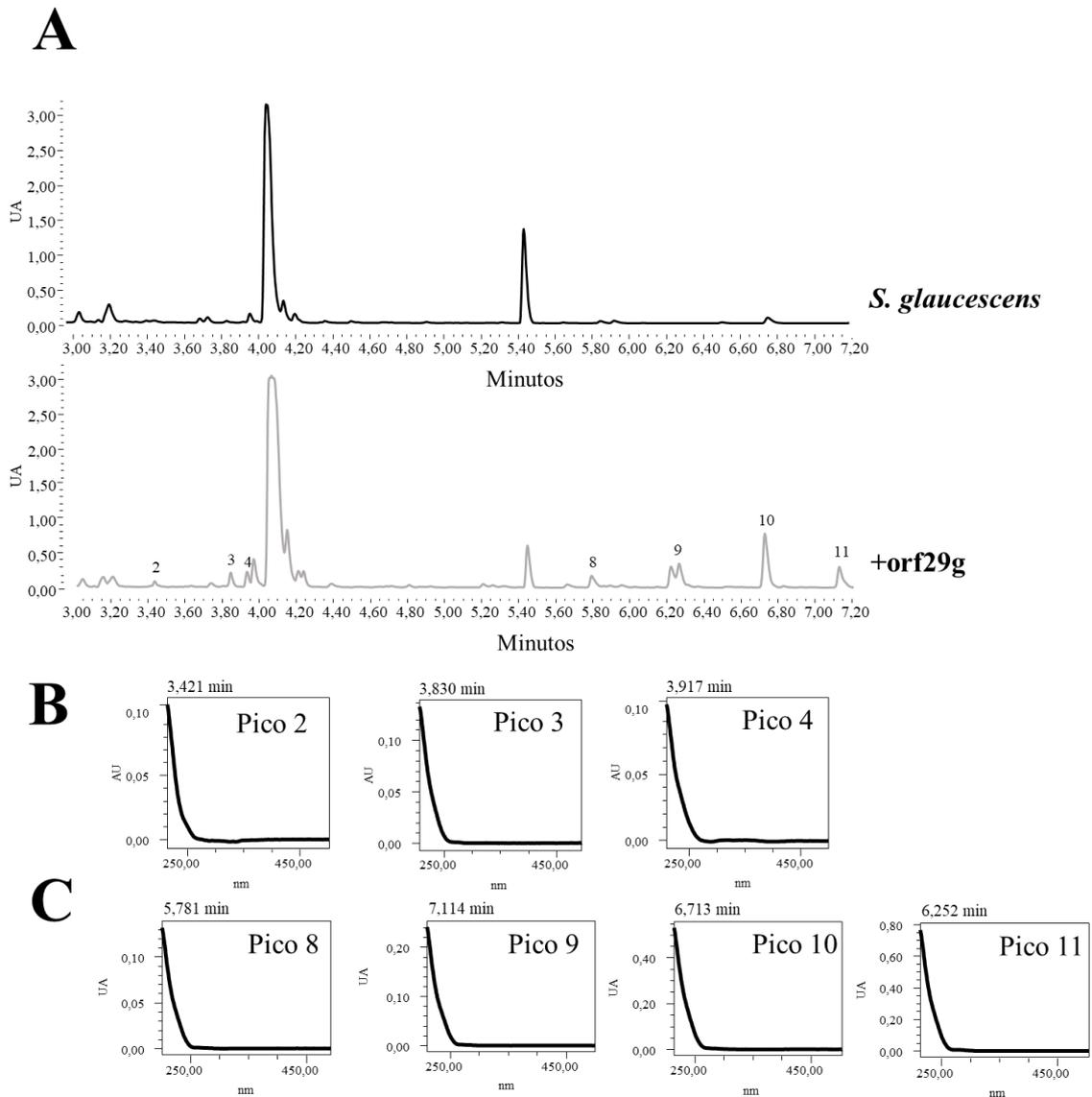


Figura 60. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens* y de la cepa +orf29g. **A:** Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de acetato de etilo a día 5, de cultivos en R5A líquido, de las cepas *S. glaucescens* y la cepa recombinante +orf29g. **B:** Espectros de absorción de los compuestos diferenciales 2-4 producidos por la cepa +orf29g. **C:** Espectros de absorción de los compuestos diferenciales 8-11 producidos por la cepa +orf29g.



5.4.3.4. Sobreexpresión del regulador *LuxR* en el mutante $\Delta orf36g$: generación de la cepa $\Delta orf36g+orf29g$

Para generar la cepa $\Delta orf36g+orf29g$ se realizó el mismo procedimiento seguido en el apartado anterior, 5.4.3.3., pero realizando la conjugación con la cepa mutante $\Delta orf36g$ en lugar de con la silvestre. La selección de los transconjugantes se realizó con el antibiótico tioestreptona, ya que la cepa $\Delta orf36g$ ya es resistente a apramicina debido a la mutación que contiene. La cepa recombinante se comprobó con los oligonucleótidos *ermE_up* y *R_Lux29_NotI*, obteniéndose la banda de 0,9 Kb con el promotor *ermE*_p* junto con la *orf29* en la cepa $\Delta orf36g+orf29g$, mientras que la cepa control $\Delta orf36g$ mostró la amplificación de una banda de mayor tamaño, que al comprobarse por secuenciación se identificó como una amplificación inespecífica (Figura 61).

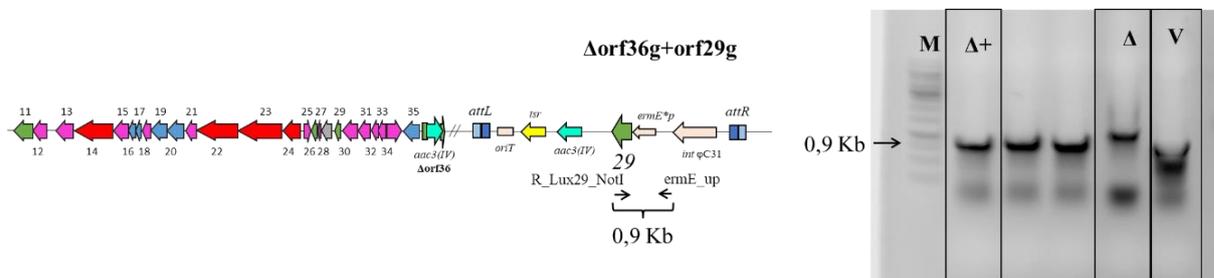


Figura 61. Esquema del genoma de la cepa $\Delta orf36g+orf29g$ y comprobación por PCR utilizando los oligonucleótidos *ermE_up* y *R_Lux29_NotI*. **M:** Marcador de peso molecular; **$\Delta+$:** cepa $\Delta orf36g+orf29g$; **Δ :** cepa $\Delta orf36g$; **V:** plásmido PSETETc-*orf29*. *aac(3)IV*: gen de resistencia a apramicina; *tsr*: gen de resistencia a tioestreptona; *oriT*: origen de transferencia a *Streptomyces*; *int Φ C31*: gen que codifica una integrasa Φ C31; *ermE*_p*: promotor del gen de resistencia a eritromicina mejorado.

5.4.3.4.1. Cultivos y perfiles metabólicos de la cepa $\Delta orf36g+orf29g$

La cepa $\Delta orf36g+orf29g$ y la cepa $\Delta orf36g$ se cultivaron en el medio líquido R5A. Se tomaron muestras a día 5 que se extrajeron con acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol. Los extractos resultantes se analizaron por UPLC. Los resultados mostraron que ambas cepas ($\Delta orf36g+orf29g$ y $\Delta orf36g$) son capaces de producir los compuestos 2, 3, 4. Sin embargo, solo la cepa $\Delta orf36g+orf29g$ produce los compuestos 8, 9, 10 y 11 que produce la cepa $+orf29g$ (Figura 60 y Figura 62).

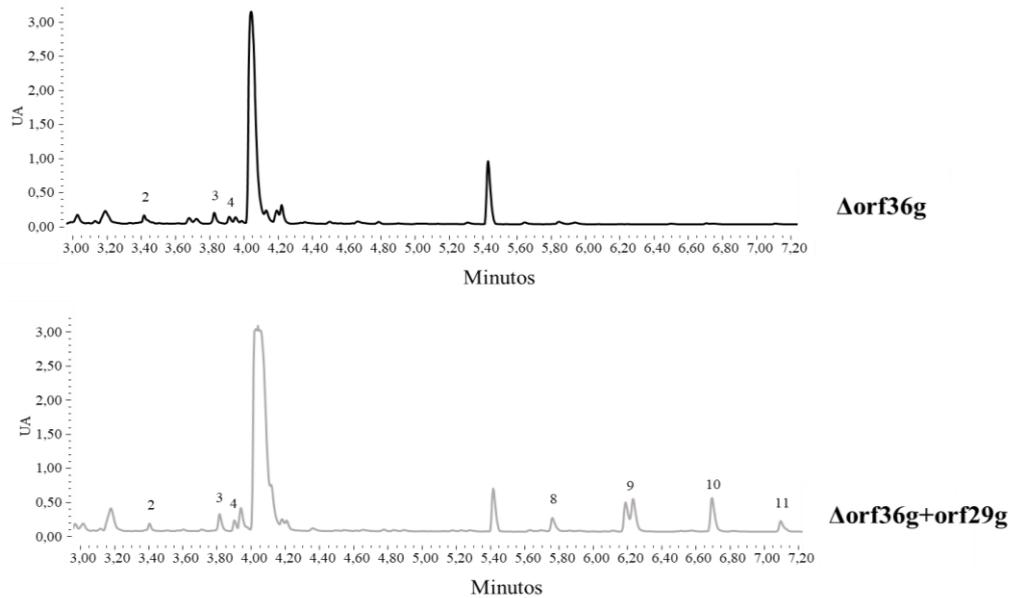


Figura 62. Comparación de perfiles metabólicos de las cepas Δ orf36g y la cepa Δ orf36g+orf29g. Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de acetato de etilo a día 5 en cultivo R5A líquido, de las cepas Δ orf36g y la cepa Δ orf36g+orf29g. Se muestran los picos diferenciales 2-4 y 8-11.

Los cromatogramas de extractos de acetato de etilo de cultivos a día 5 de las cepas silvestre, +orf29g, Δ orf36g y orf36g+orf29g se compararon, mostrando que los compuestos del 2 al 4 se producen tanto al eliminar el gen represor *tetR36* como al sobreexpresar el gen activador *luxR29*. Sin embargo, los compuestos del 8 al 11 solo se producen al sobreexpresar el activador LuxR29 (Figura 63).

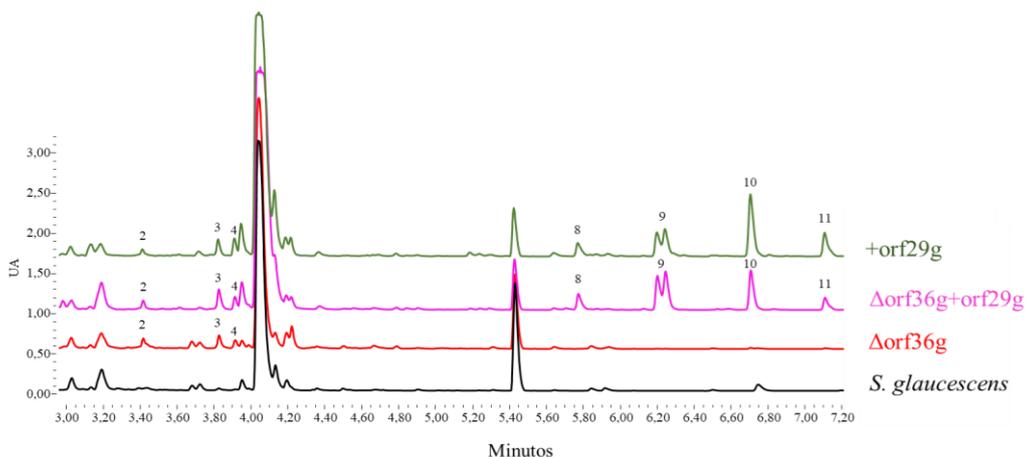


Figura 63. Comparación de perfiles metabólicos de *S. glaucescens*, Δ orf36g, Δ orf36g+orf29g y +orf29g. Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de acetato de etilo a día 5 en cultivo R5A líquido de las cepas de *S. glaucescens*, Δ orf36g, Δ orf36g+orf29g y +orf29g. Se muestran los picos diferenciales 2-4 y 8-11.



5.5. Purificación y caracterización química de los compuestos 1-4

Los compuestos correspondientes a los picos del 1 al 4 observados tanto al inactivar el represor TetR codificado por la *orf36*, como al expresar el activador LuxR codificado por la *orf29*, se purificaron. Para ello, se partió de un volumen final de 1,5 L de cultivo de la cepa $\Delta orf36g$, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 13.1. Los compuestos correspondientes a estos picos se nombraron como UO-186, UO-187, UO-188 y UO-190 respectivamente. Tras la purificación de estos compuestos se obtuvieron las siguientes cantidades UO-186 (1,2 mg), UO-187 (1,2 mg), UO-188 (2,9 mg) y UO-190 (0,2 mg).

Estos cuatro compuestos puros fueron analizados por la Fundación MEDINA donde se realizaron desreplicaciones previas a la caracterización química por RMN. Gracias a las desreplicaciones se identificó el compuesto UO-186 como ácido indol- β -carboxílico (Figura 64).

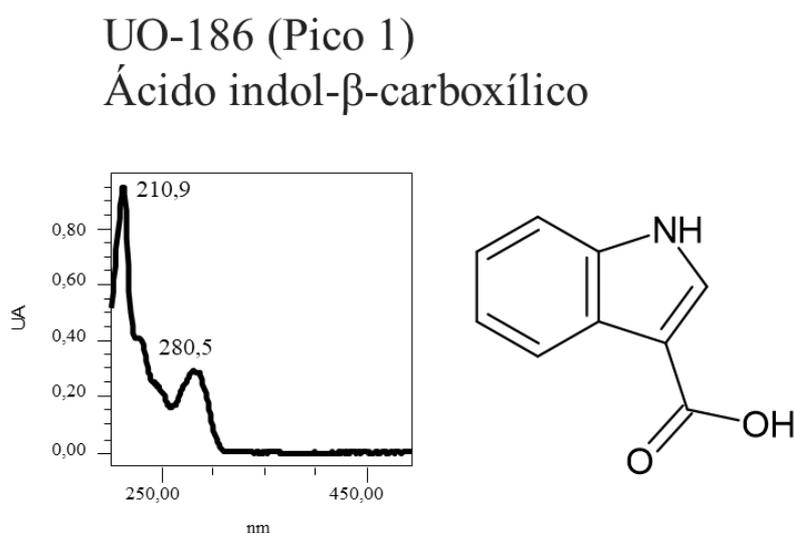


Figura 64. Espectro de absorción y estructura del compuestos UO-186 identificado por desreplicación como ácido indol- β -carboxílico.

Sin embargo, los otros tres compuestos, UO-187, UO-188 y UO-190, no pudieron ser identificados por desreplicación sugiriendo su novedad. El análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) proporcionó las fórmulas moleculares de los compuestos como $C_{12}H_{24}N_2O_3$ (UO-187), $C_{13}H_{26}N_2O_3$ (UO-188) y $C_{13}H_{26}N_2O_3$ (UO-190). Así se reveló que los compuestos UO-188 y UO-190 son isómeros entre ellos y que



el compuesto UO-187 presenta un metileno menos que los otros compuestos. A las muestras UO-188 y UO190 se les realizaron espectros de RMN adicionales (COSY, NOESY, HMBC, 15N-HSQC y 1D-13C) para determinar su estructura. Los resultados de estos estudios aportaron las estructuras finales mostradas en la Figura 65.

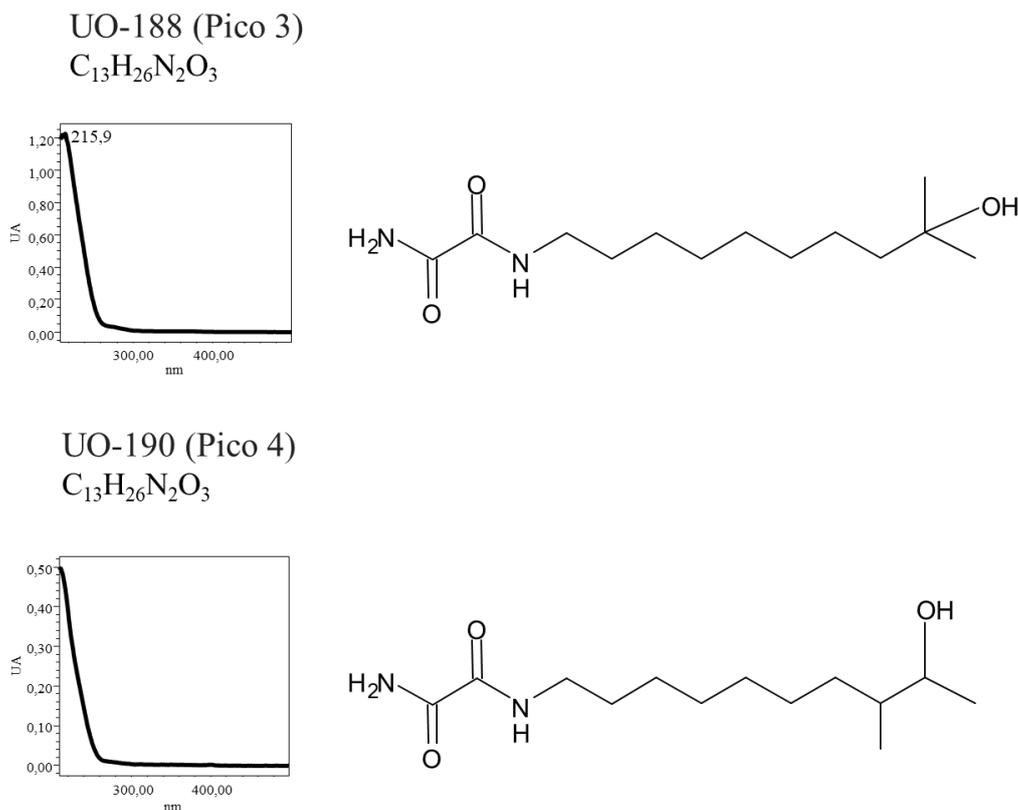


Figura 65. Espectros de absorción, fórmulas moleculares y estructuras propuestas para los compuestos UO-188 y UO-190.

En base a la estructura de estos compuestos, se puede deducir que los mismo no estarían codificados por el *cluster* 1 del BGC 8, ya que este contiene genes codificantes de NRPS que codificarían la biosíntesis de un péptido de cuatro aminoácidos.

5.6. Bioensayo de la actividad biológica del compuesto UO-188

Se realizaron ensayos de actividad antibiótica y antifúngica con el compuesto UO-188 (Figuras 65), correspondiente al pico 3 producido por las cepas Δ orf36g y +orf29g (Figura 58). El procedimiento fue el descrito en el apartado 14. de Métodos y Materiales. Los ensayos de actividad antibiótica y antifúngica se realizaron con 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 μ g/mL de compuesto puro frente a las bacterias *M. luteus*, *E. coli*, *S.*



aureus, *P. aeruginosa* y frente al hongo *C. albicans*. No se observó actividad antibiótica ni antifúngica.

