



universidad
de león



Departamento de Biología Molecular

Area de Microbiología

Caracterización de la agrupación génica de
biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos
especies del género *Streptomyces*.
Estudio de su regulación.



TESIS DOCTORAL

Elena Solera Segura
León, 2014

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo personal, técnico y académico de un gran número de personas que han facilitado de manera inestimable la realización de este trabajo.

En primer lugar agradecer al Dr. Juan Francisco Martín, director de esta tesis, por creer en mí ya desde mi época de estudiante, por permitirme desarrollar este proyecto bajo su tutela.

A Alberto Sola, codirector de esta Tesis, por introducirme y guiarme en el mundo de la investigación, por mostrarme su brillantez, por su supervisión tolerante con margen para la experimentación bajo iniciativa propia y por su meticulosa corrección de la memoria.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca predoctoral asociada al proyecto Bio2006-14853-c02-01, en el cual se enmarca este trabajo.

A Patricia por su gran eficacia y eficiencia en la secuenciación de los cósmidos. Por estar siempre con una sonrisa en la cara y por ser una gran AMIGA. A Maite por su ayuda con las extracciones de ARN, por ser de esas amigas que sabes que nunca te fallan, sin duda lo mejor de la recta final de la Tesis. A Claudia por su ayuda en el análisis de las qRT-PCR, por ser una gran compañera de viaje y por estar siempre dispuesta a ayudar. A Javi por su ayuda con cualquier duda de laboratorio, por las charlas infinitas a última hora y por su estima. A Rubén por los buenos momentos compartidos. A Angelina por su calidad y amistad. A Lara por ayudarme en los comienzos, aunque separadas los lazos siguen ahí.

A Silvia por su siempre disposición y por su asistencia técnica con el HPLC. A Miriam y Zahara por su ayuda con el cultivo de *Streptomyces tacrolimicus*, hicimos lo que pudimos con nuestra querida cepa. A Carlos Barreiro por contar conmigo para participar en el proyecto de secuenciación y demás colaboraciones. A Antonio por su siempre paciencia y disposición. A Rosma por su claridad y buena conversación.

Al resto de compañeros de INBIOTEC que habéis ayudado a crear un inmejorable ambiente de trabajo especialmente a Clara, Mar, Maria, Nuria y Tamara por vuestras amenas charlas.

A Andrea, Bea, Alcira, Berna y Josefina por su profesionalidad y apoyo administrativo y técnico.

A mis padres, mi referencia de esfuerzo y trabajo duro, gracias por proporcionarme un ambiente estable en el que poder desarrollarme, gracias por vuestro apoyo incondicional, soy lo que soy gracias a vosotros. A Rubenín, un claro ejemplo de que los límites no vienen impuestos sino que los marcamos nosotros mismos, eres nuestro orgullo. A Rubén y Vladí gracias por vuestro cariño. A la pequeña Sofía gracias por inundar la familia de alegría.

A mis padres y hermanos

Abreviaturas y acrónimos

Se presentan a continuación las abreviaturas y acrónimos empleados a lo largo de esta memoria. Se excluyen en general las soluciones y medios descritos en el capítulo “Materiales y métodos”.

AcNa: Acetato sódico	HK: histidina quinasa
ACP: proteína transportadora de grupos acilo	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
ADNc: ADN complementario	HTH: hélice-vuelta-hélice
ADNg: ADN total o genómico	IPTG: 1-isopropil- β -D-galactopiranosido
antibiótico^R: resistente a un determinado antibiótico	kb: kilopares de bases
antibiótico^S: sensible a un determinado antibiótico	KCTC: colección de cultivos tipo coreana
Apr: apramicina	Kn: kanamicina
ARNr: ARN ribosomal	KR: cetoreductasa
ARNt: ARN de transferencia	KS: cetosintasa
AT: aciltransferasa	LAL: proteína de gran tamaño de unión a ATP de la familia LuxR
ATCC: colección americana de cultivos tipo	M: molar.
AU: unidades de absorbancia	MCS: sitio de clonación múltiple
AZA: azatioprina	MMF: micofenolato de mofetilo
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico	MTBE: metilterbutileter
CoA: coenzima A	nm: nanómetro
CsA: ciclosporina A	NRPS: péptido sintasa no ribosomal
Ct: C-terminal	Nt: N-terminal
CTAB: bromuro de cetil-trimetil amonio	nt: nucleótido
DH: deshidratasa	ORF: marco de lectura abierto
DCDC: 4,5 dihidroxi-1,5-dienocarboxílico	pb: pares de bases
DHCHC: ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico	PKS(s): policétido sintasa(s)
DMSO: dimetilsulfóxido	PT: proteínas terminales
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	QS: quórum sensing
ER: enoil reductasa	RIN: número de integridad del ARN
FAS: sintasa de ácidos grasos	rpm: revoluciones por minuto
FDA: agencia del medicamento de los EEUU	RR: Regulador de respuesta
GlcNAc: N-acetil glucosamina	SDS: docedil sulfato sódico
HK: Histidina quinasa	T^a: Temperatura
	TE: tioesteresa
	TFA: ácido trifluoro acético

TFR: familia reguladores transcripcionales TetR **vol / v:** volumen

TIR: Repeticiones terminales invertidas

WT: fenotipo salvaje (wild type).

Tm: temperatura de fusión

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-

Tris: tris-hidroximetil-aminometano

- β -D-galactopiranosido

Glosario de términos coloquiales en medicina pero que no están recogidos en la RAE:

Sintenia

Clado

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	3
1.1.1.	TAXONOMÍA DEL GÉNERO	3
1.1.2.	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	4
1.1.3.	ECOLOGÍA DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	6
1.1.3.1.	Importancia ecológica de <i>Streptomyces</i>	7
1.1.4.	CICLO DE VIDA DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	8
1.1.5.	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	13
1.1.5.1.	El cromosoma	13
1.1.5.2.	Estructura cromosómica	13
1.1.5.3.	Organización del cromosoma	15
1.1.5.4.	Cromosoma lineal e inestabilidad génica: ventaja adaptativa	16
1.1.5.5.	Elementos genéticos extracromosomales.....	17
1.2.	FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES: TACROLIMUS.....	19
1.2.1.	HISTORIA DE LOS INMUNOSUPRESORES	19
1.2.2.	INDUSTRIA FARMACÉUTICA: IMPORTANCIA ECONÓMICA DE TACROLIMUS.....	23
1.2.3.	BIOSÍNTESIS DE TACROLIMUS	25
1.2.3.1.	Policétido sintasa de tacrolimus: síntesis de pre-tacrolimus.....	25
1.2.3.2.	Modificaciones post-PKS: Funcionalización de tacrolimus	27
1.2.3.3.	Tacrolimus y sus análogos	27
1.2.3.4.	Rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de tacrolimus	28
1.2.4.	ESPECIES PRODUCTORAS DE TACROLIMUS.....	33
1.2.4.1.	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	33
1.2.4.2.	<i>Streptomyces tacrolimicus</i>	34
1.3.	METABOLISMO SECUNDARIO Y SU REGULACIÓN	36
1.3.1.	GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i> : GRAN PRODUCTOR DE METABOLITOS SECUNDARIOS	36
1.3.2.	REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN <i>STREPTOMYCES</i>	38
1.3.2.1.	Reguladores globales	39
1.3.2.1.1.	Reguladores globales de la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios	39
1.3.2.1.2.	Reguladores pleiotrópicos de la biosíntesis de antibióticos	44
1.3.2.2.	Reguladores específicos de ruta	48
1.3.2.2.1.	Familia de reguladores SARP.....	49
1.3.2.2.2.	Familia de reguladores LuxR	50
1.3.2.2.3.	Familia de reguladores TetR	53
1.3.2.2.4.	Familia de reguladores LysR.....	54
1.4.	OBJETIVOS	55
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1.	MICROORGANISMOS UTILIZADOS	59
2.1.1.	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	59
2.1.2.	Cepas pertenecientes al género <i>Streptomyces</i>	60
2.1.3.	Otros microorganismos	60
2.1.4.	Crecimiento y conservación de los microorganismos	60
2.2.	MEDIOS DE CULTIVO.....	61
2.2.2.	Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i> spp.....	62
2.2.3.	Otros medios de cultivo	64
2.2.4.	Aditivos empleados en los medios de cultivo	65
2.3.	VECTORES PLASMÍDICOS	65
2.3.1.	Plásmidos de <i>E. coli</i>	65
2.3.2.	Plásmidos de <i>Streptomyces</i> spp.....	67

2.4. PRODUCTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	67
2.4.1. Enzimas	67
2.4.2. Marcadores de peso molecular	67
2.4.3. Oligonucleótidos	68
2.4.4. Conjunto de reactivos comerciales	68
2.5. EXTRACCIÓN DE ADN	69
2.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	69
2.5.1.1. Extracción a gran escala: Lisis alcalina	69
2.5.1.2. Extracción a pequeña escala: Minipreparaciones (minipreps)	70
2.5.2. Aislamiento de ADN total de <i>Streptomyces</i>	70
2.6. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	71
2.6.1. Extracción de ADN de geles de agarosa	72
2.6.1.1. Método de congelación rápido (<i>Freeze-squeeze</i>)	72
2.6.1.2. Extracción mediante QIAEX® II <i>Gel Extraction Kit</i>	73
2.6.1.3. Extracción mediante <i>GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	73
2.6.2. Evaluación de la concentración y análisis de pureza del ADN	73
2.7. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN	74
2.7.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción	74
2.7.2. Desfosforilación de los extremos 5' libres del ADN	74
2.7.3. Ligación de fragmentos de ADN	74
2.8. MÉTODO DE HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN	75
2.8.1. Transferencia de ácidos nucleicos	75
2.8.2. Marcaje de sondas para <i>Southern</i>	76
2.8.3. Hibridación ADN-ADN	77
2.8.4. Detección de ADN	78
2.9. REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR)	80
2.9.1. Reacción de PCR	80
2.10. SECUENCIACIÓN DEL ADN	81
2.11. INTRODUCCIÓN DE ADN EN MICROORGANISMOS	82
2.11.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	82
2.11.1.1. Inducción del estado de competencia	83
2.11.1.2. Procedimiento de transformación por choque térmico	84
2.11.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	85
2.11.3. Transferencia de ADN de <i>E. coli</i> a <i>Streptomyces</i> spp. mediante conjugación	85
2.12. OBTENCIÓN DE MUTANTES MEDIANTE REDIRECT®	86
2.12.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR	88
2.12.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR	88
2.12.3. Amplificación del casete de resistencia	89
2.12.4. Transformación de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 con cósmidos de <i>Streptomyces</i>	89
2.12.5. Inactivación del gen de <i>Streptomyces</i> en el cósmido	90
2.12.6. Transferencia del cósmido recombinante a <i>Streptomyces</i>	90
2.13. MÉTODOS RELACIONADOS CON LA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN	91
2.13.1. Aislamiento de ARN total de <i>S. tacrolimicus</i>	91
2.13.2. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN	93
2.13.2.1. Concentración y pureza del ARN	93
2.13.2.2. Integridad del ARN	93

2.14. TÉCNICAS APLICADAS EN EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	94
2.14.1. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	94
2.14.1.1. Retrotranscripción	94
2.14.1.2. PCR a tiempo real	95
2.14.1.3. Cuantificación de la expresión génica	96
2.15. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE TACROLIMUS.....	97
2.15.1. Tratamiento de las muestras de fermentación	97
2.15.2. Cuantificación de tacrolimus	98
2.16. ANÁLISIS INFORMÁTICO	99
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
3.1. SECUENCIACIÓN DE LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i>	103
3.1.1. ORGANIZACIÓN DE LA GENOTECA	104
3.1.2. RASTREO DE LA GENOTECA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR	106
3.1.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos	106
3.1.2.2. Rastreo de la genoteca	108
3.1.3. SECUENCIACIÓN DE LOS CÓSMIDOS	111
3.1.4. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DE LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i>	114
3.1.4.1. Genes implicados en la síntesis del anillo macrólido de tacrolimus	115
3.1.4.2. Genes implicados en la síntesis de la unidad iniciadora.....	116
3.1.4.3. Genes implicados en la síntesis de la unidad extendedora metoximalonil-ACP	116
3.1.4.4. Genes implicados en la síntesis de la unidad extendedora alimalonil-CoA	122
3.1.4.5. Genes implicados en las modificaciones post-PKS: Funcionalización del policétido	125
3.1.4.6. Genes reguladores.....	126
3.1.4.7. Otros genes.....	131
3.2. SECUENCIACIÓN DE LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE TACROLIMUS EN <i>STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS</i> NRRL 18488	136
3.2.1. ORGANIZACIÓN DE LA GENOTECA DE CÓSMIDOS DE <i>S. TSUKUBAENSIS</i> NRRL 18488	136
3.2.2. RASTREO DE LA GENOTECA DE CÓSMIDOS DE <i>S. TSUKUBAENSIS</i> NRRL 18488	136
3.2.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos para el rastreo de la genoteca	136
3.2.3. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE <i>S. TSUKUBAENSIS</i> NRRL 18488	138
3.2.3.1. Primera secuenciación del genoma	138
3.2.3.2. Segunda secuenciación del genoma	138
3.2.4. EDITADO MANUAL DE LA SECUENCIA DE LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE TACROLIMUS	139
3.2.5. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DE LA AGRUPACIÓN GÉNICA DE TACROLIMUS EN <i>S. TSUKUBAENSIS</i> NRRL 18488	141
3.2.5.1. Genes nuevos encontrados en la agrupación génica de tacrolimus de <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	142
3.2.6. COMPARATIVA DE LAS AGRUPACIONES GÉNICAS DE TACROLIMUS ENTRE ESPECIES PRODUCTORAS DEL INMUNOSUPRESOR.....	146
3.2.6.1. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de biosíntesis de tacrolimus entre <i>S. tsukubaensis</i> y las distintas especies productoras de tacrolimus y FK520	146
3.2.6.2. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de biosíntesis de tacrolimus entre <i>S. tacrolimicus</i> y las secuencias de proteínas de distintas especies productoras de tacrolimus y FK520.....	148
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i>	150
3.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i>	150
3.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i> MEDIANTE SU CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.	151
3.3.3. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE TACROLIMUS MEDIANTE BIOENSAYO.....	152
3.3.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE TACROLIMUS MEDIANTE HPLC.....	154