5.7. Desreplicación de extractos de etanol de cultivos del mutante Δ orf36g

Conocidas ya las estructuras de los compuestos correspondientes a los picos del 1 al 4, producidos por la cepa mutante en el regulador *tetR*, Δ orf36g (Figuras 64 y 65), se analizaron por desreplicación en la Fundación MEDINA, los extractos de etanol de cultivos en R5A líquidos de esta cepa. Se analizó de forma comparativa la cepa silvestre y la cepa Δ orf36g, para identificar los compuestos correspondientes a los picos del 5 al 7 producidos por Δ orf36g (Figura 58). Los análisis obtenidos por la Fundación MEDINA mostraron tres compuestos diferenciales producidos por la cepa Δ orf36g y no por la cepa silvestre, que basándose en los espectros serían candidatos a los picos nombrados del 5 al 7. Los compuestos fueron $C_{16}H_{33}N_3O_3$ con una m/z de 280,2636; $C_{14}H_{28}N_2O_2$ con una m/z de 296,2600 y $C_{15}H_{30}N_2O_2$ con una m/z de 280,2636 (Figura 66). Ninguno de estos tres compuestos diferenciales presentó coincidencias en el DPN (Diccionario de Productos Naturales) de la Fundación MEDINA, lo que indica que podrían tratarse de compuestos no descritos.

Basándose en el tiempo de retención de estos compuestos y en los espectros de absorción, tanto en los análisis de UPLC realizados en el laboratorio como los realizados en la Fundación MEDINA, se deduce que el compuesto $C_{16}H_{33}N_3O_3$ corresponde al pico 5, el compuesto $C_{14}H_{28}N_2O_2$ al pico 6 y el compuesto $C_{15}H_{30}N_2O_2$ al pico 7. Las fórmulas moleculares y los espectros de dichos compuestos sugieren que pertenecerían a la misma familia que los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190.

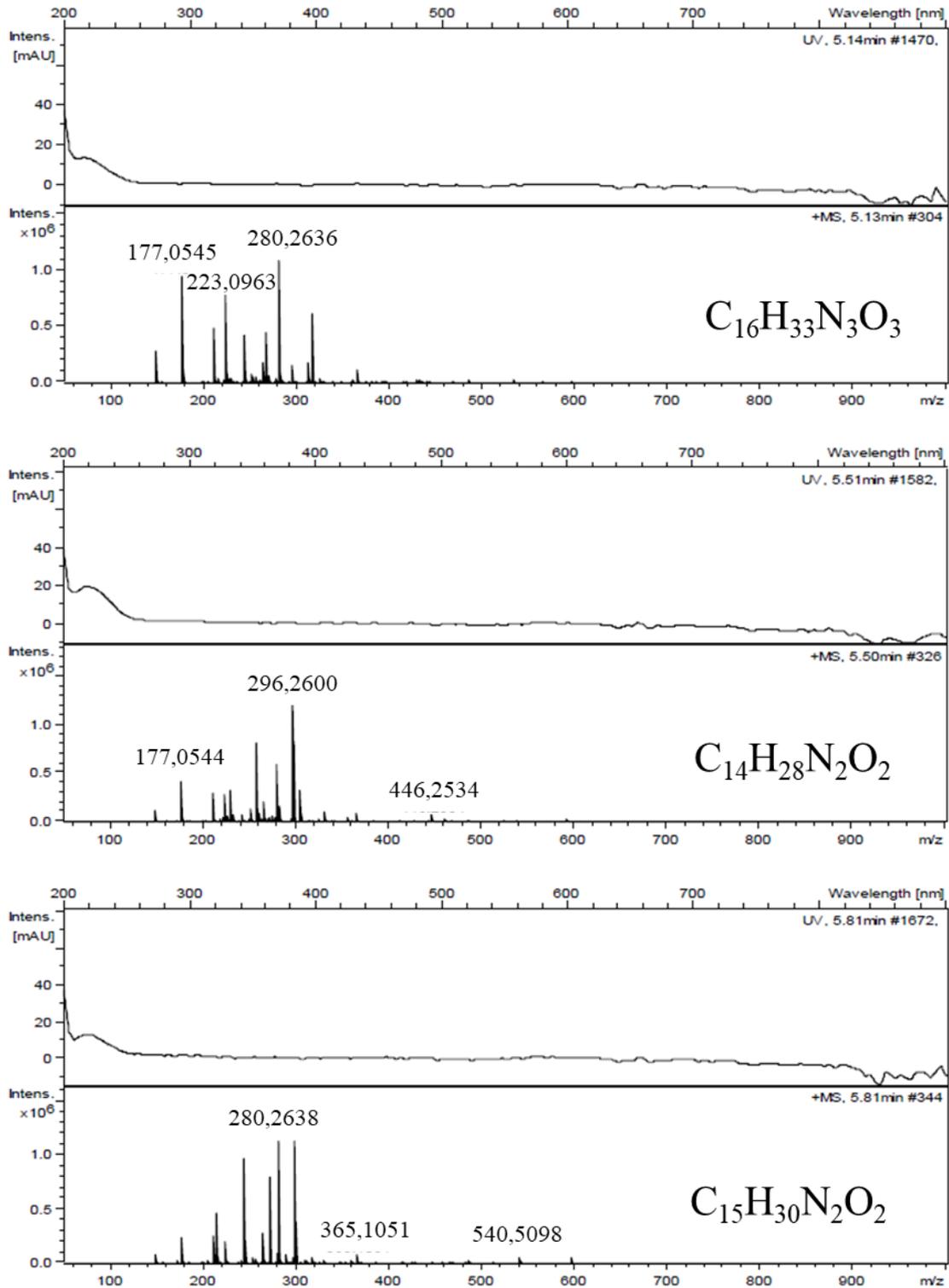


Figura 66. Espectros de masas y de absorción de los compuestos diferenciales del 5 al 7 detectados en extractos de etanol del mutante Δ orf36g. La fórmula molecular se dedujo por desreplificación.



5.8. Metabolitos producidos por *Streptomyces glaucescens* GLA.O

La especie *S. glaucescens* fue aislada hace más de medio siglo de una muestra de suelo procedente de Haiderabad en la India. Recibió su nombre de la palabra latina *glaucus*, por el color verde-azulado de sus esporas. A pesar de esto, la secuenciación de su genoma se completó mucho tiempo después (Ortseifen *et al.*, 2015). Antes se habían realizado ensayos con esta cepa de *Streptomyces* con lo que se pudieron encontrar un total de tres metabolitos secundarios de interés, que son los únicos descritos para esta cepa. En primer lugar, un antibiótico antitumoral con color amarillo similar a la antraciclina, al que se le denominó tetracenomicina C, que fue el primer metabolito secundario descubierto en *S. glaucescens* (Guilfoile y Hutchinson, 1992). Este metabolito, caracterizado hace años (Hutchinson, 1997), es codificado por el BGC 20 y que se detecta con antiSMASH en este trabajo (Tabla 33). Este BGC había sido secuenciado, (Summers *et al.*, 1992) y caracterizado previamente (Hutchinson, 1997). No mucho más tarde, se descubrió que *S. glaucescens* también producía 5-hidroxiestreptomicina, (Beyer *et al.*, 1996), un compuesto similar a la estreptomicina, un antibiótico aminoglicósido descubierto previamente en otros *Streptomyces* (Schatz *et al.*, 2005). El BGC que codifica 5-hidroxiestreptomicina es el BGC 3 (Tabla 33). Finalmente, el último metabolito secundario detectado en *S. glaucescens* fue la acarbosa (Rockser y Wehmeier, 2009), un oligosacárido descrito previamente y que es utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II, ya que reduce la velocidad de digestión de los carbohidratos, controlando los niveles de azúcar en sangre. El BGC responsable de la síntesis de este metabolito no es detectado por antiSMASH. Sin embargo, puede ser localizado en uno de los extremos del BGC 2 aunque continúa en la región colindante (Tabla 33).

5.8.1. Compuestos conocidos identificados por desreplicación en *S. glaucescens* GLA.O

En este trabajo se han analizado, por desreplicación en la Fundación MEDINA, diferentes extractos de esta cepa cultivada en distintos medios, encontrándose en estos análisis la producción de un buen número de compuestos. Sin embargo, muchos de estos no han podido ser identificados ya que no están incluidos en el DPN (Diccionario de Productos Naturales), con lo que posiblemente sean compuestos nuevos. Igualmente se han identificado algunos conocidos.



En primer lugar se ha identificado el compuesto tetracenomicina C en muchos de los medios ensayados, por ejemplo en las Figuras 50, 52, 55, 58, 60, 62 y 63, correspondientes al cultivo de diferentes cepas de *S. glaucescens* en R5A, donde se puede observar un pico de gran tamaño, siempre que no se ha realizado la extracción con etanol, entre los minutos 4 y 4,2 correspondiente a este compuesto. También en SM10 y SM12 (Figura 42 y 55) en el mismo tiempo de retención, aunque con menos producción en el caso del medio SM10. Además, este compuesto se confirmó por desreplicación en múltiples cultivos, lo que ha permitido identificarlo en otros cultivos posteriores gracias a su característico espectro de absorción (Figura 67). Como se menciona anteriormente, el compuesto es codificado por el BGC 20 (Tabla 33 y Figura 68).

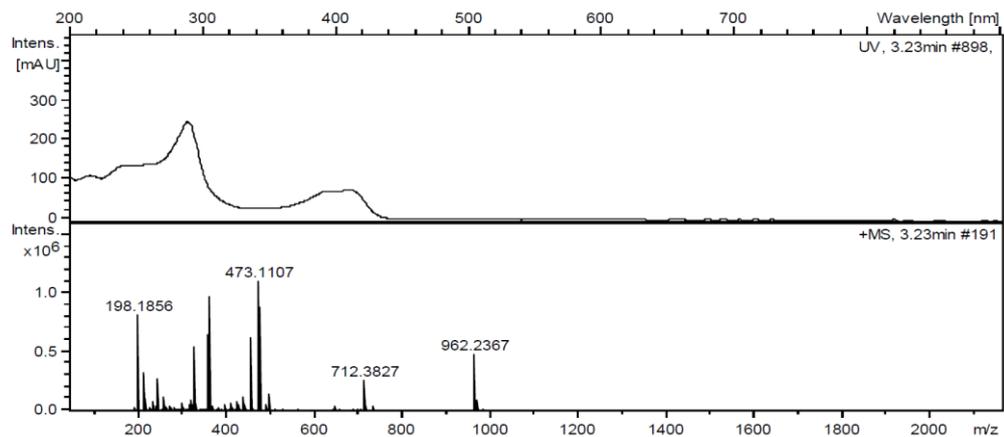


Figura 67. Espectro de masas y de absorción del compuesto desreplicado como tetracenomicina C en *S. glaucescens*.

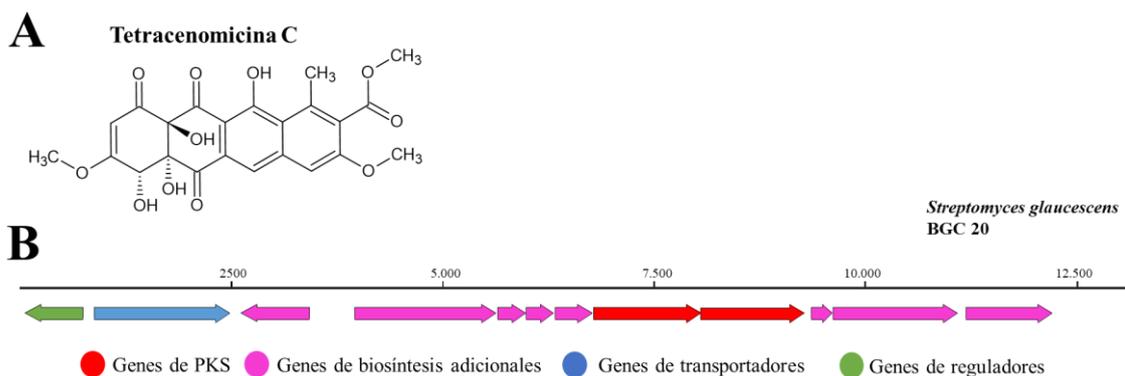
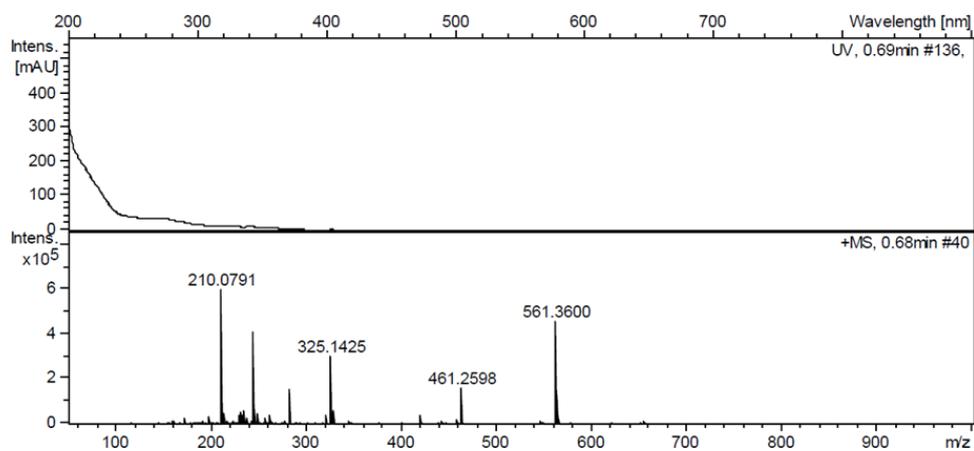


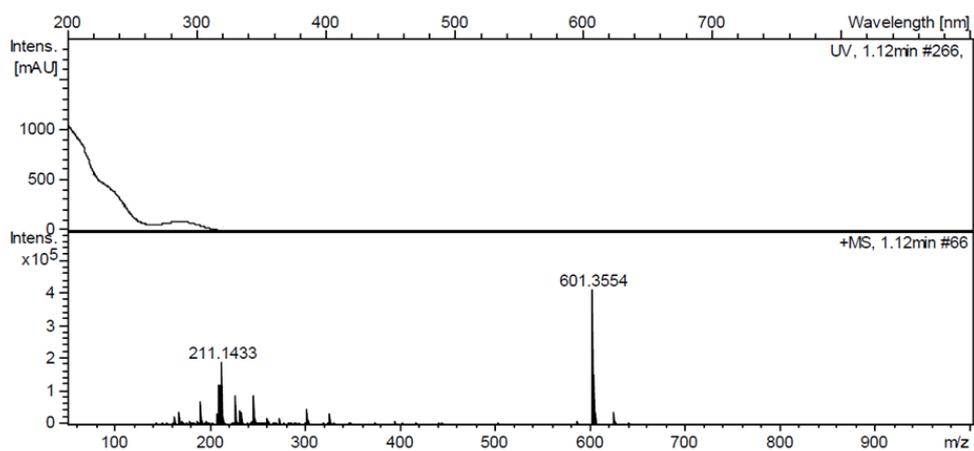
Figura 68. BGC de tetracenomicina C. **A:** Estructura de la tetracenomicina C. **B:** Esquema del BGC de tetracenomicina en la cepa de *S. glaucescens*. El BGC se representa a escala.



También, se han detectado los compuestos nocardamina o desferroxamina E ($C_{27}H_{48}N_6O_9$), y su homólogo desmetilenocardamina ($C_{26}H_{46}N_6O_9$), así como el compuesto desferroxamina B ($C_{25}H_{48}N_6O_8$) y acil-desferrioxamina ($C_{32}H_{62}N_6O_8$), una variante de la misma molécula con una cadena carbonada añadida, que están codificados por el BGC 13 (Tabla 33 y Figura 71). La producción de compuestos codificados por el BGC 13 se dio en los medios R5A tanto sólido como líquido, y se detectaron en los extractos de butanol y etanol, respectivamente y también en el medio SM10 líquido, en extractos de acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico (Figuras 69 y 70).

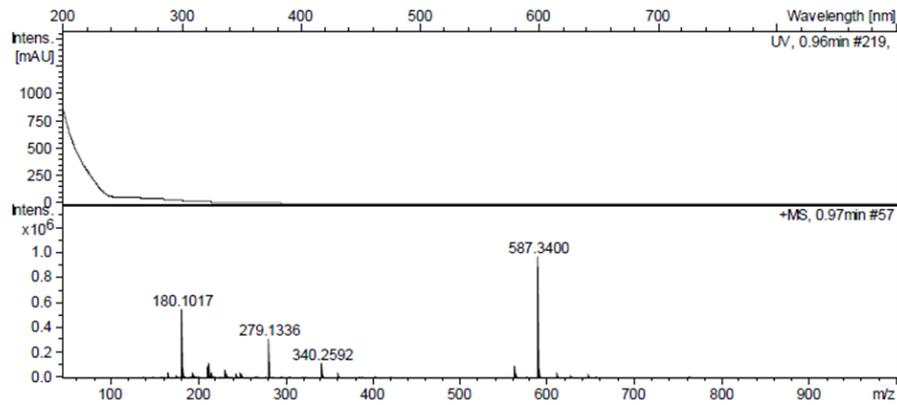


Fórmula molecular sugerida: $C_{25}H_{48}N_6O_8$. **Deferoxamine.**

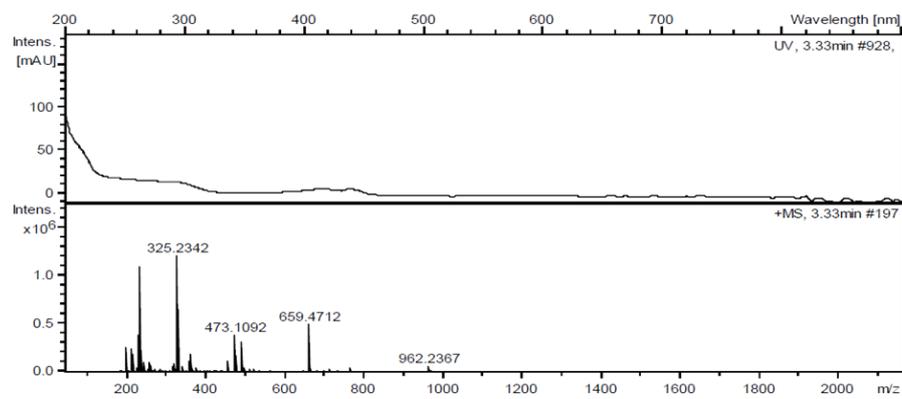


Fórmula molecular sugerida: $C_{27}H_{48}N_6O_9$. **Nocardamine.**

Figura 69. Espectro de masas y de absorción de los compuestos desreplicados como desferroxaminas en un cultivo de 5 días de *S. glaucescens*, en medio SM10 extraído con acetato de etilo y ácido fórmico 1%.



Fórmula molecular sugerida: $C_{26}H_{46}N_6O_9$. Demethylenocardamine.



Fórmula molecular sugerida: $C_{32}H_{62}N_6O_8$. Acyl-desferrioxamine

Figura 70. Espectros de masas y de absorción de los compuestos desreplicados como desmetilenocardamina, en un cultivo de 6 días, en medio R5A sólido de *S. glaucescens* extraído con butanol, y acil-desferrioxamina, en un cultivo de 3 días de *S. glaucescens*, en medio R5A líquido extraído con etanol.

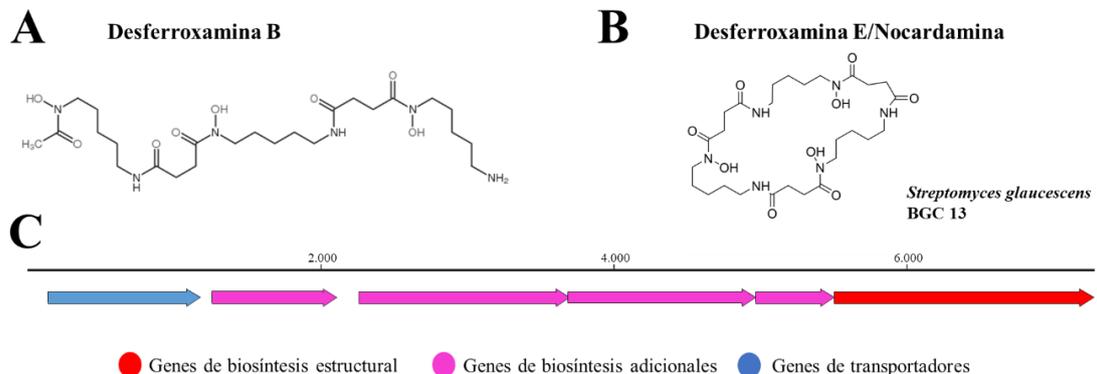


Figura 71. BGC de desferrooxaminas. **A:** Estructura de la desferrooxamina B. **B:** Estructura de la desferrooxamina E. **C:** Esquema del BGC de desferrooxaminas en la cepa de *S. glaucescens*. El BGC se representa a escala



Las desreplicaciones también detectaron otras moléculas no asociadas con un BGC como el ácido desoxidehidrocorismico ($C_{10}H_8O_5$) producido en SM10 que es resultante de la acción de la corismato deshidratasa usando corismato como sustrato. El gen que codifica dicha enzima se ha localizado en el genoma de *S. glaucescens* como SGLAU_RS19340 y anotado como gen de biosíntesis de menaquinona (vitamina K) y codifica la proteína WP_043503164.1.