3.4.	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS POSIBLES GENES REGULADORES DE RUTA DE TACROLIMUS EN <i>S. TACROLIMICUS</i>	156
3.4.1.1.1.	Inactivación del gen regulador <i>fbkN</i>	156
3.4.1.1.2.	Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante <i>Streptomyces tacrolimicus:ΔfbkN</i>	159
3.4.1.1.3.	Introducción del gen <i>fbkN</i> en multicopia en <i>S. tacrolimicus</i> y <i>S. tacrolimicus:ΔfbkN</i>	160
3.4.1.1.4.	Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante <i>S. tacrolimicus:ΔfbkN</i> y la cepa silvestre tras la introducción del gen <i>fbkN</i> en multicopia	160
3.4.1.2.1.	Análisis funcional del gen <i>orfD</i>	162
3.4.1.2.2.	Inactivación del gen <i>orfD</i>	162
3.4.1.2.3.	Análisis de la inactivación del gen <i>orfD</i>	163
3.4.1.2.4.	Introducción del gen <i>orfD</i> en multicopia en la cepa <i>S. tacrolimicus</i> y <i>S. tacrolimicus:ΔorfD</i>	164
3.4.1.2.5.	Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante <i>S. tacrolimicus:ΔorfD</i> y la cepa silvestre tras la introducción del gen <i>orfD</i> en multicopia	165
3.4.1.3.1.	Análisis funcional del gen <i>orfX</i>	165
3.4.1.3.2.	Inactivación del gen <i>orfX</i>	165
3.4.1.3.3.	Introducción del gen <i>orfX</i> en multicopia en la cepa <i>S. tacrolimicus</i>	167
3.4.1.3.4.	Análisis de la producción de tacrolimus en la cepa silvestre tras la introducción del gen <i>orfX</i> en multicopia	167
3.4.1.4.1.	Análisis funcional del gen <i>orfW</i>	168
3.4.1.4.2.	Inactivación del gen <i>orfW</i>	168
3.4.1.4.3.	Introducción del gen <i>orfW</i> en multicopia en la cepa <i>S. tacrolimicus</i>	169
3.4.1.4.4.	Análisis de la producción de tacrolimus en la cepa silvestre tras la introducción del gen <i>orfW</i> en multicopia	169
3.5.	DISCUSIÓN GENERAL	180
4.	CONCLUSIONES	187
5.	BIBLIOGRAFÍA	191
6.	ANEXOS	221
6.1.	OLIGONUCLEÓTIDOS	223
6.2.	PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES CIENTÍFICAS	227

1. Introducción

1.1. Género *Streptomyces*

1.1.1. Taxonomía del género

La taxonomía de las actinobacterias ha sido actualizada periódicamente. En 2001 se publicó el primer volumen de la segunda edición del “Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology”, en la cual se hace una clasificación fundamentalmente filogenética en lugar de fenotípica, y por consiguiente, muy diferente de la primera edición. Esta segunda edición consta de 5 volúmenes, transcurriendo 12 años desde el lanzamiento del primer volumen hasta el quinto y último volumen publicado en 2012. El volumen V está dedicado a un grupo filogenéticamente compacto denominado *Actinobacteria*, al que se ha asignado la categoría taxonómica de filo y dentro del cual se encuadra el género *Streptomyces*, objeto de estudio de este trabajo (Ludwig *et al.*, 2012).

El filo *Actinobacteria* se encuentra sólidamente respaldado por el análisis de los genes que codifican los ARNr 16S y 23S, la presencia de inserciones y deleciones conservadas en determinadas proteínas y reorganizaciones génicas características (Goodfellow y Fiedler, 2010). El marco filogenético de este V volumen dedicado a las actinobacterias se construye en base a los análisis taxonómicos de Stackebrandt *et al.* (1997) y Zhi *et al.* (2009). Stackebrandt enmienda la descripción de la subclase *Actinobacteridae* y de la familia *Actinomycetaceae* propuesta por Buchanan (1918), mientras que Zhi *et al.* (2009) realizan una nueva enmienda de los grupos anteriores. Sin embargo, en la clasificación propuesta en el volumen V de esta segunda edición, aunque basándose en el marco filogenético anterior, se decide eliminar los rangos taxonómicos de subclase y suborden y los clados representados por estos rangos son elevados a los rangos de clase y orden, respectivamente. De este modo, se consigue un enclave taxonómico más consistente del filo *Actinobacteria*, donde el número de subdivisiones de los rangos superiores pasa de 6 (“Road Map to the manual” del volumen I y II de la segunda edición) (Garrity y Holt, 2001; Garrity *et al.*, 2005) a 4 en el volumen V de la segunda edición (Ludwig *et al.*, 2012) (Tabla 1.1). Esta nueva clasificación taxonómica conlleva importantes cambios: por un lado, la clase *Actinobacteria* excluye las subclases *Acidimicrobidae*, *Coriobacteridae*, *Nitriliruptoridae* y *Rubrobacteridae* debido a la elevación de éstas al rango de clases. Del mismo modo, con la elevación del suborden *Actinomycetales* a orden, éste se restringe únicamente a la familia *Actinomycetaceae*, mientras que los subórdenes *Micrococccineae* y *Pseudonocardineae* dejan de estar en uso.

Con esta nueva clasificación, el término “actinomycetales” incluye en sentido estricto únicamente a la familia *Actinomycetaceae*, aunque debido al uso generalizado del término no se excluye su uso en el sentido convencional.

Tabla 1.1. Enclave taxonómico del género *Streptomyces**

2ª Ed Bergey's Manual (Garrity <i>et al.</i> , 2005)	2ª Ed Bergey's Manual (Ludwig <i>et al.</i> , 2012)
Dominio <i>Bacteria</i> , Filo BXIV " <i>Actinobacteria</i> ", Clase I <i>Actinobacteria</i> , Subclase V <i>Actinobacteridae</i> , Orden I <i>Actinomycetales</i> , Suborden XIV <i>Streptomycineae</i> , Familia I <i>Streptomycetaceae</i> , Género I <i>Streptomyces</i> .	Dominio <i>Bacteria</i> , Filo XXVI " <i>Actinobacteria</i> ", Clase I <i>Actinobacteria</i> , Orden XIV <i>Streptomycetales</i> , Familia I <i>Streptomycetaceae</i> , Género I <i>Streptomyces</i> .

(*) En el volumen V de la segunda edición del Bergey's Manual, publicado en 2012, se observa una reducción del número de subdivisiones de los rangos taxonómicos del filo *Actinobacteria* de 6 a 4, siendo 6 las subdivisiones presentes en los volúmenes I y II de esta segunda edición.

1.1.2. Características biológicas del género *Streptomyces*

Aunque el origen evolutivo de los actinomicetos todavía no ha sido totalmente esclarecido, existen indicios que sitúan al último antecesor común de las actinobacterias hace 1500-2000 millones de años (Ma) como resultado de la primera oxigenación de la atmósfera.

En cuanto al género *Streptomyces*, su origen data hace 450 Ma, coincidiendo con la colonización de la Tierra por las plantas verdes y el consiguiente incremento del nivel de oxígeno atmosférico (Embley y Stackebrandt, 1994). Estos dos fenómenos fueron esenciales para la aparición de los miembros del género *Streptomyces* y ponen de manifiesto importantes características del género. Por un lado, la colonización de la Tierra por las plantas permitió el rápido desarrollo de las bacterias del género gracias a su capacidad para producir gran cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares como quitinasas, celulasas, o xilanasas, capaces de degradar eficazmente sustancias complejas como lignocelulosa, quitina o peptidoglicano procedente de plantas, hongos y otros organismos (Chater, 2006). Desde entonces, el género *Streptomyces* ha tenido un importante papel en la formación del suelo, participando activamente en los ciclos biogeoquímicos y contribuyendo notablemente a su mineralización.

Por otro lado, el incremento de oxígeno también fue un factor esencial para la aparición de los estreptomicetos, ya que salvo contadas excepciones, se considera que los miembros del género *Streptomyces* son aerobios estrictos con una limitada capacidad de crecimiento en condiciones microaerófilas (Kutzner, 1981). El crecimiento como aerobios o microaerófilos depende de las condiciones nutricionales del medio de cultivo. En medio ricos, los estreptomicetos crecen aeróbicamente en la superficie de una placa de agar semisólida,

mientras que en medios pobres o con fuentes de carbono no asimilable, crecen como microaerófilos. Sin embargo, los estreptomicetos, como principales representantes de la microbiota del suelo y como consecuencia de la naturaleza compleja de éste y de su necesidad de adaptación, han tenido que adquirir y desarrollar sistemas de respiración alternativa a la aerobia para sobrevivir a situaciones como la disminución de la concentración o la falta de oxígeno de manera temporal o local (suelos parcialmente mojados o inundados, lodos, etc). Por ello, y aunque no son muy abundantes, se han descrito algunas especies capaces de respirar nitrato como *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces nitrosporeus*, *Streptomyces thioluteus* o *Streptomyces coelicolor* que llevan a cabo la desasimilación incompleta del nitrato, y *Streptomyces antibioticus*, que es capaz de realizar la desnitrificación completa de nitrato a N₂, actuando todos ellos como anaerobios facultativos (Albrecht *et al.*, 1997; Kumon *et al.*, 2002; Shoun *et al.*, 1998). Sin embargo, la viabilidad mediante respiración anaerobia estricta solo ha sido referenciada en estado de espora. En *S. coelicolor* se ha demostrado que la presencia de 3 copias de la agrupación de nitrato reductasa respiratoria (*nar*) permite tanto a las esporas durmientes como a las germinativas sobrevivir durante varias semanas en ausencia total de oxígeno tras un crecimiento inicial microaeróbico (Fischer *et al.*, 2010; van Keulen *et al.*, 2003).

La mayoría de las especies del género *Streptomyces* son neutrófilas estando su pH de crecimiento entre 5,0 y 9,0 y siendo su óptimo cercano a pH 7. Son aisladas de forma asidua tanto en suelos neutros como alcalinos. Sin embargo, se han aislado cepas acidotolerantes y acidófilas en suelos ácidos que crecen en un intervalo de pH de 3,5 y 6,5 (óptimo entre 4,5 y 5,5). Las cepas acidófilas pueden producir exoenzimas que requieren un pH ácido y que juegan un papel importante en la descomposición de suelos ácidos y basura (Williams y Flowers, 1978). También han sido descritos estreptomicetos basotolerantes y basófilos con un pH óptimo de crecimiento entre 9 y 9,5. Mikami *et al.* (1982) describen cepas capaces de crecer a un pH de 11,5.

El género *Streptomyces* incluye mayormente especies mesófilas, creciendo a temperaturas entre 10 y 37 °C (óptima entre 25 y 35 °C), aunque algunas especies pueden crecer por encima de 37 °C actuando como termotolerantes. Se han descrito una minoría de especies termófilas que muestran crecimiento entre 28 y 55 °C, pudiendo crecer incluso a temperaturas superiores (Kim *et al.*, 1999). Se han aislado especies termófilas de muestras de suelo, estiércol, compost, aguas residuales y hábitats acuáticos (Cross, 1981; Ohta e Ikeda, 1978; Tandler y Burkholder, 1961). En cuanto a la T^a de cultivo, esta deberá establecerse en función del objetivo del estudio ya que la T^a óptima de crecimiento rápido y máximo rendimiento

puede no ser la mejor elección para estudiar la producción de metabolitos secundarios (Kutzner, 1981).

En cuanto al estilo de vida, existen escasas excepciones al modo saprofito. De las 11041 especies de *Streptomyces* descritas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), solo son reconocidas una docena de especies como parásitos de plantas, siendo *Streptomyces scabies*, la más extendida (Bignell *et al.*, 2010). En cuanto a infecciones humanas, se han descrito un escaso número de especies capaces de causar enfermedades, como las especies *Streptomyces somaliensis* y *Streptomyces sudanensis*, causantes del actinomicetoma (Quintana *et al.*, 2008), habiéndose descrito además varios casos de infecciones oportunistas por estreptomicetos (Kapadia *et al.*, 2007; Pellegrini *et al.*, 2012).

1.1.3. Ecología del género *Streptomyces*

Las bacterias del género *Streptomyces*, de manera mayoritaria, son habitantes del suelo. En la mayoría de los suelos los estreptomicetos constituyen entre el 1 y el 20 % del recuento total de viables (en inglés “total viable count”), que equivale a 10^4 - 10^7 unidades formadoras de colonia (u.f.c.) por gramo de suelo (Korn-Wendisch y Kutzner, 1992), constituyendo en algunos suelos la población dominante.

Aunque es frecuente aislar actinomicetos de muestras de agua dulce, sedimentos de ríos y lagos y de zonas costeras y sedimentos marinos, se considera que estos organismos no son parte de la microbiota autóctona y que probablemente derivan de hábitats terrestres (Cross, 1981). Sin embargo, los actinomicetos pueden sobrevivir como formas durmientes en hábitats acuáticos durante largos periodos. Esta cualidad para formar esporas junto con su capacidad para utilizar gran cantidad de fuentes de carbono han permitido su ubicuidad. Las esporas permiten resistir a condiciones adversas tanto nutricionales como de disponibilidad hídrica y a su vez facilitan la dispersión mediante agua, animales o incluso aire (Lloyd, 1969; Ruddick *et al.*, 1972). Por ello, y de manera minoritaria, especies del género *Streptomyces* han colonizado ambientes acuáticos, como es el caso de *Streptomyces axinellae*, especie aislada de una esponja marina (Pimentel-Elardo *et al.*, 2009), *Streptomyces pharmamarensis* aislada de una muestra procedente de sedimento marino (Carro *et al.*, 2012) o *Streptomyces qinglanensis* y *Streptomyces xiamenensis*, aislados de muestras procedentes de sedimentos de manglares (Hu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009).

Una característica diferencial de los estreptomicetos es su capacidad para producir metabolitos volátiles aromáticos, como geosmina y 2-metilisoborneol, responsables del olor característico a tierra mojada (Bentley y Meganathan, 1981; Gerber y Lechevalier, 1965; Wang y Cane, 2008). Los estreptomicetos crecen sobre la vegetación en descomposición en las

riberas de los ríos o las marismas y sobre los tapetes de algas flotantes y otros restos vegetales en descomposición. Cuando se produce la subida del nivel de agua de los ríos, esas sustancias son liberadas causando el olor y sabor desagradable del agua potable y por tanto afectando a su calidad (Gerber, 1979). Dichos compuestos, aunque inocuos para el consumo humano, son responsables de grandes pérdidas económicas en importantes sectores, ya que también son causantes del olor y sabor mohoso de pescados de acuicultura (Petersen *et al.*, 2011) y del aroma terroso en bebidas como el vino y la cerveza, afectando negativamente a las cualidades organolépticas (Darriet *et al.*, 2000).

1.1.3.1. Importancia ecológica de *Streptomyces*

Los estreptomicetos juegan un papel esencial en el reciclado de la materia orgánica. La mayoría de ellos pueden degradar materiales complejos y recalcitrantes de plantas y animales como polisacáridos (celulosa, quitina, pectina o almidón), proteínas (elastina o queratina), compuestos aromáticos y lignocelulosa.

Los genomas de *Streptomyces* codifican un elevado número de proteínas secretadas. El microorganismo modelo *S. coelicolor* A3(2) presenta aproximadamente 800 proteínas extracelulares, entre las que se encuentran 147 hidrolasas, 7 celulasas y 5 quitinasas (Bentley *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2007).