Finalmente, se detectó un compuesto con fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ que se sugirió como pentalenolactona D. Sin embargo, el BGC responsable de la biosíntesis de pentalenolactona no se identificó en *S. glaucescens*. Se realizó un estudio de homologías para la búsqueda de genes que pudieran cumplir las funciones necesarias, buscando los genes que codificasen proteínas homólogas a las codificadas por el BGC de pentalenolactona de *Streptomyces arenae* TU469 (Zhu *et al.*, 2011). Aunque se encontraron homólogos para diez de los once productos codificados por los genes que componen el BGC de pentalenolactona de *S. arenae*, y en cinco casos más de un homólogo, los genes que las codificaban se encontraban repartidos por el genoma y no agrupados formando un BGC propiamente dicho. Además, las homologías resultantes fueron en la mayoría de los casos muy bajas (Tabla 40). Por lo que aparentemente el compuesto con fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ no ha de ser pentalenolactona D, sino otro compuesto desconocido.



Tabla 40. Genes homólogos detectados en *S. glaucescens* para los genes del BGC de pentalenolactona de *Streptomyces arenae* TU469

BGC pentalenolactona <i>S. arenae</i>	<i>S. glaucescens</i>				
	Nucleótidos	locus	Número de acceso	Ident. (%)	Función
<i>pntR</i>	6.675.198-6.675.671	SGLAU_RS28835	WP_043505461.1	34,23	Regulador transcripcional MarR
	5.158.952-5.159.443	SGLAU_RS22480	WP_043504078.1	33,88	
<i>gapR</i>	1.988.769-1.989.776	gap* ¹	WP_043499841.1	62,69	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
	2.459.694-2.460.692	gap* ¹	WP_043500479.1	60,18	
<i>pntM</i>	491.488-492.684	SGLAU_RS02095	WP_052413573.1	33,85	Citocromo P450 monoxigenasa
	6.128.816-6.129.997	SGLAU_RS26515	WP_043505019.1	33,67	
	3.241.397-3.242.668	SGLAU_RS13935	WP_043501510.1	32,39	
<i>pntH</i>	-	-	-	-	-
<i>pntG</i>	3.353.649-3.355.271	SGLAU_RS14430	WP_078957719.1	38,13	Transportador MFP
<i>pntF</i>	1.507.450-1.508.241	SGLAU_RS06545	WP_043499175.1	39,5	Oxoacil reductasa
	3.770.844-3.772.604	SGLAU_RS16345	WP_043502241.1	30,5	
<i>pntE</i>	3.325.947-3.327.491	SGLAU_RS14295	WP_043501656.1	30,95	Oxidorreductasa
<i>pntD</i>	822.135-823.034	SGLAU_RS03550	WP_043498287.1	27,11	Dioxigenasa
<i>pntB</i>	6.465.012-6.466.076	SGLAU_RS27915	WP_043505296.1	55,49	Poliprenil sintetasa
<i>pntA</i>	6.821.706-6.822.737	SGLAU_RS29530	WP_043505603.1	33,63	Eudesmol sintasa
<i>pntI</i>	943.537-944.946	SGLAU_RS04085	WP_078957583.1	43,47	Citocromo P450 monoxigenasa
	5.096.469-5.097.848	SGLAU_RS22190	WP_043504005.1	35,48	

Ident. (%): porcentaje de aminoácidos idénticos; *¹: sin locus asignado.

5.8.2. Compuestos desconocidos identificados por desreplicación en *S. glaucescens* GLA.O

Los extractos analizados por la Fundación MEDINA obtuvieron en muchas ocasiones un número mayor de compuestos desconocidos (no presentes en el DPN) producidos por *S. glaucescens* que compuestos conocidos.

Así, además de los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190 (Figura 57 y 65) y los compuestos mostrados en el apartado 5.7. de Resultados (Figura 66), producidos en ambos casos por el mutante Δ orf36g, en las diferentes desreplicaciones realizadas se han identificado otros compuestos desconocidos producidos, en este caso por la cepa silvestre en el medio R5A y SM10 (Tabla 41).



Tabla 41. *Compuestos desconocidos producidos por S. glaucescens detectados por desreplicación*

Fórmula molecular	m/z	Medio de cultivo	Solvente de extracción
C ₄₄ H ₅₅ NO ₈	325,2282	R5A líquido	Etanol
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	177,0552		
C ₁₅ H ₂₀ O ₄	265,1453		
C ₃₅ H ₇₂ N ₄ O ₈ P ₂	739,4908	R5A sólido	Butanol
C ₅₂ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₂	525,3524		
C ₅₅ H ₉₅ N ₁₁ O ₁₂	511,8659		
C ₂₈ H ₅₅ NO ₄	470,4209		
C ₂₉ H ₅₅ NO ₅	298,2377		
C ₁₅ H ₃₁ NO ₂	240,2335		
C ₁₅ H ₂₉ NO ₂	256,2276		
C ₁₆ H ₃₁ NO	254,2477		
C ₁₈ H ₃₃ NO	280,2634		
C ₁₈ H ₃₅ NO	282,2793		
C ₂₂ H ₂₆ O ₆	387,1804	SM10 líquido	Acetato de etilo 1 % ácido fórmico
C ₃₇ H ₄₀ N ₄ O ₆	654,3311		
C ₃₇ H ₄₀ N ₄ O ₅	638,3355		

5.9. Variaciones la producción de tetracenomicina C

A lo largo de este trabajo se ha cultivado la cepa silvestre de *S. glaucescens* en un gran número de medios de cultivo, en los que se ha observado la producción de tetracenomicina C. Sin embargo en los medios SM8, SM20, SM24, SM31 y SV2 no se ha detectado la producción de dicho compuesto. Además se ha visto que algunas de las cepas mutantes ensayadas mostraban variaciones en los niveles de producción de este compuesto, mientras que las cepas mutantes Δ orf14g, Δ orf23-24g, Δ orf36+orf29g, +orf29g, Eorf24g y Eorf33g no han mostrado variaciones significativas en la producción de este compuesto con respecto a la cepa silvestre, en las condiciones ensayadas. Así, las cepas Δ orf36g y Δ orf12g mostraban en algunos de los medios ensayados una significativa disminución en la producción de tetracenomicina C respecto a la cepa silvestre. En el caso de la cepa Δ orf12g, esta disminución en la producción de tetracenomicina C se pudo



observar en los medios SM1, SM3, SM7 y SM8, mientras que en la cepa $\Delta orf36g$ la disminución en la producción de este compuesto se dio en los medios MMs, Ent, SM7 y SM25 (Figura 72). Además de esto, se ha observado que la producción de este compuesto es afectada por la expresión del regulado AfsR, de la familia de reguladores SARP, codificado por la *orf11*. La cepa mutante con expresión constitutiva de la *orf11* ha mostrado variaciones significativas en la producción de tetracenomicina C en los medios de cultivo SM4, SM5, SM10, SM30 y SV2. Mientras que en los medios SM4, SM5, SM10 y SM30 esta cepa mostró aumentada la producción de tetracenomicina C con respecto a la cepa silvestre, en el medio SV2, donde la cepa silvestre no produce normalmente el compuesto, pudo identificarse un pico diferencial correspondiente a la tetracenomicina C en la cepa +*orf11g* (Figura 73). Sin embargo, en los medios SM8, SM20, SM24 y SM31, donde la cepa silvestre no produce tetracenomicina C, la cepa +*orf11g* con el regulador SARP expresado constitutivamente, no mostró producción del compuesto.

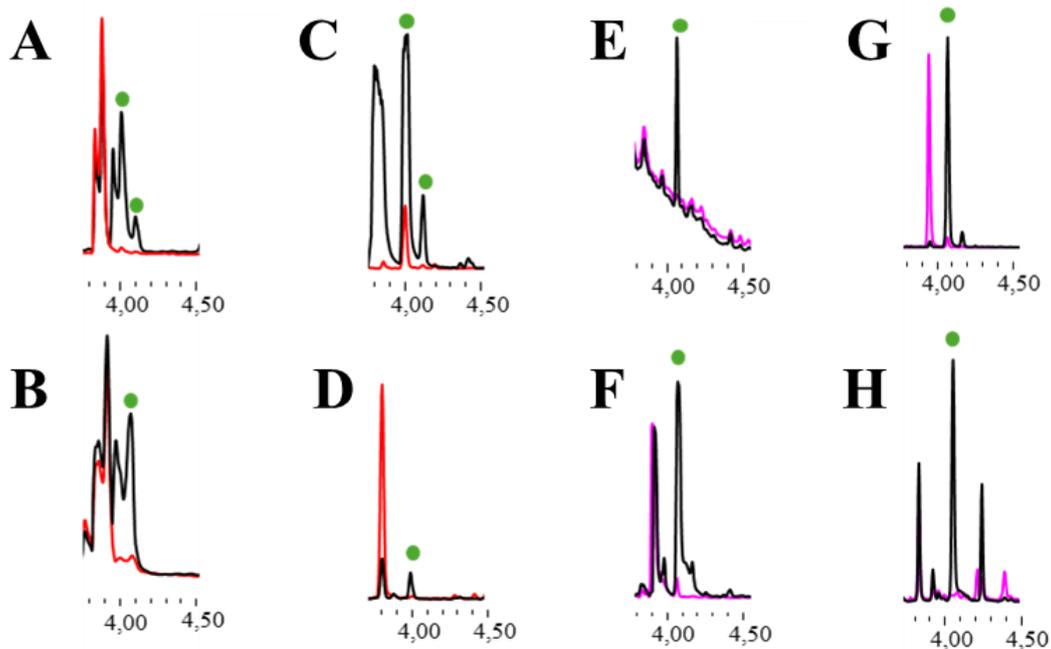


Figura 72. Comparación de perfiles metabólicos de la cepa *S. glaucescens* (negro), $\Delta orf2g$ (rojo) y $\Delta orf36g$ (morado). Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de extractos de acetato de etilo (C, D, G y H), de extractos de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico (A, B y F) y de extractos de butanol (E) de de cultivos incubados durante 5-7 días en **A:** SM8; **B:** SM3; **C:** SM7; **D:** SM1; **E:** SM25; **F:** SM7; **G:** MMs; **H:** Ent.

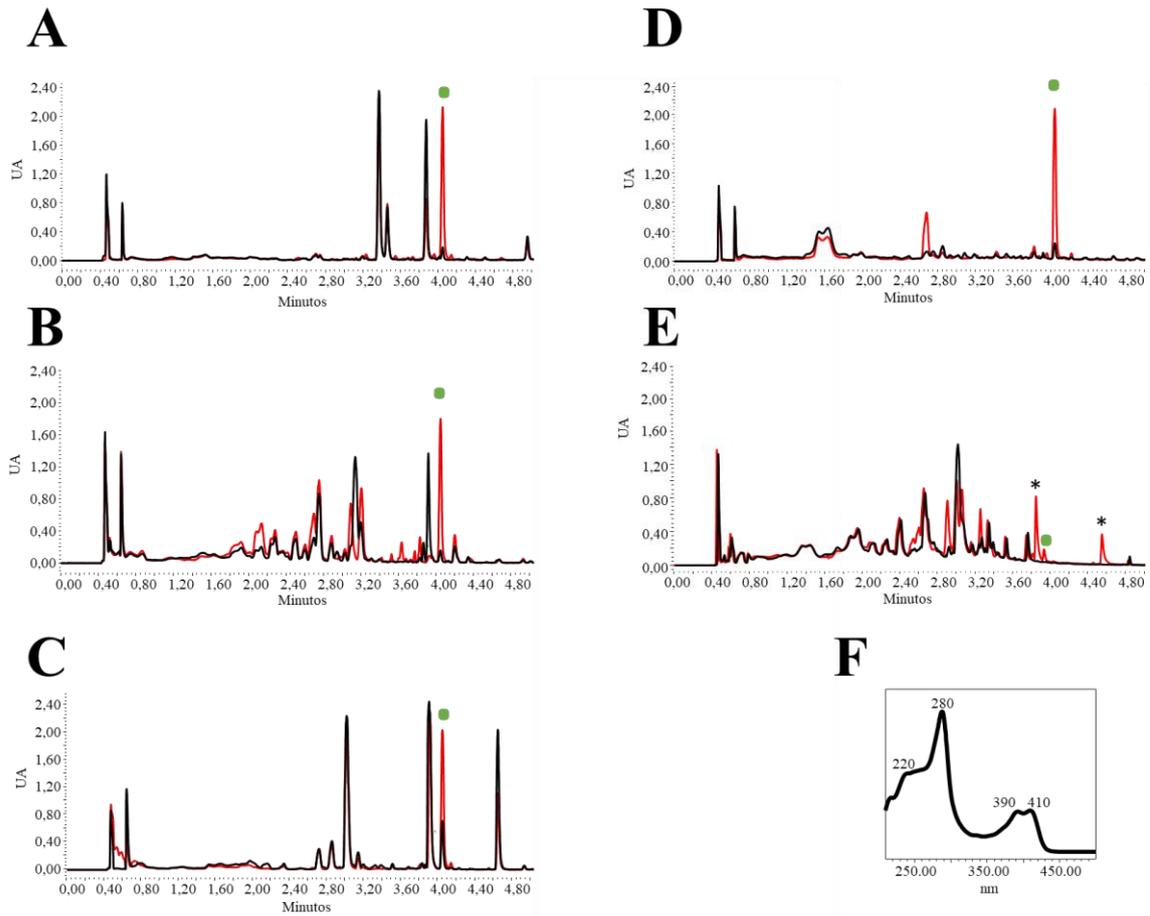


Figura 73. Comparación de perfiles metabólicos de la cepa *S. glaucescens* (negro) y la cepa +orf11g (rojo). Cromatogramas de UPLC (MaxPlot) de extractos de acetato de etilo (A y E) y de extractos de acetato de etilo con 1% de ácido fórmico (B, C y D) de cultivos incubados durante 6-7 días en **A:** SM4; **B:** SM5; **C:** SM10; **D:** SM30; **E:** SV2; **F:** Espectro de absorción del compuesto tetracenomicina C. Se marca con un punto verde el pico correspondiente a tetracenomicina C. *: compuestos de tipo coporfirina.





V. DISCUSIÓN





V. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se abordó la identificación de BGCs en cepas de *Streptomyces* que codificasen la biosíntesis de compuestos que contuvieran salicilato o 2-hidroxibenzoato en su molécula. Para ello se realizaron dos aproximaciones complementarias. Por un lado, se realizaron análisis BLASTP con la enzima SsfH que codifica una Salicilato Sintasa implicada en la ruta de biosíntesis de tetraciclina SF2575. Este análisis bioinformático se realizó con genomas de cepas depositadas de bases de datos públicas y de la colección CS (Malmierca *et al.*, 2018). Así se identificaron seis genes codificantes de SsfH en seis cepas de *Streptomyces*: CS113, CS159, CS123, *S. lividans*, *S. glaucescens* y *S. olivaceus*. Por otro lado se diseñaron oligonucleótidos a partir de zonas conservadas en las Salicilatos Sintetas. El estudio de las secuencias de enzimas Salicilato Sintetas permitió identificar siete zonas conservadas en estas proteínas. Cuando se diseñaron oligonucleótidos en las secuencias nucleotídicas correspondientes a estas zonas conservadas se obtuvieron amplificaciones que se identificaron como genes tipo *ssfH*, al utilizar oligonucleótidos correspondientes a los motivos AYGWAAFE, PLAGTRAL, DAALVLR y GRTWLRAGAG. Estos cuatro motivos se encuentran dentro del dominio conservado para la síntesis de salicilato, estando tres de ellos (PLAGTRAL, DAALVLR y GRTWLRAGAG) localizados en el dominio conservado de unión para corismato (Dosselaere *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2023). Esta estrategia permitió identificar tres genes que codifican la enzima SsfH en tres cepas de *Streptomyces*, *Streptomyces sp.* NTK937, *Streptomyces olivaceus* Tü 2352 y *Streptomyces* CS123. El total de genes codificantes de SsfH identificados fueron nueve, dos en la cepa CS123, dos en la cepa *S. olivaceus* y uno en cada una de las cinco cepas restantes (CS113, CS159, *S. lividans*, *S. glaucescens* y *Streptomyces sp.* NTK937).

Los genomas de estas cinco cepas se analizaron bioinformáticamente con el programa antiSMASH (Blin *et al.*, 2023), se puso de manifiesto que los genes *ssfH* identificados se localizaban en cuatro BGCs diferentes (Tabla 22, 23, 24, 25, 28 y 33). El gen codificante de SsfH identificado en NTK937 formaba parte del BGC 17 de caboxamicina descrito en dicha cepa (Losada *et al.*, 2017) (Tabla 28 y 29, Figura 31). Dos más de los genes identificados, uno en el BGC 12 de *S. olivaceus* y otro en el BGC 4 de CS123, formaban parte de un BGC homólogo al de micemicinas descrito en Inahashi *et al.*, 2017 (Tabla 25 y 31). Estos BGCs presentan 21 de los 23 genes descritos por Inahashi



y colaboradores, mostrando la misma organización génica. Además, los productos codificados por estos genes eran altamente similares (80% o superior de aminoácidos idénticos) con los del BGC de micemicinas descrito por Inahashi y colaboradores (Tabla 27 y 31 y Figura 30 y 34). Los dos genes restantes que no poseían los BGCs de las cepas *S. olivaceus* y CS123 no han sido descritos como genes necesarios para la actividad del BGC de micemicinas y se catalogan como proteínas hipotéticas según los estudios de BLASTP. Por lo que ambos BGCs identificados en *S. olivaceus* y CS123 muestran todas las actividades necesarias para generar el compuesto micemicina. Cuatro más de los genes codificantes de SsfH identificados formaban parte de BGCs homólogos al BGC de coelibactina (Bentley *et al.*, 2002). Así los antiSMASH de las cepas CS113, CS159, *S. lividans* y *S. olivaceus* mostraban este BGC (Tabla 22, 23, 24, 25). Los productos codificados por los genes de estos BGCs se encontraban altamente conservados en todas las cepas. En ningún caso se identificó la presencia o ausencia de genes con respecto al BGC de la cepa modelo *S. coelicolor* (Tabla 26 y Figura 29). Además de estos genes codificantes de SsfH se había detectado un segundo gen en CS123, en el *contig* 362 que contenía seis genes (*c1-c6*), donde el gen *c1* era el codificante de SsfH. El estudio por antiSMASH no pudo predecir ningún BGC para este *contig* por lo que se realizó un estudio de zonas conservadas con genomas de otros *Streptomyces*. Gracias a este estudio se identificaron ocho cepas de *Streptomyces* que permitieron asociar el BGC de coelibactina con los genes del *contig* 362, y en el que la SsfH codificada por el gen *c1* tendría la función de sintetizar la unidad iniciadora de la síntesis del compuesto coelibactina (Tabla 32 y Figura 37). Los estudios de homologías revelaron que los genes de *c1* a *c5* presentaban alta conservación en las cepas de *Streptomyces* estudiadas, entre ellas CS123, lo que podría sugerir que dichos genes forman parte del BGC de coelibactina en esta cepa (Figura 37), aunque dichos genes no se presenten en el BGC de la cepa modelo *S. coelicolor*. De ser así, estos *Streptomyces* podrían sintetizar el compuesto coelibactina con modificaciones debido a las actividades de los genes presentes aguas abajo del *c1*. Entre estos genes se encuentra el gen *c2*, que codifica una descarboxilasa; el gen *c4*, que codifica una aminotransferasa y el gen *c5*, que codifica una metiltransferasa (Tabla 32). Todas estas son actividades que podrían dar modificaciones en la molécula modelo coelibactina descrita para el BGC de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) (Figura 74). Además, se observó que aguas abajo de estos genes hay otro grupo de genes que se conservaba. Según la cepa estudiada se diferencia entre los bloques de genes A o B,



(Figura 37). Así en *Streptomyces sp.* B146, *Streptomyces sp.* CT1 - 17 26, *Streptomyces sp.* STCH 565 A y *Streptomyces sp.* VN1 se identificó el bloque de genes A que también se encontró en el *contig* 477 de CS123, mientras que en *Streptomyces olivaceus* NRRL B-3009, *Streptomyces sp.* CB09030 y *Streptomyces sp.* A13 se identificó el bloque de genes B (Figura 37). Ambos bloques de genes presentan genes de biosíntesis adicional que se conservan. En el bloque de genes A los genes *c11* y *c12* codifican una Treonina Deshidrogenasa y una Glicina Acetiltransferasa, respectivamente. La primera actividad podría afectar a la treonina que es activada por una de las NRPS de la ruta. Mientras que la segunda actividad, aunque afecta a un aminoácido que no se involucra en la síntesis de coelibactina, podría ser añadido posteriormente gracias a la acción de esta acetiltransferasa. Por otro lado, en el bloque de genes B los genes *c6'* y *c8'* codifican una Oxigenasa y una Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD(P), respectivamente. Es reseñable que esta Alcohol Deshidrogenasa codificada por el gen *c8'* presenta un dominio cuya especificidad de sustrato es para alcoholes aromáticos (Landete *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 1993), como lo sería el salicilato presente en la molécula de coelibactina. Por lo tanto, ambas son actividades que podrían modificar la molécula de coelibactina una vez sintetiza (Figura 74). Además de estos genes de biosíntesis, ambos bloques de genes presentan genes reguladores que podrían controlar la expresión del BGC. Así en el bloque de genes A, el gen *c13* codifica un regulador tipo LysR y en el bloque de genes B los genes *c7'* y *c10'* codifican reguladores tipo TetR. Ambos tipos de reguladores se han caracterizado como reguladores negativos de la transcripción generalmente (Xia *et al.*, 2020), y que por tanto podrían estar reprimiendo la expresión de estos BGCs tipo coelibactina.