Las amilasas y sus inhibidores, son las responsables de la degradación del almidón, fuente primaria de la industria alimentaria. La primera α -amilasa caracterizada en *Streptomyces* fue la α -amilasa (*aml*) de *S. limosus* (Long *et al.*, 1987). Asimismo han sido identificados en varias especies del género *Streptomyces* los genes que codifican xilanasas, implicadas en la descomposición de lignocelulosa. Estas xilanasas son producidas por estreptomicetos mesófilos como *Streptomyces lividans* (Mondou *et al.*, 1986) y termófilos como *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, que produce una xilanasas termoestable (Tsuji *et al.*, 1992). Igualmente se han identificado complejos pectinolíticos (Sato y Kaji, 1980), quitinolíticos (quitinasa y quitobiasa) (Berger y Reynolds, 1958) y complejos celulolíticos (endocelulasas y exocelulasas) (Crawford y McCoy, 1972; Ishaque y Kluepfel, 1980) en distintos estreptomicetos. Recientemente, han sido caracterizadas varias cepas de *Streptomyces* aisladas de heces de herbívoros que son capaces de convertir la celulosa y la lignocelulosa en lípidos y azúcares reducidos. Estas cepas presentan gran interés por su posible uso en la producción de biofuel (Liu *et al.*, 2014). También son herramientas útiles en la industria textil las lacasas producidas por *Streptomyces cyaneus* CECT3335 por su capacidad para decolorar y detoxificar los colorantes azoicos (Moya *et al.*, 2010).

Otras enzimas ampliamente distribuidas entre los estreptomicetos son las proteasas extracelulares e inhibidores de proteasas (Kim *et al.*, 2008; Taguchi *et al.*, 1989). Es frecuente encontrar en *Streptomyces* queratinasas, herramientas útiles en biotecnología por su capacidad para degradar cuero y residuos que contienen queratina (Chao *et al.*, 2007; Syed *et al.*, 2009). También han sido estudiadas lipasas extracelulares y los genes que las codifican en diferentes cepas de *Streptomyces* (Cruz *et al.*, 1994).

Además de degradar polímeros, algunos estreptomicetos también tienen capacidad de degradar compuestos orgánicos como el algodón o la goma (Jendrossek *et al.*, 1997; Lacey y Lacey, 1987). De hecho, *Streptomyces* spp. son los miembros mayoritarios en comunidades de actinomicetos capaces de utilizar goma y látex como única fuente de carbono y energía (Jendrossek *et al.*, 1997). Incluso algunos estreptomicetos son productores de enzimas capaces de modificar fármacos y xenobióticos (Peczynska-Czoch y Mordarski, 1988).

1.1.4. Ciclo de vida del género *Streptomyces*

Existen tres características destacadas del género *Streptomyces* que le confieren especial interés: a su ya mencionada capacidad para producir importantes enzimas hidrolíticas extracelulares, se une tanto el desarrollo de un ciclo de vida complejo que culmina con la formación de un micelio aéreo con capacidad de esporulación, como su gran capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios con importantes actividades farmacológicas. Las tres características se relacionan con fases tardías del ciclo de vida y están fuertemente relacionadas entre sí.

❖ Ciclo de vida del género *Streptomyces*: Modelo clásico

El ciclo de vida de las bacterias del género *Streptomyces* exhibe una gran complejidad, rasgo inusual entre procariotas (Figura 1.1). Dicha complejidad presenta cierta similitud con el ciclo de vida de los hongos filamentosos, lo que puede ser debido a la adaptación a nichos ecológicos similares, aunque los mecanismos que desencadenan la diferenciación muestran distintos orígenes evolutivos (Chater, 2006).

Desde la primera descripción del ciclo de vida de *Streptomyces* sp. donde se postula la formación del micelio sustrato por unión celular con fusión de cromosomas (Klieneberger-Nobel, 1947), en lugar de por división nuclear como demostró posteriormente Mc Gregor (1954), han sido muchas las investigaciones que han tenido como principal objeto de estudio descifrar los mecanismos que gobiernan la diferenciación morfológica del género *Streptomyces*. Desde entonces, las fases por las que atraviesa el ciclo vital han sido estudiadas en profundidad, principalmente en *S. coelicolor*, microorganismo modelo del género.

A continuación, se describen las distintas etapas de diferenciación morfológica que tienen lugar durante el ciclo de vida, así como la diferenciación bioquímica asociada a cada etapa (Figura 1.1):

* Las esporas presentes en el suelo germinan cuando aparecen en el medio condiciones hídricas y nutricionales favorables. Las esporas forman uno o dos tubos germinativos que continúan creciendo de manera apical, para posteriormente dividirse, en un proceso que da lugar a un conjunto de hifas ramificadas, filamentosas y multinucleadas que penetran en el sustrato, constituyendo el micelio vegetativo o sustrato (Flårdh y Buttner, 2009). Una vez consumidos los nutrientes disponibles de forma inmediata, es necesario acceder a los nutrientes insolubles del medio, lo que se ve altamente favorecido tanto por un crecimiento miceliar (hifas ramificadas) que facilita la penetración y adhesión a restos orgánicos insolubles, como por la producción y liberación de enzimas hidrolíticas (xilanasas, celulasas), que degradan los restos orgánicos insolubles de plantas, y quitinasas, que permiten romper las paredes celulares de los hongos, sus principales competidores. Del mismo modo, se liberan antibióticos para así asegurarse que los nutrientes de plantas ya solubilizados no sean utilizados por otros competidores.

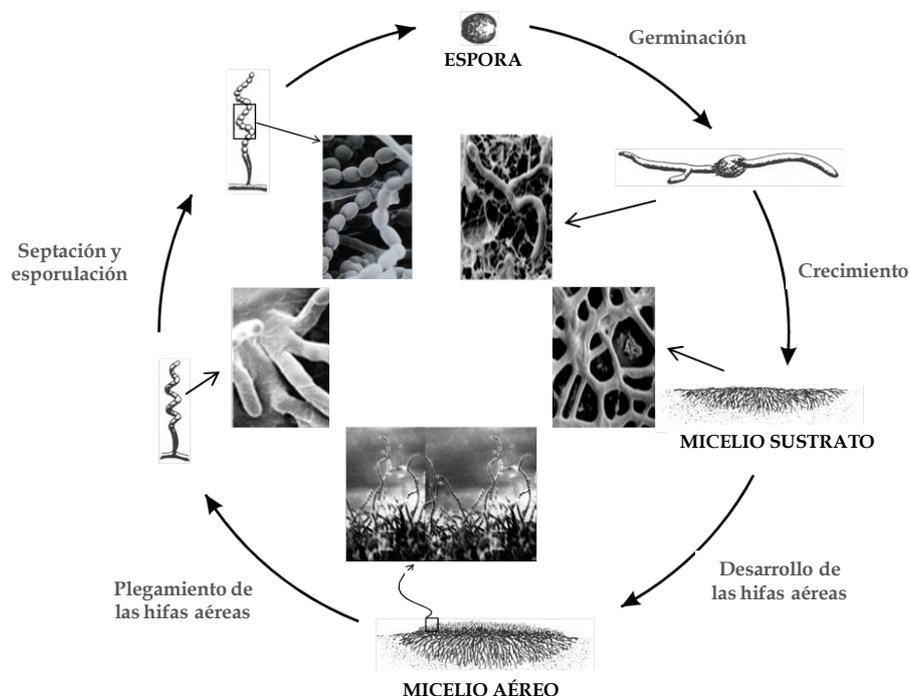


Figura 1.1. Ciclo de vida del género *Streptomyces*. A partir de la espora en condiciones favorables, se forma el tubo germinativo que da lugar al micelio sustrato. En respuesta a la limitación de nutrientes se forma el micelio aéreo y las hifas que lo forman se segmentan en partes uninucleadas que dan origen a una nueva espora, cerrándose el ciclo. Fuente: Imagen obtenida y modificada de Hunter (2007).