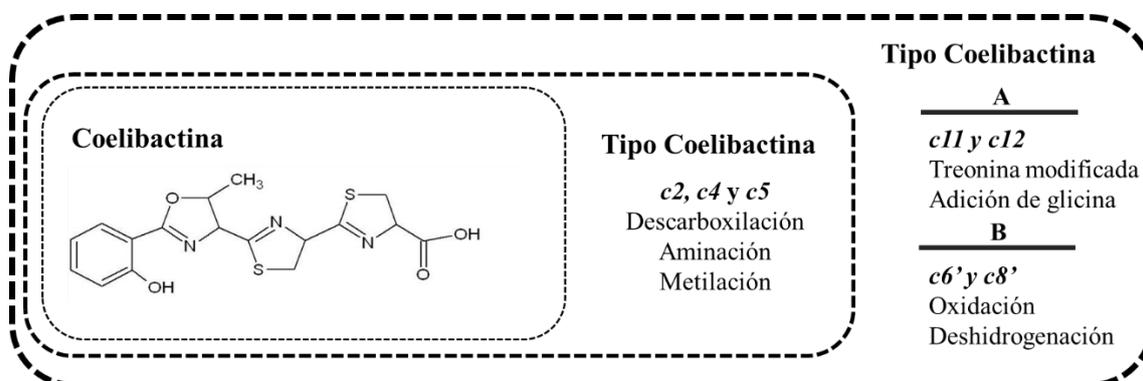


Figura 74. Modificación de la coelibactina según los genes conservados de la Figura 37 en las cepas de *Streptomyces*.



La cepa CS123 que contiene dos BGCs (micemicinas y coelibactina) se estudió en mayor profundidad para intentar asociar estos BGCs con los productos codificados por los mismos. Así, se realizó un mutante por disrupción en el gen *cs_ssfH-1* (Figura 32), gen que codifica la SsfH del BGC de micemicinas. Esta SsfH es responsable de la síntesis del salicilato utilizado como unidad iniciadora en la síntesis de micemicinas (Inahashi *et al.*, 2017). Por tanto, la cepa mutante en dicho gen debería ser incapaz de producir micemicinas. Sin embargo, esto no pudo ser comprobado ya que en los medios de cultivo ensayados (R5A, TSB, SM1, SM7, SM10, SM20, SM25 y SM30), y con los solventes utilizados para la extracción (acetato de etilo, acetato de etilo con 1 % de ácido fórmico y butanol), no se detectaron las micemicinas en la cepa silvestre. Esto sugiere que el BGC de micemicina en CS123 se encuentra silenciado o se expresa poco en dichas condiciones. Algunos estudios muestran que la producción de estas micemicinas se han observado tras la manipulación genética de reguladores negativos o la expresión heteróloga del BGC (Inahashi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018). Por otro lado, también se generó un mutante en genes aguas abajo del gen *cs_ssfH-2* que posiblemente pertenecían a un BGC de coelibactina. En este caso, tampoco se ha podido asociar este BGC con producción de coelibactina, ya que la cepa silvestre no producía dicho compuesto en las condiciones ensayadas. El BGC de coelibactina se identificó por primera vez en *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), y se encuentra altamente conservado tanto en las cepas estudiadas en este trabajo como en otras cepas de *Streptomyces*. Sin embargo, hasta la fecha, este compuesto nunca ha sido detectado en *Streptomyces* u en otro microorganismo. Tanto la estructura química de la coelibactina como su ruta de biosíntesis se basan en predicciones bioinformáticas, a pesar de haberse manipulado genéticamente su *cluster* para identificar la expresión del BGC, y haberse verificando su expresión (Kallifidas *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012). Recientemente, se ha detectado la producción del sideróforo sorangibactina, descrito como tipo-coelibactina, gracias a la expresión heteróloga de un BGC de *Sorangineae* MSr11367 en *Myxococcus* DK1622. Dicho compuesto posee una estructura similar a la propuesta para coelibactina (Gao *et al.*, 2023). Las condiciones de producción de este tipo de metabolitos secundarios son muy estricta y selectivas por lo que suelen denominarse “metabolitos del estrés”, puesto que ayudan a combatir situaciones de estrés físico, químico o biológico en la naturaleza, lo que dificulta su producción en el laboratorio (Bentley *et al.*, 2002).



Finalmente, el último gen identificado responsable de codificar una SsfH se localizó en la cepa *S. glaucescens*. El estudio por antiSMASH del genoma de dicha cepa mostró que la *orf12* que codifica la SsfH se localizaba en el BGC 8, de 108.800 pb y con 74 genes (Tabla 33 y Figura 38). El BGC 8 presentaba un 73% de homología con el BGC de biosíntesis de tiazostatina, watasemicina A y B, 2-hidroxifeniltiazolina, enantiopiochelina y isopiochelina de *S. venezuelae* (Inahashi *et al.*, 2017). Este BGC 8 contenía además genes de biosíntesis diferentes a los presentes en el BGC antes mencionado, por lo que se esperaba que codificara la biosíntesis de un compuesto diferente. La *orf12* pudo confirmarse como responsable de codificar la enzima SsfH al eliminarlo, generando el mutante $\Delta orf12g$ (Figura 41). Dicho mutante era incapaz de producir salicilato en los medios SM10 y SM20, donde la cepa silvestre sí lo produce (Figura 42), lo que también indicó que en dichos medios la *orf12* se expresaba y sugería que también lo hacían el resto de los genes del *cluster*. Sin embargo, en dicho mutante, no se observó la desaparición de ningún otro compuesto que pudiera relacionarse con el BGC 8.

El estudio de homologías de los productos codificados por los genes del BGC 8 de *S. glaucescens* mostró la presencia de diferentes bloques de genes que sugieren la existencia de dos *cluster*, *cluster 1* y *cluster 2*. E *cluster 1* incluiría los genes *orf13* a *orf43* (y posiblemente las *orf11* y *orf12*) y el *cluster 2* de la *orf45* hasta la *orf60* (Figura 40 y Tabla 38).

En el *cluster 1* existen siete genes relacionados con NRPS (*orf14*, *orf18*, *orf22*, *orf23*, *orf24*, *orf27* y *orf34*), de los cuales cinco se conservan en el genoma de las diferentes cepas analizadas (Figura 40). Canónicamente la organización de una NRPS es A-PCP-(C-A-CPC)*n*-TE además de los posibles dominios accesorios extras en sus módulos (Bloudoff, y Schmeing, 2017). Sin embargo algunas de las NRPS del *cluster 1* no cumplen con estos cánones, la Orf18, Orf24 y Orf34 (Figura 39). Por un lado las NRPS que son más similares al canon descrito son aquellas codificadas por las *orf14*, *orf22* y *orf23* y que contienen varios dominios. La Orf14 posee un dominio C, un dominio A, un dominio PCP y un dominio TE, la Orf 23 tiene un dominio A, dos PCP y un dominio de condensación Cy (Bloudoff y Schmeing, 2017); finalmente, la NRPS de la Orf22 presenta un PCP, un dominio A, uno Cy y un dominio TE que libera la molécula sintetizada (Tabla 37 y Figura 39). En las Orf22 y Orf23 para que los dominios Cy puedan realizar la



ciclación del aminoácido incorporado se requiere que dicho aminoácido sea cisteína, serina o treonina dando una tiazolina o una oxazolina (Duerfahrt *et al.*, 2004). En este caso los *binding pockets* de los dominios A de las Orf22 y Orf23 son DLYNLSLIWK y DLWNLSLIWK, respectivamente (Tabla 36). Un análisis bioinformático los *binding pockets* de las NRPS SVEN_0517 y SVEN_0512 del BGC de watasemicina en *S. venezuelae*, permitió ver que eran idénticos a los de las Orf22 y Orf23. Se ha demostrado que los dominios A de las NRPS SVEN_0517 y SVEN_0512 reconocen una cisteína, (Inahashi *et al.*, 2017), por lo que es de suponer que los dominios A de las Orf22 y Orf23 reconocerían una cisteína que sería ciclada por el dominio Cy dando una tiazolina. El *binding pocket* del dominio A de la Orf14 (DFWSVGMVHK), reconocería una treonina según los análisis bioinformáticos realizados y las secuencias de aminoácidos consenso consultadas bibliográficamente (Khayatt *et al.*, 2013; Stachelhaus *et al.*, 1999) (Tabla 36). Por otro lado, entre las NRPS que se salen de la arquitectura canónica A-PCP-(C-A-CPC)n-TE, en el *cluster* 1 se encuentran la Orf18, la Orf24 y la Orf34. Estas NRPS son denominadas *stand-alone NRPS*, dichas NRPS consisten en dominios separados que actúan por sí mismo o pueden interactuar con otras NRPS (Süssmuth y Mainz *et al.*, 2017). Así la Orf18, una *stand-alone NRPS* con un único dominio TE, actuaría en trans liberando cadenas peptídicas de otra NRPS que sintetiza el péptido (Süssmuth y Mainz *et al.*, 2017); la Orf34, una *stand-alone NRPS* de un único dominio A, y la Orf24, una *stand-alone NRPS* con un didominio A-PCP (Tabla 37 y Figura 39). Para las NRPS de las Orf24 y Orf34 los análisis de los *binding pocket* de los dominios A muestran mayor discordancia con respecto a secuencias consenso de reconocimiento de aminoácidos (Khayatt *et al.*, 2013; Stachelhaus *et al.*, 1999) (Tabla 36). Según los programas de análisis, (Bachmann y Ravel, 2019; Blin *et al.*, 2023; Skinnider *et al.* 2015), el *binding pocket* de la Orf34 (aLPtQGVIK) podría reconocer una molécula de 2,3-dihidroxibenzoato o de salicilato. Ambos metabolitos son producidos a partir de corismato por acción de diferentes enzimas (Walsh *et al.*, 2012). La biosíntesis de 2,3-dihidroxibenzoato requiere de tres actividades, primero la Isocorismato Sintasa transforma el corismato en isocorismato, al que la Isocorismato Hidrolasa elimina la cola del piruvato, finalmente la 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato Deshidrogenasa realiza el doble enlace del anillo bencénico (Figura 75). Sin embargo, la enzima Isocorismato Sintasa y la 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato Deshidrogenasa no tienen homólogos en el genoma de *S. glaucescens*. Por otro lado, para la Isocorismato Hidrolasa sí se encuentra una proteína



homóloga con 57% de aminoácidos idénticos (WP_04502463.1). Sin embargo, la ausencia de las otras actividades, necesarias para sintetizar 2,3-dihidroxibenzoato, sugiere que el *binding pocket* de la Orf34 únicamente podría utilizar salicilato para el cual sí existe la enzima necesaria para su síntesis en *S. glaucescens*, la Orf12 del BGC 8. Además, las *stand-alone NRPS* con un dominio A, como lo es la Orf34, y en particular cuando el sustrato activado por dicho dominio es salicilato o 2,3-dihidroxibenzoato, como sucede durante la síntesis de sideróforos, se ha descrito en multitud de ocasiones que este sustrato activado por el dominio A es cargado posteriormente a un PCP de otra NRPS (Ho *et al.*, 2018; Süßmuth y Mainz *et al.*, 2017).

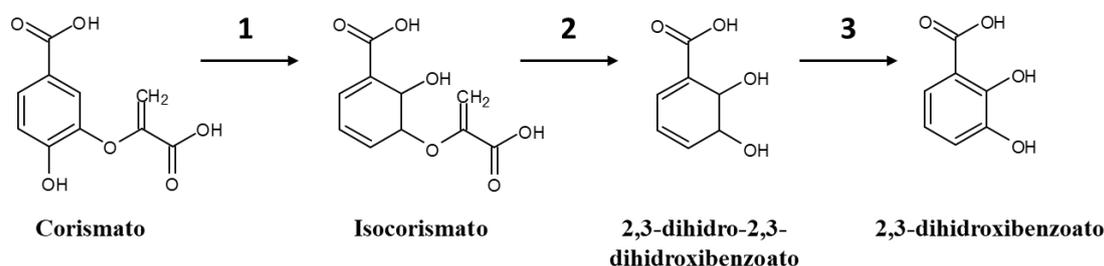


Figura 75. Biosíntesis de 2,3-dihidroxibenzoato. **1:** Isocorismato Sintasa; **2:** Isocorismato Hidrolasa; **3:** 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato Deshidrogenasa.

Finalmente, el *binding pocket* de la Orf24 (DAWvTTaVGK), (Tabla 36), presentaba baja homología con el *binding pocket* de fenilalanina y el de triptófano, que son los que proponen los análisis bioinformáticos. Sin embargo una búsqueda bibliográfica reveló que presentaba mayor similitud con el *binding pocket* de quinurenina (DAWTTTGVGK) (Miao *et al.*, 2005). Esto sumado a la presencia de la *orf25* que codifica una Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), la primera enzima necesaria para transformar el triptófano en quinurenina (Davis y Liu, 2015), parece apoyar la idea de que la Orf24 reconozca quinurenina o su precursor N-formilquinuerina. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que algunas *stand-alone NRPS* con didominio A-PCP, como lo es la Orf24, se involucran frecuentemente en la generación de *building blocks* poco frecuentes mediante la modificación del aminoácido seleccionado por parte de otras enzimas y posteriormente lo añaden a la cadena peptídica en formación en otra NRPS (Duban *et al.*, 2022; García-Gutiérrez *et al.*, 2024; Walsh *et al.*, 2012). Por lo que no es descartable que la modificación del triptófano se realice en la propia Orf24. En cualquiera de los casos, las actividades necesarias para ello serían las siguientes. En primer lugar y



antes de transformar el triptófano en quinurenina, la *orf30* quien codifica una Triptófano Halogenasa, haría posible que el triptófano se halogenara y posteriormente fuera transformado en N-formil-quinurenina halogenada por una TDO codificada por la *orf25*. Este mismo proceso ha sido descrito previamente en la síntesis de micemicina C, donde un triptófano es halogenado por una Triptófano Halogenasa (MymM) y transformado en N-formil-quinurenina halogenada por una TDO (MymC) (Song *et al.*, 2018) (Figura 76). La Triptófano Halogenasa MymM que realiza esta actividad en la síntesis de micemicina C comparte un 57% de aminoácidos idénticos con la Orf30. Además ambas proteínas presentan idénticos dominios en su secuencia, por lo que es posible que en ambos casos se realice la halogenación en el mismo carbono del triptófano.

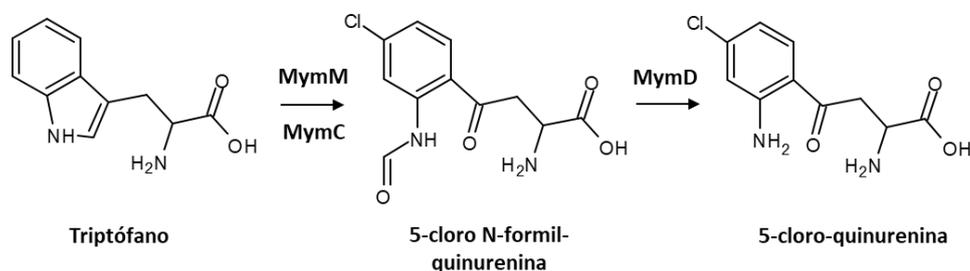


Figura 76. Síntesis de 5-cloro-quinurenina para la síntesis de micemicina C en *S. venezuela*. Modificado de Song *et al.*, (2018). **MymM**: Triptófano Halogenasa; **MymC**: Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO); **MymD**: Amidohidrolasa.

Posteriormente para que la N-formil-quinurenina pueda pasar a quinurenina debe perder el aldehído residual, esta actividad la realizaría una quinurenina formamidasa (KF) (Zummo *et al.*, 2012). En el caso de la micemicina C esta acción la hace una amidohidrolasa (MymD) (Song *et al.*, 2018) (Figura 76). En el de la síntesis de daptomicina en *S. roseosporus* donde una quinurenina es utilizada como *building block*, se desconoce que enzima realiza esta acción, lo que parece indicar que el gen responsable se encuentra fuera del BGC (Miao *et al.*, 2005), mientras que en *S. coelicolor* se ha demostrado experimentalmente que la proteína SCO3644, con un dominio esterasa/lipasa, actuaría como una KF (Zummo *et al.*, 2012). En *S. glaucescens* existe una proteína (WP_043502748.1) con 83% de aminoácidos idénticos a SCO3644 y con la misma descripción en sus dominios, esta proteína podría ser la responsable de la actividad KF por la cual la N-formil-quinurenina halogenada es transformada en quinurenina halogenada. Esta quinurenina clorada podría ser activada por el dominio A de la NRPS de la Orf24 y se uniría al PCP de esa misma NRPS formando un aminoacil tioéster. La



síntesis podría continuar en la Orf14 donde se activaría una treonina que se unirá al PCP de esta NRPS. Posteriormente y gracias al dominio C de la Orf14, podría realizarse el enlace peptídico entre la quinurenina clorada y la treonina, este dipéptido sería liberado por el TE de la Orf14. Mientras tanto se realizaría la síntesis de otro compuesto que involucraría las Orf34, Orf23 y Orf22. En primer lugar el salicilato sintetizado por la Orf12 sería activado por la Orf34 y se uniría formando un aminoacil tioéster al primer PCP de la Orf23, como ha sido ampliamente descrito para este *building block* cuando es activado por una *stand-alone NRPS* (Ho *et al.*, 2018). En la Orf23 continuaría la síntesis del compuesto, reconociendo una cisteína por el dominio A de la Orf23 que activaría dando un aminoacil-AMP que se uniría al PCP 2 dando el aminoacil tioéster. Con el dominio Cy de la Orf23 esta cisteína sería ciclada dando una tiazolina y haría la condensación dando un enlace peptídico entre ella y el salicilato del PCP 1. Después, en la NRPS de la Orf22 el dominio A activaría una segunda cisteína, esta se uniría al Ppant del PCP de esa misma NRPS como un aminoacil tioéster y elongaría la molécula al unir la cadena en formación con esta segunda cisteína, dando una segunda tiazolina ya que el dominio de condensación de la NRPS de la Orf22 es un Cy también. Finalmente, el dominio TE de la Orf22, realizaría la liberación del compuesto final. Con respecto a la liberación del péptido existen varios tipos, aunque es bastante común que el péptido liberado se cicle durante dicho proceso, también podría ser liberado linealmente mediante hidrólisis (Adrover-Castellano *et al.*, 2021; Süßmuth y Mainz *et al.*, 2017). Incluso se ha descrito una NRPS que contiene varios dominios TE consecutivos y según cual de ellos se active la molécula de lisobactina liberada varía entre lineal o cíclica (Hou *et al.* 2011). También es posible que el proceso de síntesis en las NRPS sea iterativo, en consecuencia los diferentes péptidos formados quedan enlazados a un PCP o al propio TE que actuarían como “*waiting room/position*” y se enlazarían entre sí para finalmente liberar un único péptido cíclico que consiste en la repetición de un péptido menor, como sucede en la síntesis de enterobactina (Shaw-Reid *et al.*, 1999; Süßmuth y Mainz *et al.*, 2017). Y recientemente se ha descrito un mecanismo por el cual se realiza la liberación gracias al ataque del péptido en el TE por el grupo amino de otro aminoácido (Gao *et al.*, 2023). Este último mecanismo permitiría que el dipéptido formado en las Orf24 y Orf14, o un intermediario liberado por acción del TE de la Orf18, fuera el responsable de la liberación del compuesto sintetizado gracias a las Orf34, Orf23 y Orf22. De esta forma se generaría la unión entre ambos compuestos sintetizados por separado. Sin embargo, esta no sería la



única alternativa para que ambos compuestos interaccionaran, pues también ha sido descrito que tras la liberación por hidrólisis de un aminoácido no proteinogénico este puede incorporarse al compuesto final (Walsh *et al.*, 2013). Finalmente, el *cluster* 1 presenta una oxidorreductasa que es codificada por la *orf21*, que se describe como una oxidorreductasa de tiazoles según el estudio de dominios por BLASTP, por lo que es presumible la pérdida del doble enlace en uno o ambos anillos de tiazolina. Por todo ello se propone la ruta de biosíntesis mostrada en la Figura 77 para el *cluster* 1 del BGC 8.

En cualquier caso predecir la ruta de síntesis de un BGC sin obtener una estructura previamente en el laboratorio es complejo, más cuando las NRPS involucradas se salen de los cánones. La obtención de estructuras parciales o completas ayudan a la hora de realizar una predicción de la ruta. Así existen estudios en los que la predicción para una ruta mostró posteriormente diferencias significativas cuando se pudo rehacer en base a la estructura del compuesto codificado por dicha ruta que había sido obtención finalmente (García-Gutiérrez, 2022; García-Gutiérrez *et al.*, 2024).

En el estudio de homologías para el *cluster* 1 además de la cepa *S. glaucescens* las cepas *Streptomyces sp.* SM18, *S. daqingensis* y *S. pratensis* presentan la mayoría de los genes necesarios para la ruta de biosíntesis propuesta de la Figura 77, a excepción de la *orf14* que es única de *S. glaucescens*. Sin embargo, en el caso de la cepa restante *S. paludis* los genes responsables de la síntesis de la quinurenina y de la cloración del triptófano no se encuentran presentes, por lo que la ruta de biosíntesis de esta cepa carecería de la quinurenina clorada, aunque también es la única cepa donde los genes *orf22*, *orf23* y *orf24* no están contiguos (Figura 40). En todos los casos las cepas muestran un gen homólogo para el TE codificado por la *orf18* que es un TE tipo II que actuaría en trans. Este TE podría actuar liberando cadenas peptídicas aberrantes, ya que estos TE muestran menos especificidad de sustrato que otros (Yeh *et al.*, 2004), o como se propone también podría permitir la liberación de intermediarios durante la síntesis en las NRPS (Schultz *et al.*, 2008).

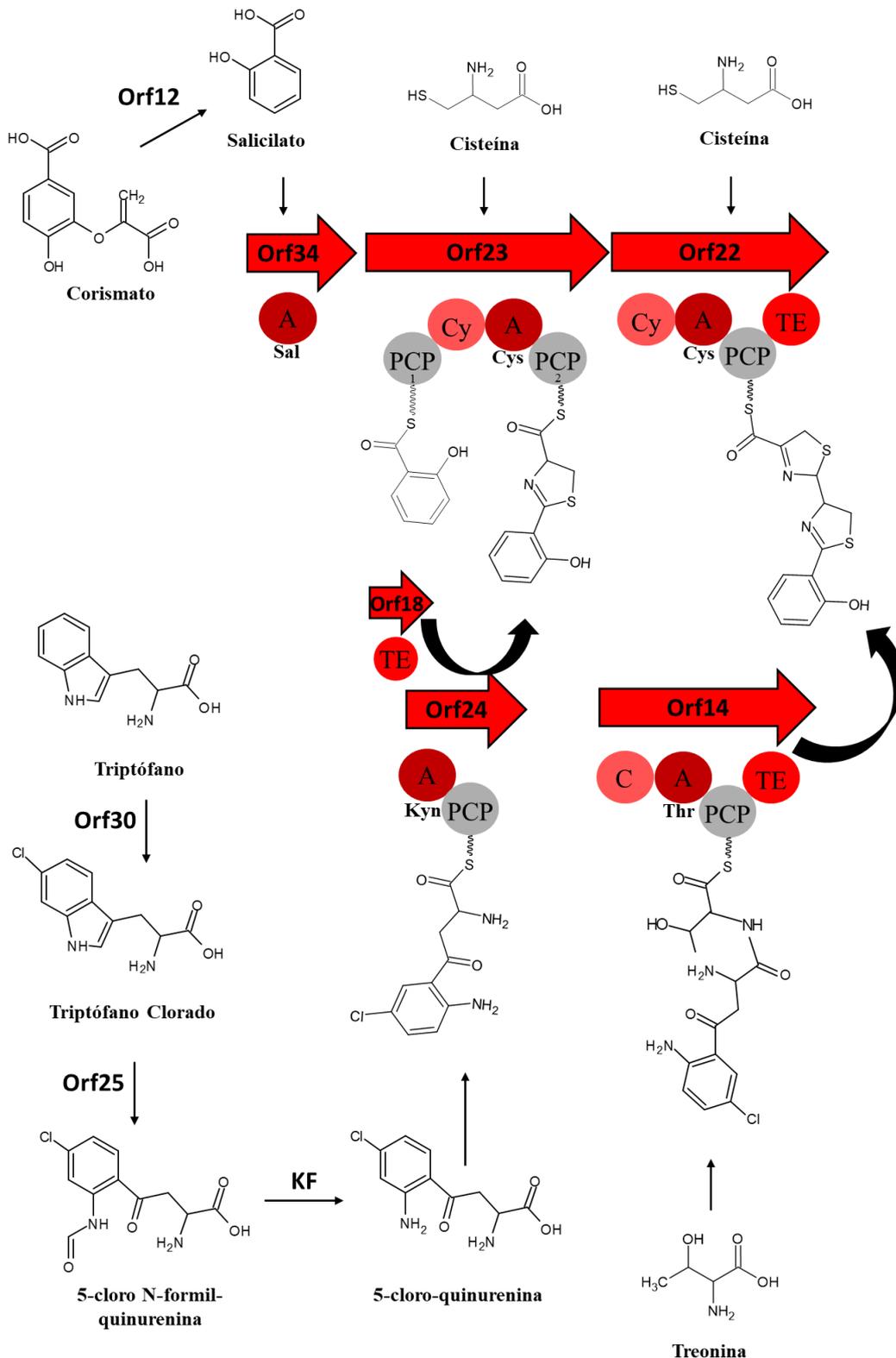


Figura 77. Propuesta de ruta de biosíntesis codificada por el *cluster* 1 del BGC 8. **A:** dominio de adenilación; **Cy:** dominio de condensación tipo ciclación; **PCP:** dominio de tiolación; **cMT:** dominio de metilación; **TE:** tioesterasa; **Sal:** salicilato; **Cys:** cisteína; **Thr:** treonina; **KF:** actividad quinurenina formamidasas; **Orf12:** Salicilato Sintasa; **Orf25:** Triptófano 2,3-dioxigenasa; **Orf30:** Triptófano Halogenasa; **Orf18, 14, 22, 23, 24 y 34:** NRPS.



Para intentar identificar el compuesto codificado por el *cluster* 1 se generaron mutantes en las *orf12*, *orf14* y en las *orf23* a *orf24* (Figura 41, 43 y 45). En el caso del mutante $\Delta orf12g$, desaparecía un compuesto que se detectaba en la cepa silvestre, y que corresponde al ácido salicílico. Esto indicaba que al menos la *orf12* se expresaba en la cepa silvestre. En el mutante $\Delta orf14g$ no se detectó la desaparición de ningún compuesto en ninguna de las condiciones ensayadas. Solo cuando el mutante $\Delta orf23-24g$, que tenía eliminadas las *orf23* y *orf24*, se cultivo en R5A sólido y posteriormente se extrajo con butanol, se detectaron picos diferenciales que mostraba la cepa silvestre pero no el mutante $\Delta orf23-24g$ (Figura 47 y 48 y Tabla 39). Sin embargo, los seis compuestos diferenciales desreplicados poseían fórmulas moleculares que no coinciden con la propuesta de la Figura 77, puesto que el número de nitrógenos en ellos es inferior al esperado. Incluso si el TE II codificado por la *orf18* liberara la molécula en algún paso intermedio de la formación seguiría sin haber una coincidencia con alguna de las fórmulas moleculares propuestas para los picos D02-D07 (Tabla 39). El no poder detectar compuestos diferenciales que puedan ser relacionados con el *cluster* 1 podría ser debido a que las condiciones de cultivo no son las idóneas para su expresión, o que los compuestos no se produzcan en una cantidad suficiente como para ser detectados. Por ello, también se generaron dos cepas a las que se les insertaron promotores constitutivos delante de posibles unidades de transcripción (*Eorf24g* y *Eorf33g*), con la intención de activar o aumentar la expresión del grupo de genes que involucraban a esas unidades transcripcionales (Figura 49 y 51). Tampoco en estos casos se detectaron compuestos diferenciales con respecto a la cepa silvestre o la cepa $\Delta orf23-24g$. Esto puede deberse a que aunque se expresen ciertos genes de la ruta, otros genes esenciales para la producción del compuesto final podrían no estar haciéndolo, ya que podrían pertenecer a otras unidades de transcripción que no se estén expresando en esas condiciones. Además, se ha descrito que en *Streptomyces* existen genes que aunque se transcriban en la misma dirección su transcripción se produce a partir de distintos promotores (Bibb, 1996). Por otro lado, los análisis de la organización de los genes del BGC muestran que aparentemente podría haber más de una unidad de transcripción (Figura 40). Por esta razón, se optó por realizar manipulaciones en algunos reguladores del *cluster* 1 para intentar activarlo, ya que aparentemente se encontraba silenciado o se expresaba poco. Se generó un mutante en la *orf36*, que codificaba un regulador TetR (figura 56), y una cepa que sobreexpresaba la *orf29*, que codificaba un regulador LuxR (Figura 59). En el caso



de la cepa con el regulador TetR mutado, $\Delta orf36g$, solo se observaron picos diferenciales que no mostraba la cepa silvestre cuando se cultivaba en R5A y era extraído con acetato de etilo (picos de 1 a 4) o etanol (picos de 5 a 7) (Figura 57 y 58). En la cepa que sobreexpresaba el regulador LuxR se identificaron los picos de 2 a 4 además de cuatro picos más (8-11) (Figura 60). Además, la comparación de los perfiles metabólicos producidos por las diferentes cepas ($\Delta orf36g$, $+orf29g$ y $\Delta orf36+orf29g$), puso de manifiesto que la expresión del regulador codificado por la *orf29* era suficiente para inducir la producción de estos siete compuestos ya que el mutante $\Delta orf36+orf29g$ mostraba el mismo perfil metabólico que $+orf29g$ (Figura 63). El compuesto 1 fue desreplicado como ácido indol- β -carboxílico siendo el único compuesto con un espectro de absorción diferente al del resto (Figura 64). Los compuestos de 2 a 7 no pudieron ser identificados por desreplicación lo que sugería su novedad. Debido a su espectro y fórmula molecular sugerían pertenecer a la misma familia de compuestos (Figura 65 y 66). La purificación y posterior caracterización química de los compuestos 2 (UO-187), 3 (UO-188) y 4 (UO-190), mostró que los compuestos UO-188 y UO-190 eran isómeros y el UO-187 difería de los otros dos por la ausencia de un metileno. Dada su novedad, se realizó el ensayo de la actividad biológica del compuesto UO190 que sin embargo no mostró actividad biológica frente a los microorganismos ensayados. El análisis de las estructuras obtenidas para los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190 mostró que estos compuestos no podían ser producidos por el *cluster* 1, y que por tanto la inactivación del regulador TetR, codificado por la *orf36*, y/o la activación del regulador LuxR, codificado por la *orf29*, afectaban a otra zona génica. Estas estructuras no parecen indicar que sean producto de la condensación en NRPS puesto que no se identifican aminoácidos en sus estructuras. Tampoco parecen ser sintetizados por PKS o al menos no sin haber perdido el grupo carboxilo del policétido. Las cadenas carbonadas de estos compuestos se asemejan más a compuestos de tipo terpenoides no cíclicos. Sin embargo, al analizar los BGCs de *S. glaucescens* (Tabla 33), encontramos que la mayoría de los BGCs de terpenos (BGC 5, 14 y 19) están identificados por su homología del 100% con BGCs ya conocidos, por producir compuestos ya descritos, isorenierateno, albaflavona y geosmina, respectivamente, y cuyas estructuras no se relacionan con los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190. Mientras que los otros dos BGC tipo terpenos que presentan menor homología o ninguna homología con BGCs de terpenos conocidos (BGC 22 y 25), no presentan genes que codifiquen enzimas con actividades que puedan explicar la



formación de los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190 y sí genes que, en última instancia, serían responsables de la ciclación del compuesto terpenoide (Escualeno-Hopeno Ciclasa y Terpeno Ciclasa). Sabiendo que los reguladores tipo LuxR no son reguladores globales sino específicos de ruta (PSRs de *pathway-specific regulators*) y por tanto generalmente están cerca de los genes a los que afectan (Yan y Xia, 2024), y que los compuestos 2 a 4 se producen cuando se expresa el gen que codifica este regulador, estudiar las actividades codificadas por los genes próximos podría aportar más información sobre la síntesis de estos compuestos. En primer lugar la *orf31* codifica una Aminotransferasa que podrían pasar el grupo amino de un aminoácido a un cetoácido sustituyendo su grupo carbonilo o hidroxilo al realizar el enlace. Mientras que la *orf42* que codifica una Carbamoiltransferasa, podría usar carbamoilfosfato para transferir el grupo carbonilo y amino de este a un grupo hidroxilo o amino de otra molécula como sucede en la síntesis de novoviocina (Freel *et al.*, 2004). Sin embargo aunque estas actividades podrían adicionar los grupos amino y carbonilo vistos en los compuestos UO-187, UO-188 y UO-190, “a priori” no permitirían la formación de dos grupos carbonilos en carbonos contiguos como se presentan en estas moléculas. También se encuentran las *orf44* y *orf45* que son dos genes que codifican ambos una Ácido graso AMP-Ligasa o Acil-AMP-graso (FAAL). Estas proteínas pertenecen a la familia de enzimas que forman un adenilato de acilo (Zhang *et al.*, 2011). Este es otro método para incorporar unidades iniciadoras de acilo graso a PKS y NRPS modulares, pero en este caso el acilo activado es un ácido graso de cadena larga y la activación se realiza con AMP en lugar de una molécula de CoA (Trivedi *et al.*, 2004). También se ha descrito que pueden activar un intermediario en la síntesis de una PKS (Hemmerling *et al.*, 2018). Además la *orf32* codifica una Oxidorreductasa que presenta un dominio *enoyl-acyl-carrier-protein-reductase*, según los estudios con BLASTP. La presencia de este dominio indica que es una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos FAS-II (Fatty Acid bioSynthesis pathway) (Prasad *et al.*, 2021; Rana *et al.*, 2020). A la presencia de estos genes relacionados con la modificación de ácidos grasos hay que sumar los numerosos casos descritos sobre reguladores tipo TetR involucrados en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y otros lípidos (Cuthbertson y Nodwell, 2013). Sin embargo, si estas FAAL son responsables de la producción de los compuestos obtenidos, no se han encontrado en el *cluster* 1 del BGC 8 NRPS o PKS donde pueda continuar la síntesis de los mismos. Además estos compuestos no presentan el grupo carboxilo o lo han perdido por resultado



de otras actividades. Por lo tanto, estudios más exhaustivos en algunos de estos genes serían necesarios para obtener más información.

Finalmente los estudios realizados no han logrado identificar el compuesto codificado por las NRPS del *cluster* 1. Es posible que bajo las condiciones de trabajo ensayadas la producción del compuesto sea tan baja que no sea posible su visualización o que no permitan detectar el compuestos ya que las técnicas cromatográficas empleadas no lo detecten o requiera del uso de otros solventes para su correcta extracción. Además, al tratarse de un péptido es posible que no presenten un espectro de absorción característico que permita detectarlo fácilmente mediante el detector DAD empleado (Prasad *et al.*, 2017). Por lo tanto serían necesarios más estudios para la producción y detección del compuesto codificado por el *cluster* 1.