* Por último, nuevamente señales de escasez nutricional desencadenan la diferenciación morfológica del micelio aéreo que comienza a dividirse de forma controlada formando compartimentos unigenómicos mediante septos de doble capa, dando lugar a una cadena de preesporas compartimentalizadas que se diferenciarán a esporas maduras y se liberarán finalmente al aire como esporas individuales. La formación de esporas, formas semidurmientes del ciclo vital, permiten la adaptación a un medio complejo como es el suelo, sometido a constantes cambios físicos: cambios de aireación (condiciones aerobias/anaerobias), humedad (sequía/inundaciones), T^a (congelación), presión hidrostática, tensión superficial y pH, entre otras (Ensign, 1978). Además, dichas esporas permiten la supervivencia en el suelo durante largos periodos, ya que se han conseguido cultivos viables a partir de muestras de suelo de más de 70 años (Morita, 1985).

Se observa por tanto una estrecha relación entre la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos, la cual está perfectamente regulada por señales ambientales (Chater *et al.*, 2010; Flärdh y Buttner, 2009; Martín y Liras, 2010).

Recientemente, se han descrito nuevos aspectos del proceso de diferenciación del género *Streptomyces* caracterizándose nuevas etapas del ciclo celular (Manteca *et al.*, 2005) (ver siguiente apartado) (Figura 1.2).

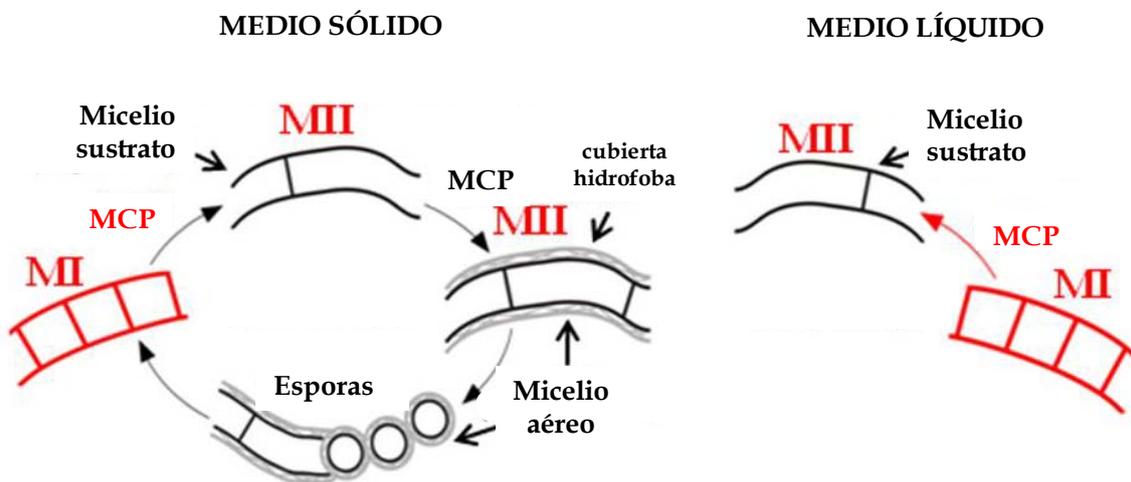


Figura 1.2. Ciclo de desarrollo de *Streptomyces*. En rojo se muestran las nuevas fases descritas por el grupo de Manteca *et al.* MI, primer micelio vegetativo; MII, segundo micelio reproductivo y productor de metabolitos secundarios; MCP "muerte celular programada". Fuente: Imagen tomada y modificada de www.unioviado.es.

❖ Ciclo de vida del género *Streptomyces*: Modelo actual

El modelo clásico de desarrollo del género *Streptomyces* en medio sólido asume que la diferenciación celular tiene lugar a lo largo del eje transversal de la colonia, donde el micelio vegetativo crece en superficie y entre el agar, formando hifas multinucleadas no compartimentalizadas, hasta que tiene lugar un programa controlado de muerte celular formándose el micelio reproductivo que crece en el aire, medio al que se liberan las esporas tras producirse la septación del micelio aéreo. Aunque este modelo ha sido válido durante más de medio siglo, estudios recientes del proceso de muerte celular en *Streptomyces* han desvelado nuevas fases del ciclo vital.

* Acorde con el modelo de diferenciación, el ciclo comienza con la germinación de la espora formándose un micelio compartimentalizado diferente del micelio sustrato y del micelio aéreo, que son multinucleados, denominado primer micelio (MI), tras el cual tiene lugar un proceso controlado de muerte celular alternándose segmentos de micelio viable y muerto (Manteca *et al.*, 2005).

* El proceso de muerte celular programada (MCP) supone la parada del crecimiento del MI, tras la cual se produce el crecimiento a partir de los segmentos viables de un segundo micelio multinucleado (MII). En cultivos en medio sólido se definen dos tipos de segundo micelio en función de la presencia o ausencia de las capas hidrofobas características que cubren las hifas del micelio aéreo:

⇒ En una **fase temprana** aparece el MII que carece del recubrimiento hidrófobo.

⇒ En una **fase tardía** el micelio MII muestra dicha cobertura hidrofoba.

Según este modelo, la fase vegetativa estaría representada por el primer micelio joven compartimentalizado (MI), mientras que la fase reproductiva estaría formada tanto por el estadio temprano como tardío del segundo micelio (MII), ya que ambos micelios están destinados a esporular. Haciendo una correlación con el modelo clásico, el micelio sustrato del modelo tradicional equivaldría a la fase temprana del segundo micelio y por tanto sin recubrimiento hidrófobo, y el micelio aéreo con la fase tardía del segundo micelio, el cual ya se ha recubierto de la superficie hidrofoba (Figura 1.3).

* Al final del ciclo de desarrollo se produce una segunda ronda de muerte celular programada tanto en el micelio sustrato como en el micelio aéreo, tras la cual se produce la segmentación de las hifas multinucleadas, formándose la cadena de esporas que finalmente serán liberadas al aire (Manteca *et al.*, 2005; 2010; Yagüe *et al.*, 2010).

En cultivos sumergidos, donde tienen lugar la mayor parte de los procesos industriales para producción de metabolitos secundarios, la mayoría de las cepas de *Streptomyces* no

presentan esporulación asumiendo por tanto que no existe diferenciación. Sin embargo, estudios recientes muestran que en medio líquido, al igual que en cultivo sólido, tiene lugar un proceso inicial de diferenciación (Manteca *et al.*, 2005; 2008; 2010).

En cultivos sumergidos se ha detectado un micelio temprano (MI) compartimentalizado a partir del cual se forma un segundo micelio multinuclear (MII) tras sufrir un proceso de muerte celular programada (Manteca *et al.*, 2005; 2010). Si bien aunque en medio líquido no tiene lugar el recubrimiento hidrófobo, ni la esporulación, se han descrito algunas excepciones, como *Streptomyces griseus* (Daza *et al.*, 1989; Kendrick y Ensign, 1993), *Streptomyces chrysomallus* (Kuimova y Soina, 1981) *Streptomyces acrimycini*, *Streptomyces antibioticus* (Novella *et al.*, 1992), *Streptomyces albidoflavus* (Rho y Lee, 1994), *Streptomyces venezuelae* (Glazebrook *et al.*, 1990) o *Streptomyces brasiliensis* (Rueda *et al.*, 2001).