El BGC 8 contiene un posible segundo *cluster*, *cluster* 2, que contiene tres genes que codifican NRPS correspondientes a las *orf57*, *orf59* y *orf60*. Mientras que las NRPS codificadas por las *orf57* y *orf59* tienen diferentes dominios, la *orf60* codifica una *stand-alone NRPS* con un único dominio de adenilación (Figura 39). La *orf59* codifica una NRPS con dos PCP funcionales, un dominio de condensación que permite la ciclación del aminoácido seleccionado (Bloudoff y Schmeing, 2017), y un dominio de adenilación. Finalmente la NRPS codificada por la *orf57* presenta un PCP y como en el anterior caso un dominio de condensación que cicla el aminoácido seleccionado por el dominio A, además de un cMT que realiza una metilación en la molécula en formación y un dominio TE que libera la molécula sintetizada (Tabla 37 y Figura 39). Para que los dominios de condensación de tipo ciclación puedan realizar dicha actividad se requiere de la presencia de residuos de cisteína, serina o treonina que permitan formar los anillos de tipo tiazolina u oxazolina (Duerfahrt *et al.*, 2004). En este caso los dominios A de las NRPS codificadas por las *orf57* y *orf59* reconocen residuos de cisteína ya que sus *binding pocket* son DLYNLSLIWK, para la Orf57 y DLWNLSLIWK, para la Orf59 (Tabla 36). Estos *binding pockets* son idénticos a los *binding pockets* obtenidos bioinformáticamente para las NRPS SVEN_0517 y SVEN_0512, respectivamente, que reconocen el aminoácido cisteína en BGC de watasemicina de *S. venezuelae*. Por lo tanto, la ciclación del residuo por el Cy de Orf57 y Orf59 daría una tiazolina en ambos casos. Mientras que el *binding pocket* de la Orf60 es aLPsQGVLnK que selecciona salicilato (Khayatt *et al.*, 2013; Stachelhaus *et al.*, 1999) (Tabla 36), siendo también idéntico al obtenido bioinformáticamente para la



NRPS *stand-alone* SVEN_0510 que reconoce salicilato en el mismo BGC mencionado anteriormente. Este salicilato podría originarse por la acción de la SsfH codificada por la *orf12*, a partir de corismato procedente de la ruta del ácido siquímico (Mishra y Baek, 2021), y que se localiza en el *cluster* 1. Además, las NRPS de las Orf60, Orf59 y Orf57 presentan 50%, 48% y 52% de aminoácidos idénticos, respectivamente, con las NRPS PchD, PcHE y pCHF de *Pseudomonas* responsables de sintetizar piochelina (Serino *et al.*, 1997). La síntesis por acción de estas NRPS se iniciaría activando el salicilato por el dominio A de la Orf60, una *stand-alone NRPS* que se encarga de activar el primer *building block* en la síntesis del compuesto, y que lo une a la Ppant del PCP de otra NRPS donde sigue la síntesis. Este suceso es común en la síntesis de sideróforos cuyas unidades iniciadoras sean 2,3-dihidroxibenzoato o salicilato (Ho *et al.*, 2018; Süßmuth *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014). Este salicilato-AMP activado por la Orf60 se uniría al grupo Ppant del primer PCP de la Orf59, la cual reconocería en su dominio A una cisteína que se uniría como aminoail tioéster al segundo PCP. Entre esta cisteína y el salicilato se daría un enlace peptídico por acción del dominio Cy, que a su vez realizaría la ciclación del residuo de cisteína dando una tiazolina en la molécula. Posteriormente en la Orf57 se reconocería una segunda cisteína que se uniría al único PCP de dicha NRPS, y el dominio Cy de la Orf57 elongaría la molécula al unir la cadena en formación a esta segunda cisteína que también es ciclada dando la segunda tiazolina de la molécula. Además, puesto que la Orf57 presenta un dominio de metilación, se produciría esta modificación en el anillo de tiazolina. Finalmente, el producto de la ruta se liberaría mediante la acción del dominio TE de la NRPS Orf57. En la biosíntesis de piochelina se ha descrito que la liberación es realizada por un dominio TE tipo II, generando un péptido lineal que es liberado por hidrólisis (Seipke *et al.*, 2011; Serino *et al.*, 1997). Por todo ello se propone la ruta de biosíntesis mostrada en la Figura 78, codificada por el *cluster* 2 del BGC 8, que tendría como resultado la producción de la molécula piochelina (Serino *et al.*, 1997).

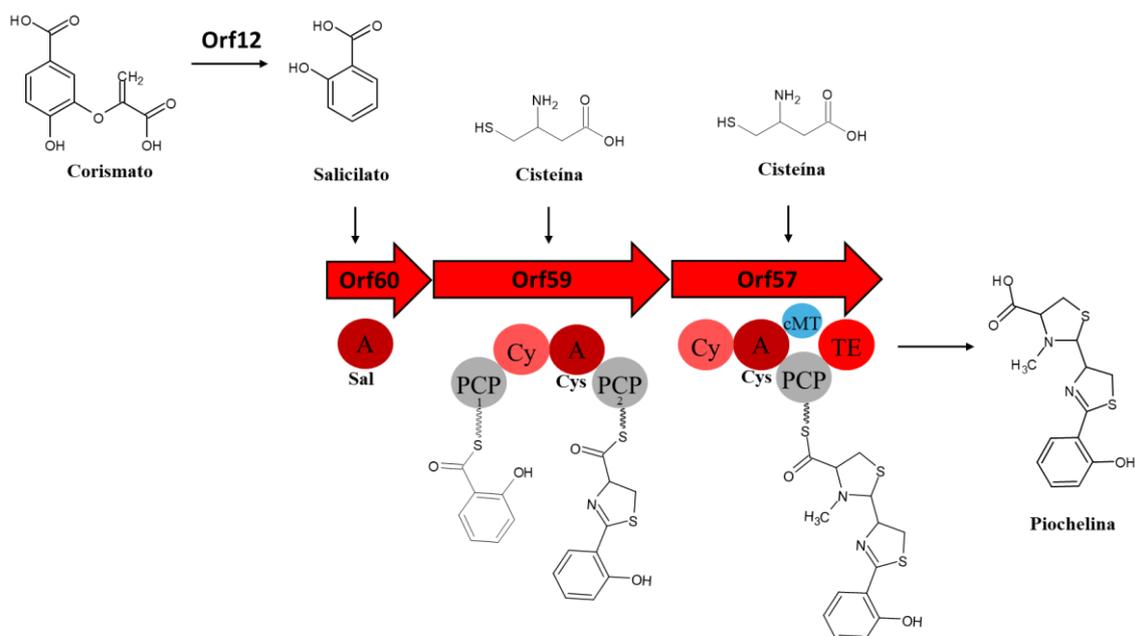


Figura 78. Propuesta de ruta de biosíntesis codificada por el *cluster 2* del BGC 8. **A:** dominio de adenilación; **Cy:** dominio de condensación tipo ciclación; **PCP:** dominio de tiolación; **cMT:** dominio de metilación; **TE:** tioesterasa; **Sal:** salicilato; **Cys:** cisteína; **Orf12:** Salicilato Sintasa; **Orf57, 59 y 60:** NRPS.

Aunque se generó un mutante en la *orf12* (Figura 41), lo que bloquearía la síntesis de piochelina ya que es la responsable de producir el salicilato que es la unidad iniciadora del compuesto piochelina, no se detectó la pérdida de producción de ningún compuesto que pudiese ser piochelina. Sin embargo, tampoco se detectó su producción por parte de la cepa silvestre. Estudios en *S. scabiei* mostraron que la expresión del BGC de piochelina se encuentra regulada negativamente por un gen *tetR* y afectada positivamente por un gen que codifica un regulador SARP tipo AfsR (Seipke *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de *S. glaucescens*, la expresión de la *orf11* que codifica un regulador AfsR y la eliminación del regulador *tetR* de la *orf36* no dio lugar a la producción de piochelina. Esto puede ser debido a que estos reguladores solo controlen la expresión del *cluster 1* y no del *cluster 2*. En este sentido, hay que mencionar que en el *cluster 2* también existe un regulador tipo LuxR (*orf56*) y otro tipo TetR (*orf61*), cuya manipulación podría ser necesaria para la activación del *cluster 2*.

A lo largo de este trabajo, al cultivar *S. glaucescens* en diferentes medios, se pudo poner de manifiesto que esta cepa producía compuestos no descritos en la misma, cuya producción se pudo asociar a la presencia de un BGC específico en su genoma. Así se detectó la producción de desferoxaminas codificadas por el BGC 13 (Tabla 33), que se



expresa en los medios SM10 líquido y R5A sólido y líquido (Figura 69-71). Por otro lado, se ha observado la producción del compuesto tetracenomicina C codificado por el BGC 20 (Tabla 33 y Figura 68), la producción de este compuesto se ha visto disminuida en algunos medios en los mutantes estructurales $\Delta orf12g$ y $\Delta orf36g$ (Figura 72), lo que ha dificultado los estudios comparativos en muchos casos. En este trabajo además se ha observado que la producción de este compuesto se encuentra afectada por el regulador tipo SARP codificado por la *orf11* del BGC 8. Los reguladores de la familia SARP solo se encuentran en actinobacterias y funcionan mayoritariamente como activadores de la transcripción de BGCs (Bibb, 2005; Krause *et al.*, 2020; Yan y Xia, 2024), y se considera una buena estrategia manipular genéticamente este tipo de reguladores para activar BGCs crípticos (Ye *et al.*, 2023). En el BGC 8 de *S. glaucescens* este SARP codificado por la *orf11* es concretamente un regulador AfsR, el único regulador tipo SARP que es pleiotrópico o global. Este tipo de reguladores son responsables de la activación de BGCs por la inducción de la expresión de diferentes genes presentes en dichos BGCs al unirse a sus promotores, pudiendo activar la expresión de varios BGCs en una única cepa (Liu *et al.*, 2013; Martín y Liras 2019; Yan y Xia, 2024). En este trabajo, la cepa +orf11g que presenta la expresión constitutiva de un gen *afsR*, ha mostrado el aumento de la producción de tetracenomicina C en los medios SM4, SM5, SM10 y SM30 con respecto a la cepa silvestre que también produce dicho compuesto en esos medios (Figura 73A-D). Además, en el medio SV2 donde la cepa silvestre no muestra producción de tetracenomicina C, la cepa +orf11g sí presenta producción de dicho compuesto (Figura 73E). Estos datos indican que el regulador global AfsR, codificado por la *orf11* del BGC 8 de *S. glaucescens*, presenta un papel como inductor del BGC 20 productor de tetracenomicina C en *S. glaucescens*.



VI. CONCLUSIONES





VI. CONCLUSIONES

1. Se localizaron regiones conservadas de las proteínas Salicilato Sintasa, a partir de las cuales se diseñaron oligonucleótidos para amplificar genes codificantes de dichas enzimas. Cuatro de estos motivos conservados mostraron mayor eficiencia para dicho fin.

2. Mediante amplificaciones por PCR utilizando dichos oligonucleótidos y por análisis BLAST, se han detectado siete cepas de *Streptomyces* que contenían genes homólogos al gen *ssfH* que codifica la Salicilato Sintasa de tetraciclina SF2575, obteniéndose un total de nueve genes homólogos.

3. El estudio por antiSMASH de los genomas de las siete cepas de *Streptomyces* permitieron la identificación de un BGC de caboxamicina que contiene el gen de la Salicilato Sintasa identificado en *Streptomyces sp.* NTK937, varios BGCs de coelibactina que contenían genes para Salicilato Sintasa en los genomas de las cepas CS159, CS113, *S. olivaceus* y *S. lividans*, dos BGCs de micemicinas a los que pertenecían genes de las Salicilato Sintasa identificadas en *S. olivaceus* y en CS123 y el estudio de homologías de los genes circundantes al gen *cs_ssfH-2* sugieren la existencia en CS123 de un BGC de coelibactina.

4. Cultivos de la cepa CS123 en distintos medios de cultivo, mostraron que en las condiciones ensayadas no se producen micemicinas.

5. El estudio por antiSMASH del genoma de la cepa *S. glaucescens* permitió la identificación del BGC 8, que presenta una homología moderada con BGCs de sideróforos tipo watasemicina, y que podría codificar un compuesto nuevo.

6. Los estudios comparativos del BGC 8 con genomas de otros *Streptomyces*, sugieren que está formado por dos *clusters*: el *cluster* 1 (*orf11* a la *orf43*) y el *cluster* 2 (*orf44* a la *orf60*). De dichos *clusters* se han determinado bioinformáticamente los módulos de los genes codificantes de NRPS y se han obtenido los *binding pockets* y la selectividad de sustrato de los dominios de adenilación.

7. Se ha comprobado que la *orf12* del BGC 8 de *S. glaucescens* codifica una Salicilato Sintasa y que dicho gen se expresa en los medios SM10 y SM20.



8. Las modificaciones genéticas realizadas en *S. glaucescens* no han permitido detectar los compuestos producidos por el BGC 8. Sin embargo, sí otros compuestos desconocidos.

9. Se ha propuesto una ruta de biosíntesis para las enzimas codificadas por el *cluster* 1.

10. Se han caracterizado mediante RMN y MS los compuestos 2-4, mostrando que están relacionados estructuralmente entre sí y son compuestos nuevos. Las fórmulas moleculares de los compuestos 5-7 producidos por la cepa $\Delta orf36g$, y los espectros de los compuestos 8-11 producidos por las cepas $+orf29g$ y $\Delta orf36+orf29g$, sugieren que podrían tratarse de compuestos de la misma familia que los compuestos 2-4.

11. Se ha propuesto que el *cluster* 2 del BGC 8 codifica la ruta de biosíntesis del compuesto piochelina en la que se involucra la *orf12* del *cluster* 1.

12. La expresión del regulador tipo SARP codificado por la *orf11* del BGC 8 de *S. glaucescens* ha inducido la producción de tetracenomicina C en el medio SV2 y aumentado dicha producción en los medios SM4, SM5, SM10 y SM30.

13. Se han detectado otros 13 compuestos desconocidos producidos por la cepa silvestre *S. glaucescens* en los medios R5A y SM10.



VII. REFERENCIAS





VII. REFERENCIAS

- Adrover-Castellano, M. L., Schmidt, J. J., y Sherman, D. H. (2021). Biosynthetic Cyclization Catalysts for the Assembly of Peptide and Polyketide Natural Products. *ChemCatChem*, 13(9), 2095–2116. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001886>
- Agrawal, P., Khater, S., Gupta, M., Sain, N., y Mohanty, D. (2017). RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W80–W88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx408>
- Ahmad Dar, A., Sangwan, P. L., y Kumar, A. (2020). Chromatography: An important tool for drug discovery. *Journal of Separation Science*, 43(1), 105–119. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900656>
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y.-M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., y Li, A. (2022). Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 968053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>
- Albarano, L., Esposito, R., Ruocco, N., y Costantini, M. (2020). Genome Mining as New Challenge in Natural Products Discovery. *Marine Drugs*, 18(4), 199. <https://doi.org/10.3390/md18040199>
- Al-Shaibani, M. M., Mohamed, R. M. S. R., Sidik, N. M., Enshasy, H. A. El, Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N. A., y Zin, N. M. (2021). Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules*, 26(15), 4504. <https://doi.org/10.3390/molecules26154504>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M. C., Botana, L. M., y Pedrosa, R. (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 777. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00777>
- Ansari, M. Z., Sharma, J., Gokhale, R. S., y Mohanty, D. (2008). In silico analysis of methyltransferase domains involved in biosynthesis of secondary metabolites. *BMC Bioinformatics*, 9, 454. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-454>
- Antoraz Martín, S. (2018). *Mejora genética de cepas de Streptomyces coelicolor para la producción de metabolitos secundarios mediante el estudio de su regulación por sistemas de dos componentes*. Universidad de Salamanca. <https://doi.org/10.14201/gredos.139475>



- Bachmann, B. O., y Ravel, J. (2009). *Chapter 8 Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data Methods in enzymology*, 458, 181–217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04808-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04808-3)
- Baltz, R. H. (2021). Genome mining for drug discovery: progress at the front end. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(9–10) kuab044. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab044>
- Baral, B., Akhgari, A., y Metsä-Ketelä, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., y van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Belknap, K. C., Park, C. J., Barth, B. M., y Andam, C. P. (2020). Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Scientific Reports*, 10(1), 2003. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58904-9>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Beyer, S., Distler, J., y Piepersberg, W. (1996). The str gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR. *Molecular and General Genetics*, 250(6), 775–784. <https://doi.org/10.1007/BF02172990>
- Bibb, M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 142(6), 1335–1344. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-6-1335>
- Bibb M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., y Schoner B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* *Gene*, 116, 43–49. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90627-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90627-2)



- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., y Weber, T. (2023). AntiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Bloudoff, K., y Schmeing, T. M. (2017). Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(11), 1587–1604. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.010>
- Breton, R. C., y Reynolds, W. F. (2013). Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural Product Reports*, 30(4), 501. <https://doi.org/10.1039/c2np20104f>
- Brown, A. S., Calcott, M. J., Owen, J. G., y Ackerley, D. F. (2018). Structural, functional and evolutionary perspectives on effective re-engineering of non-ribosomal peptide synthetase assembly lines. *Natural Product Reports*, 35(11), 1210–1228. <https://doi.org/10.1039/C8NP00036K>
- Bucar, F., Wube, A., y Schmid, M. (2013). Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30(4), 525. <https://doi.org/10.1039/c3np20106f>
- Bull, A. T., y Goodfellow, M. (2019). Dark, rare and inspirational microbial matter in the extremobiosphere: 16 000 m of bioprospecting campaigns. *Microbiology*, 165(12), 1252–1264. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000822>
- Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y.-L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R., y Ōmura, S. (1979). Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3), 361–367. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>
- Butassi, E., Svetaz, L., Carpinella, M. C., Efferth, T., y Zacchino, S. (2021). Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi—Latest Findings. *Antibiotics*, 10(9), 1053. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091053>
- Calcott, M. J., Owen, J. G., Lamont, I. L., y Ackerley, D. F. (2014). Biosynthesis of Novel Pyoverdines by Domain Substitution in a Nonribosomal Peptide Synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5723–5731. <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-14>
- Cano-Prieto, C., García-Salcedo, R., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A. F., Fiedler, H., Méndez, C., Salas, J. A., y Olano, C. (2015). Genome Mining of *Streptomyces sp.* Tü 6176: Characterization of the Nataxazole Biosynthesis Pathway. *ChemBioChem*, 16(10), 1461–1473. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500153>



- Chater, K. F., y Wilde, L. C. (1976). Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease SalI. *Journal of Bacteriology*, 128(2), 644–650. <https://doi.org/10.1128/jb.128.2.644-650.1976>
- Chen, J., y Xie, J. (2011). Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2694–2702. <https://doi.org/10.1002/jcb.23219>
- Chen, J., Xu, L., Zhou, Y., y Han, B. (2021). Natural Products from Actinomycetes Associated with Marine Organisms. *Marine Drugs*, 19(11), 629. <https://doi.org/10.3390/md19110629>
- Chen, S., Kinney, W. A., y Van Lanen, S. (2017). Nature's combinatorial biosynthesis and recently engineered production of nucleoside antibiotics in *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2233-6>
- Cheng, Y. (2006). Deciphering the Biosynthetic Codes for the Potent Anti-SARS-CoV Cyclodepsipeptide Valinomycin in *Streptomyces tsusimaensis* ATCC 15141. *ChemBioChem*, 7(3), 471–477. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500425>
- Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 4, 169–176.
- Cuervo, L., Méndez, C., Salas, J. A., Olano, C., y Malmierca, M. G. (2022). Volatile Compounds in Actinomycete Communities: A New Tool for Biosynthetic Gene Cluster Activation, Cooperative Growth Promotion, and Drug Discovery. *Cells*, 11(21), 3510. <https://doi.org/10.3390/cells11213510>
- Cuthbertson, L., y Nodwell, J. R. (2013). The TetR Family of Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 440–475. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-13>
- Davis, I., y Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? In *Expert Review of Neurotherapeutics* 15(7) 719–721. Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1049999>
- De Crécy-Lagard, V., Marlière, P., y Saurin, W. (1995). Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie*, 318(9), 927–936.
- DeBoer, C., Dietz, A., Savage, G. M., y Silver, W. S. (1955). Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. I. Biologic studies of streptolydigin. *Antibiotics Annual*, 3, 886–892.



- Demain, A. L., y Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 Years of progress. *Journal of Antibiotics*, 62(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Diarra, U., Osborne-Naikatini, T., y Subramani, R. (2024). Actinomycetes associated with hymenopteran insects: a promising source of bioactive natural products. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1303010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1303010>
- Dietz, A. (1967). *Streptomyces steffisburgensis* sp.n. *Journal of Bacteriology*, 94(6), 2022–2026. <https://doi.org/10.1128/jb.94.6.2022-2026.1967>
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., y Taufan, T. (2022). *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418–465. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>
- Dosselaere, F., y Vanderleyden, J. (2001). A Metabolic Node in Action: Chorismate-Utilizing Enzymes in Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(2), 75–131. <https://doi.org/10.1080/20014091096710>
- Drautz, H., Reuschenbach, P., y Zähler, H. (1985). Metabolic products of microorganisms. 225. elloramycin, a new anthacycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus* isolation, characterization, structure and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 38(10), 1291–1301. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.38.1291>
- Duban, M., Cociancich, S., y Leclère, V. (2022). Nonribosomal Peptide Synthesis Definitely Working Out of the Rules. *Microorganisms*, 10(3), 577. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030577>
- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Müller, R., y Marahiel, M. A. (2004). Rational Design of a Bimodular Model System for the Investigation of Heterocyclization in Nonribosomal Peptide Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 11(2), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.01.013>
- Felnagle, E. A., Barkei, J. J., Park, H., Podevels, A. M., McMahon, M. D., Drott, D. W., y Thomas, M. G. (2010). MbtH-Like Proteins as Integral Components of Bacterial Nonribosomal Peptide Synthetases. *Biochemistry*, 49(41), 8815–8817. <https://doi.org/10.1021/bi1012854>
- Fernandes, T. A. R., da Silveira, W. B., Passos, F. M. L., y Zucchi, T. D. (2014). Characterization of a thermotolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. SB086. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0781-z>
- Fernández, E., Weissbach, U., Sánchez Reillo, C., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., y Salas, J. A. (1998). Identification of Two Genes from *Streptomyces argillaceus* Encoding Glycosyltransferases Involved in Transfer of a Disaccharide during Biosynthesis of the



- Antitumor Drug Mithramycin. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4929–4937. <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4929-4937.1998>
- Fiedler, H.-P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K., y Zeeck, A. (2001). Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiology Letters*, 196(2), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10556.x>
- Fischbach, M. A., y Walsh, C. T. (2006). Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(8), 3468–3496. <https://doi.org/10.1021/cr0503097>
- Flårdh, K., y Buttner, M. J. (2009). Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>
- Flett, F., Mersinias, V., y Smith, C. P. (2006). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 155(2), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb13882.x>
- Freel Meyers, C. L., Oberthür, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D., y Walsh, C. T. (2004). Characterization of NovP and NovN: Completion of Novobiocin Biosynthesis by Sequential Tailoring of the Noviosyl Ring. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(1), 67–70. <https://doi.org/10.1002/anie.200352626>
- Gao, Y., Walt, C., Bader, C. D., y Müller, R. (2023). Genome-Guided Discovery of the Myxobacterial Thiolactone-Containing Sorangibactins. *ACS Chemical Biology*, 18(4), 924–932. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00063>
- García-Gutiérrez, C. (2022). *Identificación y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis para péptidos no ribosomales en Streptomyces sp. CS113*. Universidad de Oviedo.
- García-Gutiérrez, C., Pérez-Victoria, I., Montero, I., Fernández-De la Hoz, J., Malmierca, M. G., Martín, J., Salas, J. A., Olano, C., Reyes, F., y Méndez, C. (2024). Unearthing a Cryptic Biosynthetic Gene Cluster for the Piperazic Acid-Bearing Depsipeptide Diperamycin in the Ant-Dweller *Streptomyces sp. CS113*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2347. <https://doi.org/10.3390/ijms25042347>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., y Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Goh, F., Zhang, M. M., Lim, T. R., Low, K. N., Nge, C. E., Heng, E., Yeo, W. L., Sirota, F. L., Crasta, S., Tan, Z., Ng, V., Leong, C. Y., Zhang, H., Lezhava, A., Chen, S. L., Hoon, S. S., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., Kanagasundaram, Y., ... Ng, S. B. (2020).



- Identification and engineering of 32 membered antifungal macrolactone notonesomycins. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01328-x>
- Green, M., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). USA: Cold Harbor Press.
- Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., y Hutchinson, C. R. (1994). Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene*, 151(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90625-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90625-4)
- Guilfoile, P. G., y Hutchinson, C. R. (1992). Sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens* tcmAR tetracenomycin C resistance and repressor gene loci. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3651–3658. <https://doi.org/10.1128/jb.174.11.3651-3658.1992>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hatsu, M., Sasaki, T., Gomi, S., Kodama, Y., Sezaki, M., Inouye, S., y Kondo, S. (1992). A new tetracycline antibiotic with antitumor activity. II. The structural elucidation of SF2575. *The Journal of Antibiotics*, 45(3), 325–330. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.325>
- Hazen, E. L., y Brown, R. (1950). Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science (New York, N.Y.)*, 112(2911), 423.
- Hemmerling, F., Lebe, K. E., Wunderlich, J., y Hahn, F. (2018). An Unusual Fatty Acyl:Adenylate Ligase (FAAL)–Acyl Carrier Protein (ACP) Didomain in Ambruticin Biosynthesis. *ChemBioChem*, 19(10), 1006–1011. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800084>
- Herrmann, K. M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, 7(7), 907–919. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.907>
- Ho, Y.-N., Lee, H.-J., Hsieh, C.-T., Peng, C.-C., y Yang, Y.-L. (2018). Chapter 13 - Chemistry and Biology of Salicyl-Capped Siderophores 59, 431–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00013-X>
- Hobbs, G., Frazer, Catherine M., Gardner, David C. J., Cullum, John A., y Oliver, Stephen G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3). <https://doi.org/10.1007/BF00258408>
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press.



- Hopwood, D., Kieser, T., Lydiate, D. J., y Bibb, M. J. (1985). *Streptomyces plasmids: their biology and use as cloning vectors. Antibiotic-producing Streptomyces*. (Queener S.W. y Day E., Eds.). Academic Press.
- Hoskisson, P. A., y Seipke, R. F. (2020). Cryptic or silent? The known unknowns, unknown knowns, and unknown unknowns of secondary metabolism. *MBio*, *11*(5), 1–5. <https://doi.org/10.1128/mBio.02642-20>
- Hou, J., Robbel, L., y Marahiel, M. A. (2011). Identification and characterization of the lysobactin biosynthetic gene cluster reveals mechanistic insights into an unusual termination module architecture. *Chemistry & biology*, *18*(5), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.02.012>
- Hui, M. L.-Y., Tan, L. T.-H., Letchumanan, V., He, Y.-W., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Law, J. W.-F., y Lee, L.-H. (2021). The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics*, *10*(6), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
- Hutchinson, C. R. (1997). Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomycin C. *Chemical Reviews*, *97*(7), 2525–2536. <https://doi.org/10.1021/cr960022x>
- Hwang, S., Lee, N., Cho, S., Palsson, B., y Cho, B.-K. (2020). Repurposing Modular Polyketide Synthases and Non-ribosomal Peptide Synthetases for Novel Chemical Biosynthesis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 87. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00087>
- Inahashi, Y., Zhou, S., Bibb, M. J., Song, L., Al-Bassam, M. M., Bibb, M. J., y Challis, G. L. (2017). Watasemycin biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: thiazoline C-methylation by a type B radical-SAM methylase homologue. *Chemical Science*, *8*(4), 2823–2831. <https://doi.org/10.1039/c6sc03533g>
- Jacob, N., Ashapoorna, C., y Prema, P. (2008). Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, *99*(14), 6697–6701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>
- Jang, H.-D., y Chen, K.-S. (2003). Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(3), 263–268. <https://doi.org/10.1023/A:1023641806194>
- Jones, A. C., Gust, B., Kulik, A., Heide, L., Buttner, M. J., y Bibb, M. J. (2013). Phage P1-Derived Artificial Chromosomes Facilitate Heterologous Expression of the FK506 Gene Cluster. *PLoS ONE*, *8*(7), e69319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069319>
- Jones, G. H. (1987). Actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*: enzymatic conversion of 3-hydroxyanthranilic acid to 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid. *Journal of Bacteriology*, *169*(12), 5575–5578. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5575-5578.1987>



- Jose, P. A., Maharshi, A., y Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. In *Microbiological Research* (Vol. 246). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>
- Joseph, F.-J. R. S., Iniyan, A. M., y Vincent, S. G. P. (2017). HR-LC-MS based analysis of two antibacterial metabolites from a marine sponge symbiont *Streptomyces pharmamarensis* ICN40. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.033>
- Kallifidas, D., Pascoe, B., Owen, G. A., Strain-Damerell, C. M., Hong, H.-J., y Paget, M. S. B. (2010). The Zinc-Responsive Regulator Zur Controls Expression of the Coelibactin Gene Cluster in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 608–611. <https://doi.org/10.1128/JB.01022-09>
- Kapadia, M., Rolston, K. V. I., y Han, X. Y. (2007). Invasive *Streptomyces* infections: Six cases and literature review. *American Journal of Clinical Pathology*, *127*(4), 619–624. <https://doi.org/10.1309/QJEBXP0BCGR54L15>
- Katz, L., y Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Khayatt, B. I., Overmars, L., Siezen, R. J., y Francke, C. (2013). Classification of the Adenylation and Acyl-Transferase Activity of NRPS and PKS Systems Using Ensembles of Substrate Specific Hidden Markov Models. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062136>
- Kieser, T., Chater, K., Bibb, M., Buttner, M., y Hopwood, D. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation.
- Komaki, H., Ichikawa, N., Oguchi, A., Hamada, M., Tamura, T., Fujita, N., y Suzuki, K.-I. (2017). Genome analysis-based reclassification of *Streptomyces endus* and *Streptomyces sporocinereus* as later heterotypic synonyms of *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(2), 343–345. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001628>
- Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozono, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S., Shin-ya, K., Cane, D. E., y Ikeda, H. (2013). Engineered *Streptomyces avermitilis* Host for Heterologous Expression of Biosynthetic Gene Cluster for Secondary Metabolites. *ACS Synthetic Biology*, *2*(7), 384–396. <https://doi.org/10.1021/sb3001003>
- Kopp, F., y Marahiel, M. A. (2007). Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Natural Product Reports*, *24*(4), 735–749. <https://doi.org/10.1039/b613652b>



- Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., y Marahiel, M. A. (2010). Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. *Chemistry y Biology*, 17(8), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>
- Krause, J., Handayani, I., Blin, K., Kulik, A., y 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>
- Krug, D., y Müller, R. (2014). Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. *Natural Product Reports*, 31(6), 768. <https://doi.org/10.1039/c3np70127a>
- Kumar, N., Bhagwat, P., Singh, S., y Pillai, S. (2024). A review on the diversity of antimicrobial peptides and genome mining strategies for their prediction. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.06.013>
- Labes, G., Bibb, M., y Wohlleben, W. (1997). Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (aacC1) of Tn1696 as reporter. *Microbiology*, 143(5), 1503–1512. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1503>
- Lacey, H. J., y Rutledge, P. J. (2022). Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. *Molecules*, 27(3), 887. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., y Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, 3, 923–936. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90181-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90181-7)
- Landete, J. M., Rodríguez, H., de Las Rivas, B., y Muñoz, R. (2008). Characterization of a benzyl alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4497–4503. <https://doi.org/10.1021/jf800500v>
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., y Cho, B.-K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548–1556. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.024>
- Lee, N., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., y Cho, B. K. (2019). Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. In *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 667–686. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04015>



- Li, C., He, H., Wang, J., Liu, H., Wang, H., Zhu, Y., Wang, X., Zhang, Y., y Xiang, W. (2019). Characterization of a LAL-type regulator NemR in nemadectin biosynthesis and its application for increasing nemadectin production in *Streptomyces cyaneogriseus*. *Science China Life Sciences*, 62(3), 394–405. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9442-9>
- Lim, Y., Go, M., y Yew, W. (2016). Exploiting the Biosynthetic Potential of Type III Polyketide Synthases. *Molecules*, 21(6), 806. <https://doi.org/10.3390/molecules21060806>
- Liu, C., y Kakeya, H. (2020). Cryptic Chemical Communication: Secondary Metabolic Responses Revealed by Microbial Co-culture. In *Chemistry - An Asian Journal*, 15(3), 327–337. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/asia.201901505>
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., y Tan, H. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112–143. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>
- Liu, N., Song, F., Shang, F., y Huang, Y. (2015). Mycemycins A–E, New Dibenzoxazepinones Isolated from Two Different Streptomyces. *Marine Drugs*, 13(10), 6247–6258. <https://doi.org/10.3390/md13106247>
- Losada, A. A., Cano-Prieto, C., García-Salcedo, R., Braña, A. F., Méndez, C., Salas, J. A., y Olano, C. (2017). Caboxamycin biosynthesis pathway and identification of novel benzoxazoles produced by cross-talk in *Streptomyces sp.* NTK 937. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 873–885. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12716>
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., y MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90603-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90603-M)
- Mahajan, G. B., y Balachandran, L. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes - a review. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4(1), 240–253. <https://doi.org/10.2741/373>
- 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., y Salas, J. A. (2018). Searching for Glycosylated Natural Products in Actinomycetes and Identification of Novel Macrolactams and Angucyclines. *Frontiers in Microbiology*, 9, 39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00039>
- Manfio, G. P. (1995). *Towards minimal standards for the description of Streptomyces species*. University of Newcastle.
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P., y Sanchez, J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces*



- coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3877–3886. <https://doi.org/10.1128/AEM.02715-07>
- Manteca, A., Fernandez, M., y Sanchez, J. (2006). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Research in Microbiology*, 157(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.003>
- Manteca, A., y Sanchez, J. (2009). Streptomyces development in colonies and soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2920–2924. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-08>
- Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H. R., Schwämmle, V., y Jensen, O. N. (2010). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(7), 1423–1436. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900449-MCP200>
- Marahiel, M. A. (2016). A structural model for multimodular NRPS assembly lines. *Natural Product Reports*, 33(2), 136–140. <https://doi.org/10.1039/c5np00082c>
- Martín, J. F., y Liras, P. (2020). The Balance Metabolism Safety Net: Integration of Stress Signals by Interacting Transcriptional Factors in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03120>
- Martín, J.-F., y Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.008>
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., y Santos, S. (2014). Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>
- Mccormick, M. H., Mcguire, J. M., Pittenger, G. E., Pittenger, R. C., y Stark, W. M. (1995). Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiotics Annual*, 3, 606–611.
- McGuire, J. M., Bunch, R. L., Anderson, R. C., Boaz, H. E., Flynn, E. H., Powell, H. M., y Smith, J. W. (1952). Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiotics y Chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 2(6), 281–283.
- Medema, M. H., Takano, E., y Breitling, R. (2013). Detecting Sequence Homology at the Gene Cluster Level with MultiGeneBlast. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1218–1223. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst025>
- Meena, S. N., Wajs-Bonikowska, A., Girawale, S., Imran, M., Poduwal, P., y Kodam, K. M. (2024). High-Throughput Mining of Novel Compounds from Known Microbes: A



- Boost to Natural Product Screening. *Molecules*, 29(13), 3237. <https://doi.org/10.3390/molecules29133237>
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C. J., Wrigley, S. K., y Baltz, R. H. (2005). Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, 151(5), 1507–1523. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27757-0>
- Mishra, A., y Baek, K.-H. (2021). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism: A Divergent Pathway for Plants and Bacteria. *Biomolecules*, 11(5), 705. <https://doi.org/10.3390/biom11050705>
- Montuori, E., Capalbo, A., y Lauritano, C. (2022). Marine Compounds for Melanoma Treatment and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10284. <https://doi.org/10.3390/ijms231810284>
- Nakouti, I., Sihanonth, P., y Hobbs, G. (2012). A new approach to isolating siderophore-producing actinobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 68–72. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03259.x>
- Núñez, L. E., Nybo, S. E., González-Sabín, J., Pérez, M., Menéndez, N., Braña, A. F., Shaaban, K. A., He, M., Morís, F., Salas, J. A., Rohr, J., y Méndez, C. (2012). A Novel Mithramycin Analogue with High Antitumor Activity and Less Toxicity Generated by Combinatorial Biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(12), 5813–5825. <https://doi.org/10.1021/jm300234t>
- Olano, C., Méndez, C., y Salas, J. A. (2009). Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, 26(5), 628. <https://doi.org/10.1039/b822528a>
- Olano, C., Méndez, C., y Salas, J. A. (2011). Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 144–164. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00231.x>
- Olano, C., Wilkinson, B., Sánchez, C., Moss, S., Sheridan, R., Math, V., Weston, A., Brana, A., Martin, C., y Oliynyk, M. (2004). Biosynthesis of the Angiogenesis Inhibitor Borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055 Cluster Analysis and Assignment of Functions. *Chemistry & Biology*, 11(1), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(03\)00297-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00297-7)
- Ortseifen, V., Winkler, A., Albersmeier, A., Wendler, S., Pühler, A., Kalinowski, J., y Rückert, C. (2015). Complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) consisting of a linear chromosome and one linear plasmid. *Journal of Biotechnology*, 194, 81–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.036>



- Palaniappan, K., Chen, I.-M. A., Chu, K., Ratner, A., Seshadri, R., Kyrpides, N. C., Ivanova, N. N., y Mouncey, N. J. (2019). IMG-ABC v.5.0: an update to the IMG/Atlas of Biosynthetic Gene Clusters Knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D422–D430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz932>
- Pan, G., Xu, Z., Guo, Z., Hindra, Ma, M., Yang, D., Zhou, H., Gansemans, Y., Zhu, X., Huang, Y., Zhao, L.-X., Jiang, Y., Cheng, J., Van Nieuwerburgh, F., Suh, J.-W., Duan, Y., y Shen, B. (2017). Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.1716245115>
- Pérez-Victoria, I., Martín, J., y Reyes, F. (2016). Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products. *Planta Medica*, 82(09/10), 857–871. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101763>
- Prado-Alonso, L. (2021). *Aplicación de estrategias basadas en la secuenciación de genomas para la activación de la producción de nuevos compuestos bioactivos en Streptomyces spp.* Universidad de Oviedo.
- Prado-Alonso, L., Pérez-Victoria, I., Malmierca, M. G., Montero, I., Rioja-Blanco, E., Martín, J., Reyes, F., Méndez, C., Salas, J. A., y Olano, C. (2022). Colibrinmycins, Novel Halogenated Hybrid Polyketide Synthase-Nonribosomal Peptide Synthetase (PKS-NRPS) Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Strain CS147. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(1), e0183921. <https://doi.org/10.1128/AEM.01839-21>
- Prado-Alonso, L., Ye, S., Pérez-Victoria, I., Montero, I., Riesco, P., Ortiz-López, F. J., Martín, J., Olano, C., Reyes, F., y Méndez, C. (2024). Genome Mining for Diazo-Synthesis-Related Genes in *Streptomyces* sp. CS057 Unveiled the Cryptic Biosynthetic Gene Cluster crx for the Novel 3,4-AHBA-Derived Compound Crexazone 2. *Biomolecules*, 14(9), 1084. <https://doi.org/10.3390/biom14091084>
- Prasad, M. S., Bhole, R. P., Khedekar, P. B., y Chikhale, R. V. (2021). Mycobacterium enoyl acyl carrier protein reductase (InhA): A key target for antitubercular drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 115, 105242. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105242>
- Prasad, S., Mandal, I., Singh, S., Paul, A., Mandal, B., Venkatramani, R., y Swaminathan, R. (2017). Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chemical Science*, 8(8), 5416–5433. <https://doi.org/10.1039/C7SC00880E>
- Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., y Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Purushe, S., Prakash, D., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P., y Kapadnis, B. (2012). Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial



- measure for dextran removal during sugar manufacture. *Bioresource Technology*, 115, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.002>
- Qin, Z., Munnoch, J. T., Devine, R., Holmes, N. A., Seipke, R. F., Wilkinson, K. A., Wilkinson, B., y Hutchings, M. I. (2017). Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African Tetraponera plant-ants. *Chemical Science*, 8(4), 3218–3227. <https://doi.org/10.1039/C6SC04265A>
- Rana, P., Ghose, S. M., Akunuri, R., Madhavi, Y. V., Chopra, S., y Nanduri, S. (2020). FabI (enoyl acyl carrier protein reductase) - A potential broad spectrum therapeutic target and its inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112757. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112757>
- Reynolds, W. F., y Enríquez, R. G. (2002). Choosing the Best Pulse Sequences, Acquisition Parameters, Postacquisition Processing Strategies, and Probes for Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy. *Journal of Natural Products*, 65(2), 221–244. <https://doi.org/10.1021/np010444o>
- Rockser, Y., y Wehmeier, U. F. (2009). The *gac*-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O—Identification, isolation and characterization. *Journal of Biotechnology*, 140(1–2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.016>
- Romero-Fernández, M., Moreno-Perez, S., H. Orrego, A., Martins de Oliveira, S., I. Santamaría, R., Díaz, M., Guisan, J. M., y Rocha-Martin, J. (2018). Designing continuous flow reaction of xylan hydrolysis for xylooligosaccharides production in packed-bed reactors using xylanase immobilized on methacrylic polymer-based supports. *Bioresource Technology*, 266, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.070>
- Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., y Kohlbacher, O. (2011). NRSPredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W362–W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr323>
- Ruijne, F., y Kuipers, O. P. (2021). Combinatorial biosynthesis for the generation of new-to-nature peptide antimicrobials. *Biochemical Society Transactions*, 49(1), 203–215. <https://doi.org/10.1042/BST20200425>
- Salam, N., Jiao, J. Y., Zhang, X. T., y Li, W. J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1331–1355. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>
- Sawadogo, W., Boly, R., Cerella, C., Teiten, M., Dicato, M., y Diederich, M. (2015). A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer