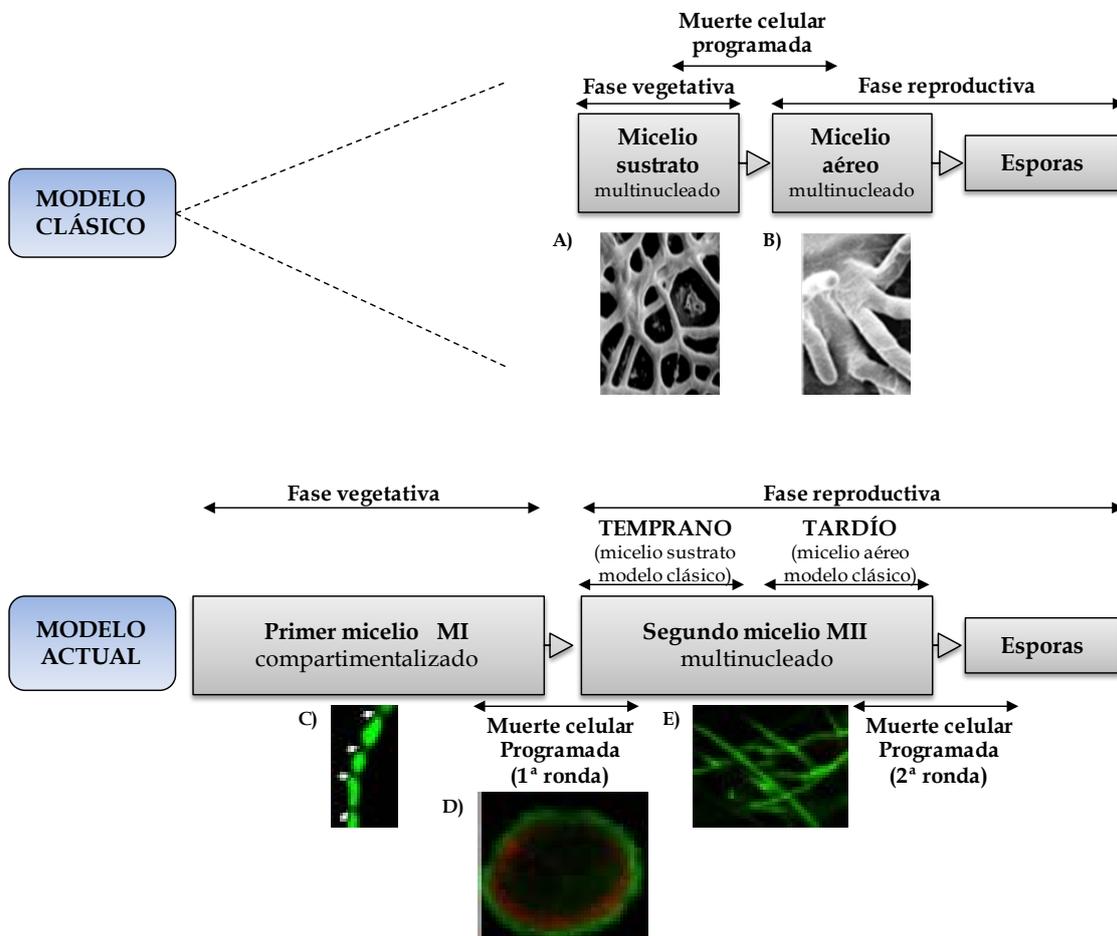


Figura 1.3. Diagrama de las fases del proceso de diferenciación morfológica en medio sólido en *Streptomyces*. En el modelo clásico, la fase vegetativa, representada por el micelio sustrato, se diferencia a micelio aéreo tras un proceso de muerte celular programada. En el modelo actual, aparecen nuevas estructuras miceliales, además de producirse una segunda ronda de muerte celular programada. La viabilidad celular es analizada con dos colorantes; el yoduro de propidio que se une a los ácidos nucleicos de las células muertas y SYTO 9, que tiñe las células viables. Imágenes de microscopía electrónica de micelio sustrato (A) y micelio aéreo (B). Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal láser del primer micelio (C), del segundo micelio (E) y de un agregado miceliano que ha entrado en la primera ronda de muerte celular programada (D). Fuente: Imágenes tomadas y modificadas de Manteca y Sánchez (2009) y Yagüe *et al.*, (2010).

Este conocimiento exhaustivo del proceso de diferenciación ha sido de vital importancia para los análisis de producción de las fermentaciones industriales, ya que se ha comprobado que el inicio del metabolismo secundario se corresponde con la diferenciación del micelio inicial compartimentalizado (MI) al segundo micelio multinuclear (MII), tanto en cultivo sumergidos como en cultivos sólidos (Manteca *et al.*, 2008; 2010; Yagüe *et al.*, 2013).

1.1.5. Características genéticas del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* se engloba dentro del grupo de bacterias Gram positivas con alto contenido en CG tanto en el ADN cromosómico como plasmídico. El rango de porcentaje de CG oscila entre el 70 y 74% para todas las especies de *Streptomyces* con genoma secuenciado.

1.1.5.1. El cromosoma

La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* A3(2), primera especie de *Streptomyces* secuenciada, presentó un tamaño del cromosoma de 8,6 Mb y 7825 marcos de lectura (ORF), presentando mayor número de genes que el microorganismo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene 6203 genes (Bentley *et al.*, 2002). En los últimos dos años, tras el desarrollo y expansión de las nuevas técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de segunda generación (del inglés, “next generation sequencing-NGS”) los genomas de especies de *Streptomyces* secuenciados se han multiplicado exponencialmente. Según la base de datos GOLD (“Genomes OnLine Database”) actualmente existen 146 proyectos de secuenciación de genomas de especies de *Streptomyces*, incluyendo 15 genomas totalmente secuenciados y publicados, y 128 genomas presentando huecos de secuencia. De entre los genomas secuenciados con datos disponibles se obtiene que el tamaño del cromosoma varía notablemente entre las distintas especies del género, presentando un rango de 5,18 a 11,9 Mb, si bien en la mayoría de los casos el tamaño del cromosoma se encuentra en el rango de 7 a 10 Mb, situándose entre los genomas bacterianos más grandes conocidos. El límite inferior lo marca el cromosoma del patógeno humano *S. somaliensis*, dato coherente con el trabajo de Toft y Andersson (2010), donde afirman que la reducción del tamaño del genoma en microorganismos patógenos es resultado del proceso de adaptación de la bacteria patógena a su hospedador.

1.1.5.2. Estructura cromosómica

De manera generalizada se considera que las bacterias presentan un único cromosoma circular, quedando confinada la linearidad a los cromosomas eucariotas (Riley y Anilionis, 1978). Sin embargo, en 1993, Lin *et al.* demostraron la linearidad del cromosoma de *S. lividans*, característica refrendada en años posteriores para distintas especies de *Streptomyces* haciéndose extensible a todo el género (Leblond *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995).

La presencia de un cromosoma lineal, aún siendo poco frecuente en procariontes, no está confinada al género *Streptomyces*, estando principalmente presente entre los Actinomycetales. Esta característica no siempre es común al género, como ocurre en *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Amycolatopsis*, donde se ha comprobado que las especies *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus jostii* y *Amycolatopsis orientalis* presentan un cromosoma lineal (McLeod *et al.*, 2006; Redenbach *et al.*, 2000), mientras que *Nocardia farcinica*, *Rhodococcus erythropolis* y *Amycolatopsis mediterranei* presentan un cromosoma circular (Ishikawa *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010). La presencia de un cromosoma lineal tampoco es exclusiva de las bacterias Gram positivas, puesto que el género *Borrelia* perteneciente al grupo de las espiroquetas también presenta un cromosoma lineal aunque de menor tamaño, cercano a 1 Mb (Ferdows y Barbour, 1989).