- Activity Reported in 2012. *Molecules*, 20(4), 7097–7142.
<https://doi.org/10.3390/molecules20047097>
- Schmitt-John, T., y Engels, Joachim W. (1992). Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(4).
<https://doi.org/10.1007/BF00170190>
- Schatz, A., Bugie, E., y Waksman, S. A. (2005). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clinical orthopaedics and related research*, (437), 3–6.
<https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe>
- Schultz, A. W., Oh, D.-C., Carney, J. R., Williamson, R. T., Udvary, D. W., Jensen, P. R., Gould, S. J., Fenical, W., y Moore, B. S. (2008). Biosynthesis and Structures of Cyclomarins and Cyclomarazines, Prenylated Cyclic Peptides of Marine Actinobacterial Origin. *Journal of the American Chemical Society*, 130(13), 4507–4516. <https://doi.org/10.1021/ja711188x>
- Schulz, D., Beese, P., Ohlendorf, B., Erhard, A., Zinecker, H., Dorador, C., y Imhoff, J. F. (2011). Abenquines A–D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *The Journal of Antibiotics*, 64(12), 763–768.
<https://doi.org/10.1038/ja.2011.87>
- Schwartz, D., Berger, S., Heinzemann, E., Muschko, K., Welzel, K., y Wohlleben, W. (2004). Biosynthetic Gene Cluster of the Herbicide Phosphinothricin Tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7093–7102. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7093-7102.2004>
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., y Hutchings, M. I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 862–876.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>
- Seipke, R. F., Song, L., Bicz, J., Laskaris, P., Yaxley, A. M., Challis, G. L., y Loria, R. (2011). The plant pathogen *Streptomyces scabies* 87-22 has a functional pyochelin biosynthetic pathway that is regulated by TetR- and AfsR-family proteins. *Microbiology*, 157(9), 2681–2693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.047977-0>
- Serino, L., Reimann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V. D., y Haas, D. (1997). Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 248–257. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.248-257.1997>
- Shaaban, K. A., Saunders, M. A., Zhang, Y., Tran, T., Elshahawi, S. I., Ponomareva, L. V., Wang, X., Zhang, J., Copley, G. C., Sunkara, M., Kharel, M. K., Morris, A. J., Hower, J. C., Tremblay, M. S., Prendergast, M. A., y Thorson, J. S. (2017). Spoxazomicin D and Oxachelin C, Potent Neuroprotective Carboxamides from the Appalachian Coal



- Fire-Associated Isolate *Streptomyces* sp. RM-14-6. *Journal of Natural Products*, 80(1), 2–11. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00948>
- Shaw, J. P., Rekik, M., Schwager, F., y Harayama, S. (1993). Kinetic studies on benzyl alcohol dehydrogenase encoded by TOL plasmid pWVO. A member of the zinc-containing long chain alcohol dehydrogenase family. *The Journal of biological chemistry*, 268(15), 10842–10850.
- Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A. M., Berg, C., y Walsh, C. T. (1999). Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chemistry & biology*, 6(6), 385–400. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80050-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80050-7)
- Shelton, C. L., y Lamb, A. L. (2018). Unraveling the Structure and Mechanism of the MST(ery) Enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(5), 342–357. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.02.011>
- Skinnider, M. A., Dejong, C. A., Rees, P. N., Johnston, C. W., Li, H., Webster, A. L. H., Wyatt, M. A., y Magarvey, N. A. (2015). Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Research*, gkv1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1012>
- Slonczewski, J. L., y Foster, J. W. (2013). *Microbiology an evolving science* (3^o). W W Norton y Company.
- Smanski, M. J., Peterson, R. M., Rajski, S. R., y Shen, B. (2009). Engineered *Streptomyces platensis* Strains That Overproduce Antibiotics Platensimycin and Platencin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1299–1304. <https://doi.org/10.1128/AAC.01358-08>
- Sommer Patricia S.M., Rosemary C. Almeida, Kathrin Schneider, Winfried Beil, Roderich D. Süßmuth, y Hans-Peter Fiedler. (2008). Nataxazole, a New Benzoxazole Derivative with Antitumor Activity Produced by *Streptomyces* sp. Tü 6176. *The Journal of Antibiotics*, 6(11), 683–686.
- Song, F., Liu, N., Liu, M., Chen, Y., y Huang, Y. (2018). Identification and characterization of mycemycin biosynthetic gene clusters in *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012 and *Streptomyces* sp. FXJ1.235. *Marine Drugs*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/md16030098>
- Summers, R. G., Wendt-Pienkowski, E., Motamedi, H., y Hutchinson, C. R. (1992). Nucleotide sequence of the tcmII-tcmIV region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the *tcmN* gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase. *Journal of bacteriology*, 174(6), 1810–1820. <https://doi.org/10.1128/jb.174.6.1810-1820.1992>



- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., y Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 6(8), 493–505. <http://biomednet.com/elecref/1074552100600493>
- Strieker, M., Tanović, A., y Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.009>
- Subramani, y Sipkema. (2019). Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs*, 17(5), 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
- Sun, Y., He, X., Liang, J., Zhou, X., y Deng, Z. (2009). Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 303–310. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1793-7>
- Süssmuth, R. D., y Mainz, A. (2017). Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 56(14), 3770–3821. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>
- Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Muñoz, J. C., Avalon, N. E., Chevrette, M. G., Egbert, S., Lee, S., Meijer, D., Recchia, M. J. J., Reitz, Z. L., van Santen, J. A., Selem-Mojica, N., Tørring, T., Zaroubi, L., Alanjary, M., Aleti, G., Aguilar, C., Al-Salihi, S. A. A., Augustijn, H. E., ... Medema, M. H. (2023). MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D603–D610. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1049>
- Thirlway, J., Lewis, R., Nunns, L., Al Nakeeb, M., Styles, M., Struck, A., Smith, C. P., y Micklefield, J. (2012). Introduction of a Non-Natural Amino Acid into a Nonribosomal Peptide Antibiotic by Modification of Adenylation Domain Specificity. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(29), 7181–7184. <https://doi.org/10.1002/anie.201202043>
- Tornin, J., Martínez-Cruzado, L., Santos, L., Rodríguez, A., Núñez, L.-E., Oro, P., Hermosilla, M. A., Allonca, E., Fernández-García, M. T., Astudillo, A., Suarez, C., Morís, F., y Rodríguez, R. (2016). Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma. *Oncotarget*, 7(21), 30935–30950. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8817>
- Trivedi, O. A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., y Gokhale, R. S. (2004). Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature*, 428(6981), 441–445. <https://doi.org/10.1038/nature02384>
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., y van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546–558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>



- van Keulen, G., y Dyson, P. J. (2014). Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Advances in Applied Microbiology*, 89, 217–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00006-8>
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., y Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
- Walsh, C. T., Haynes, S. W., y Ames, B. D. (2012). Aminobenzoates as building blocks for natural product assembly lines. *Nat. Prod. Rep.*, 29(1), 37–59. <https://doi.org/10.1039/C1NP00072A>
- Walsh, C. T., O'Brien, R. V., y Khosla, C. (2013). Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(28), 7098–7124. <https://doi.org/10.1002/anie.201208344>
- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., y 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>
- Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., y Marchler-Bauer, A. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D384–D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
- Wang, W., Li, X., Wang, J., Xiang, S., Feng, X., y Yang, K. (2013). An Engineered Strong Promoter for Streptomyces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4484–4492. <https://doi.org/10.1128/AEM.00985-13>
- Weber, W., Zähler, H., Siebers, J., Schröder, K., y Zeeck, A. (1979). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 175. Mitteilung. Tetracenomycin C. *Archives of Microbiology*, 121(2), 111–116. <https://doi.org/10.1007/BF00689973>
- Weissman, K. J. (2015). The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 660–670. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1883>
- Wenski, S. L., Thiengmag, S., y Helfrich, E. J. N. (2022). Complex peptide natural products: Biosynthetic principles, challenges and opportunities for pathway engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(1), 631–647. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.01.007>



- Wink, J., Mohammadipanah, F., y Hamed, J. (2017). Biology and biotechnology of actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1>
- Witt D, y Stackebrandt E. (1991). Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3), 456.
- Wittmann, M., Linne, U., Pohlmann, V., y Marahiel, M. A. (2008). Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin. *The FEBS Journal*, 275(21), 5343–5354. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06664.x>
- Xia, H., Li, X., Li, Z., Zhan, X., Mao, X., y Li, Y. (2020). The Application of Regulatory Cascades in *Streptomyces*: Yield Enhancement and Metabolite Mining. *Frontiers in Microbiology*, 11, 406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00406>
- Xu, M., y Wright, G. D. (2019). Heterologous expression-facilitated natural products' discovery in actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(3–4), 415–431. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2097-2>
- Yagüe, P., Lopez-Garcia, M. T., Rioseras, B., Sanchez, J., y Manteca, A. (2012). New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. *Current Trends in Microbiology*, 8, 65–73.
- Yan, Y., y Xia, H. (2024). The roles of SARP family regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1368809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1368809>
- Yang, L., Li, X., Wu, P., Xue, J., Xu, L., Li, H., y Wei, X. (2020). Streptovertimycins A–H, new fasamycin-type antibiotics produced by a soil-derived *Streptomyces morookaense* strain. *The Journal of Antibiotics*, 73(5), 283–289. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0277-6>
- Ye, S., Molloy, B., Braña, A. F., Zabala, D., Olano, C., Cortés, J., Morís, F., Salas, J. A., y Méndez, C. (2017). Identification by Genome Mining of a Type I Polyketide Gene Cluster from *Streptomyces argillaceus* Involved in the Biosynthesis of Pyridine and Piperidine Alkaloids Argimycins P. *Frontiers in Microbiology*, 8, 194. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00194>
- Ye, S., Molloy, B., Pérez-Victoria, I., Montero, I., Braña, A. F., Olano, C., Arca, S., Martín, J., Reyes, F., Salas, J. A., y Méndez, C. (2023). Uncovering the Cryptic Gene Cluster *ahb* for 3-amino-4-hydroxybenzoate Derived Ahbamycins, by Searching SARP Regulator Encoding Genes in the *Streptomyces argillaceus* Genome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8197. <https://doi.org/10.3390/ijms24098197>



- Yeh, E., Kohli, R. M., Bruner, S. D., y Walsh, C. T. (2004). Type II Thioesterase Restores Activity of a NRPS Module Stalled with an Aminoacyl-S-enzyme that Cannot Be Elongated. *ChemBioChem*, 5(9), 1290–1293. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400077>
- Yin, S., Wang, W., Wang, X., Zhu, Y., Jia, X., Li, S., Yuan, F., Zhang, Y., y Yang, K. (2015). Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0231-7>
- Yñígez-Gutierrez, A. E., y Bachmann, B. O. (2019). Fixing the Unfixable: The Art of Optimizing Natural Products for Human Medicine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(18), 8412–8428. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00246>
- Zhang, Z., Zhou, R., Sauder, J. M., Tonge, P. J., Burley, S. K., y Swaminathan, S. (2011). Structural and Functional Studies of Fatty Acyl Adenylate Ligases from *E. coli* and *L. pneumophila*. *Journal of Molecular Biology*, 406(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.011>
- Zhao, B., Moody, S. C., Hider, R. C., Lei, L., Kelly, S. L., Waterman, M. R., y Lamb, D. C. (2012). Structural Analysis of Cytochrome P450 105N1 Involved in the Biosynthesis of the Zincophore, Coelibactin. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8500–8513. <https://doi.org/10.3390/ijms13078500>
- Zhao, Z., Shi, T., Xu, M., Brock, N. L., Zhao, Y.-L., Wang, Y., Deng, Z., Pang, X., y Tao, M. (2016). Hybrubins: Bipyrrrole Tetramic Acids Obtained by Crosstalk between a Truncated Undecylprodigiosin Pathway and Heterologous Tetramic Acid Biosynthetic Genes. *Organic Letters*, 18(3), 572–575. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b03609>
- Zhu, D., Seo, M.-J., Ikeda, H., y Cane, D. E. (2011). Genome Mining in *Streptomyces*. Discovery of an Unprecedented P450-Catalyzed Oxidative Rearrangement That Is the Final Step in the Biosynthesis of Pentalenolactone. *Journal of the American Chemical Society*, 133(7), 2128–2131. <https://doi.org/10.1021/ja111279h>
- Zummo, F. P., Marineo, S., Pace, A., Civiletti, F., Giardina, A., y Puglia, A. M. (2012). Tryptophan catabolism via kynurenine production in *Streptomyces coelicolor*: identification of three genes coding for the enzymes of tryptophan to anthranilate pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3833-y>
- Zwahlen, R. D., Pohl, C., Bovenberg, R. A. L., y Driessen, A. J. M. (2019). Bacterial MbtH-like Proteins Stimulate Nonribosomal Peptide Synthetase-Derived Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *ACS Synthetic Biology*, 8(8), 1776–1787. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00106>





VIII. ANEXOS





VIII. ANEXOS

Anexo I: Estudio de homologías de los productos génicos del BGC 8 de *S. glaucescens* con las otras cepas cuyas secuencias genómicas se encuentran fragmentadas que imposibilitan el estudio.

Tabla 42. Otras cepas del estudio de homologías del BGC 8 de *S. glaucescens*

<i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O		<i>Streptomyces pharetrae</i> CZA14		<i>Streptomyces halstedii</i> SID11342		<i>Streptomyces</i> sp. WMMB 714	
<i>orf</i> ^{*1}	Número aa	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %	Nº de acceso	Ident. %
1	430	OSZ60723.1	88	-	-	-	-
2	157	-	-	-	-	-	-
3	388	OSZ60725.1	99	-	-	-	-
4	481	OSZ60726.1	97	-	-	-	-
5	402	OSZ60727.1	96	-	-	-	-
6	339	OSZ60728.1	97	-	-	-	-
7	199	OSZ60729.1	93	-	-	-	-
8	454	None ^{*2}	95	-	-	-	-
9	507	OSZ60730.1	97	-	-	-	-
10	313	OSZ60735.1	87	-	-	-	-
11	658	OSZ60732.1	91	WP_164350286.1	71	WP_052708374.1	62
12	452	OSZ60737.1	89	WP_164342850.1	56	WP_045862087.1	63
13	614	OSZ60733.1	98	WP_164343057.1	88	WP_045865477.1	85
14	1321	OSZ60734.1	90	WP_164347071.1	72	-	-
15	498	OSZ60738.1	94	-	-	WP_045865476.1	77
16	256	OSZ60739.1	97	-	-	WP_199810833.1	71
17	191	OSZ60740.1	98	-	-	WP_199810832.1	81
18	267	-	-	WP_203631490.1	80	WP_045865475.1	78
19	571	OSZ57881.1	99	-	-	-	-
20	586	OSZ57875.1	97	WP_203631489.1	86	WP_045865473.1	86
21	361	-	-	WP_164343053.1	80	WP_078895812.1	80
22	1414	OSZ57876.1	90	WP_269153217.1	76	WP_052708628.1	74
23	1537	OSZ57877.1	93	WP_164343048.1	78	WP_052708627.1	75
24	603	OSZ57878.1	96	WP_164343047.1	79	WP_045865634.1	77
25	235	OSZ57879.1	96	WP_239084902.1	80	WP_045865472.1	74
26	162	OSZ57882.1	99	-	-	WP_045865471.1	90
27	75	OSZ57880.1	96	-	-	WP_045865470.1	73
28	335	OSZ55294.1	94	-	-	WP_139131646.1	71
29	201	OSZ57359.1	98	-	-	WP_045862107.1	74
30	522	OSZ57352.1	97	-	-	WP_074467923.1	84
31	415	OSZ57353.1	99	WP_239085196.1	86	WP_045865469.1	88
32	248	OSZ57354.1	98	WP_164347514.1	82	WP_045865468.1	79
33	255	OSZ57360.1	92	WP_239085195.1	67	WP_158715450.1	68
34	536	OSZ57355.1	97	WP_164347518.1	84	WP_045865466.1	84
35	450	None ^{*2}	97	WP_203633593.1	78	WP_045866609.1	81
36	219	OSZ57356.1	93	-	-	WP_175439823.1	81



37	181	OSZ57361.1	91	WP_164347508.1	75	WP_254666952.1	71
38	439	OSZ57357.1	93	WP_164347506.1	79	WP_045866475.1	74
39	177	OSZ57362.1	97	-	-	WP_045866476.1	81
40	230	OSZ57358.1	97	WP_164350288.1	65	-	-
41	100	<u>OSZ55783.1</u>	97	-	-	WP_045862096.1	57
42	599	<u>OSZ55782.1</u>	99	-	-	WP_045862097.1	82
43	303	<u>OSZ55781.1</u>	96	WP_264178762.1	62	WP_078895381.1	71
44	576	OSZ61694.1	55	-	-	-	-
45	546	OSZ55479.1	95	WP_103490075.1	74	WP_052708376.1	73
46	906	OSZ55496.1	97	WP_164344822.1	82	WP_045862098.1	79
47	92	OSZ55856.1	98	-	-	WP_045862099.1	77
48	188	OSZ55857.1	94	WP_164344824.1	73	WP_074467648.1	66
49	88	OSZ55858.1	100	-	-	WP_045862100.1	79
50	288	OSZ55859.1	97	WP_164344151.1	69	WP_045862101.1	75
51	334	OSZ55860.1	96	WP_103490081.1	82	WP_045862102.1	79
52	275	OSZ55861.1	99	WP_103490082.1	82	WP_045862103.1	77
53	81	OSZ55862.1	98	WP_164344149.1	83	-	-
54	292	OSZ55863.1	99	-	-	WP_254666648.1	88
55	326	OSZ55294.1	93	-	-	WP_139131646.1	71
56	201	<u>OSZ55831.1</u>	99	-	-	WP_045862107.1	74
57	1827	<u>OSZ55832.1</u>	91	-	-	-	-
58	380	OSZ56213.1	89	WP_164350284.1	65	-	-
59	1496	-	-	WP_164343048.1	56	WP_052708627.1	55
60	532	OSZ57407.1	94	-	-	WP_078895380.1	77
61	221	OSZ57406.1	94	WP_164350288.1	72	WP_045862088.1	56
62	403	OSZ57405.1	96	WP_164343043.1	84	WP_045866473.1	83
63	522	OSZ57404.1	95	WP_164343041.1	82	WP_074468025.1	79
64	161	OSZ57403.1	89	-	-	-	-
65	486	OSZ57401.1	96	-	-	-	-
66	408	OSZ57400.1	95	-	-	-	-
67	320	OSZ57399.1	94	-	-	-	-
68	554	OSZ57398.1	97	-	-	-	-
69	362	-	-	-	-	-	-
70	554	OSZ57398.1	97	-	-	-	-
71	371	-	-	-	-	-	-
72	321	<u>OSZ55633.1</u>	95	-	-	-	-
73	422	<u>OSZ55634.1</u>	96	-	-	-	-
74	209	<u>OSZ55635.1</u>	95	-	-	-	-

aa: aminoácido; **Ident.** (%): porcentaje de aminoácidos idénticos; *¹: funciones génicas en la tabla 34; *²: proteínas sin número de acceso asignado.