La linearización del cromosoma en procariontes tuvo lugar de forma espontánea a lo largo de la evolución. Aunque no se conoce cómo ocurrió con exactitud, se piensa que tuvo lugar tras un proceso de recombinación simple entre un cromosoma circular inicial y un plásmido lineal. Entre los indicios que avalan esta teoría destacan la utilización de la misma estrategia que los plásmidos lineales para solventar los problemas de replicación de los extremos, junto con el uso de un sistema de replicación bidireccional hacia los telómeros a partir de un origen de replicación central (*ori*), al igual que sus antecesores circulares (Volf y Altenbuchner, 2000).

Para solucionar los problemas de replicación de los telómeros, el cromosoma lineal de *Streptomyces* presenta proteínas terminales (PTs) unidas covalentemente al extremo 5' que actúan como cebadores para la ADN polimerasa en la síntesis del último fragmento de Okazaki, estando altamente conservadas tanto en secuencia como en tamaño (aprox. 185 aa) (Bao y Cohen, 2001; Yang *et al.*, 2002).

Otra característica del cromosoma lineal de *Streptomyces* es la presencia de secuencias repetidas e invertidas en ambos extremos. Dichas secuencias, denominadas TIR (del inglés “terminal inverted repeat”) muestran un tamaño variable según la especie, desde 174 pb en *S. avermitilis* hasta 550 kb en *S. rimosus*, siendo zonas de alta inestabilidad génica susceptibles de sufrir grandes amplificaciones y deleciones (Pandza *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 2007). Estas deleciones van desde la pérdida de marcadores como el gen de resistencia a cloranfenicol en *S. lividans* y *S. coelicolor* A3(2) hasta deleciones completas de los extremos de los cromosomas que dan lugar a la circularización del cromosoma (Dittrich *et al.*, 1991; Redenbach *et al.*, 1993). Dichas deleciones se extienden progresivamente, ya que más de un 25 % de las cepas sensibles a cloranfenicol presentan la pérdida del gen *argG*, que codifica una arginina

succinato sintetasa, convirtiendo la cepa en auxótrofo de arginina (Altenbuchner y Callum, 1984).

1.1.5.3. Organización del cromosoma

Aunque el contenido génico en organismos relacionados puede presentar gran variabilidad, la estructura del cromosoma está altamente organizada. Bajo el aparente desorden, existe una elevada presión de selección para mantener la información y los aspectos valiosos de la estructura del cromosoma, restringiéndose la tasa a la cual la diversidad puede ser añadida al genoma (Lawrence y Hendrickson, 2005). El análisis de la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor* A3(2) mostró una estricta organización génica del cromosoma, diferenciándose una región central (en inglés “core region”) de 5 Mb donde se encuentran agrupados los genes relacionados con funciones celulares primarias y por tanto esenciales, y dos brazos de 1,5 Mb (brazo izquierdo) y 2,3 Mb (brazo derecho) que engloban los genes relacionados con funciones no esenciales, entre los que se encuentran los genes implicados en el metabolismo secundario (Bentley *et al.*, 2002).

Desde la secuenciación del genoma de *S. coelicolor* A3(2), se han completado los proyectos de secuenciación de un número elevado de *Actinomycetales*. Tras el alineamiento de los cromosomas de distintos actinomicetos, se observa una región de elevada sintenia entre todas las especies analizadas, la cual se corresponde con la región central propuesta por Bentley *et al.* (2002). Esta elevada conservación génica de la zona central contrasta con las regiones terminales de los cromosomas, donde la similitud de secuencia es mínima (Hsiao y Kirby, 2008).

Recientemente se han observado dos nuevas regiones situadas entre la región central altamente conservada y las regiones terminales de baja sintenia. La región específica de *Streptomyces* está situada a la derecha de la región central y es una zona de elevada sintenia entre las distintas especies del género, estando poco conservada en el resto de *Actinomycetales*, mientras que la región específica de los *Actinomycetales*, situada a la izquierda de la región central, presenta un elevado grado de conservación tanto en las especies del género *Streptomyces* como en el resto de *Actinomycetales*. La presencia de las dos regiones diferenciadas permite determinar el origen evolutivo del género *Streptomyces* a partir de un actinomiceto ancestral que constituye la región central. A lo largo de la evolución, en una primera etapa se adquirió la región específica de los *Actinomicetales* y posteriormente en una segunda etapa se produjo una expansión del cromosoma mediante adquisición de la región específica de *Streptomyces*, suponiendo la evolución del género como un nuevo clado diferenciado del resto de los *Actinomycetales* (Kirby *et al.*, 2011) (Figura 1.4).

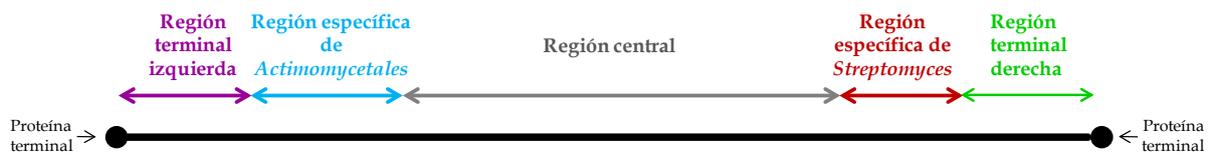


Figura 1.4. Representación de la organización del cromosoma de *Streptomyces*. En la región central se encuentran agrupados los genes relacionados con funciones celulares primarias. En las regiones terminales, derecha e izquierda, aparecen los genes relacionados con funciones no esenciales. Estas tres regiones coinciden con las descritas por Bentley *et al.* (2002). Tras el alineamiento de un gran número de especies del orden *Actinomycetales* aparecen dos nuevas regiones de sintenia: la región específica de *Actinomycetales*, que está presente y con un elevado grado de conservación en todas las especies de *Actinomycetales* estudiados, y la región específica de *Streptomyces*, exclusiva de este género.

1.1.5.4. Cromosoma lineal e inestabilidad génica: ventaja adaptativa

Las regiones terminales del cromosoma de los miembros del género *Streptomyces* han sido caracterizadas como zonas altamente inestables donde tienen lugar fenómenos de reorganizaciones génicas a gran escala. Las grandes deleciones y amplificaciones convierten a los miembros del género *Streptomyces* en organismos genéticamente inestables, presentando una frecuencia de mutación superior al 0,1% en esporas (Volff y Altenbuchner, 1998).

Inicialmente se consideraba que esta elevada inestabilidad génica era debida a la disposición lineal del cromosoma. Sin embargo, se ha comprobado que los cromosomas circulares generados de forma espontánea o bien construidos en el laboratorio son todavía más inestables (Lin *et al.*, 1993). Este hecho puede ser explicado por las dificultades que presenta el cromosoma circular a la hora de finalizar la replicación, por ausencia de terminadores de la replicación y por los posibles problemas durante la segregación, ya que la recombinación por simple sobrecruzamiento entre cromosomas circulares (micelio multinucleado) puede dar lugar a multímeros que tienen que ser resueltos en un paso previo a la posterior distribución del genoma en las ramificaciones de las hifas y durante la formación de las esporas (Fischer, 1997; Hopwood, 2006).

La estructura lineal del cromosoma, junto con una organización génica claramente definida con disposición central de los genes esenciales y terminal de los genes no esenciales, permite un crecimiento en el tamaño del cromosoma sin afectar al núcleo central, lo que supondría una ventaja adaptativa frente al cromosoma circular (Kirby, 2011).

Por otro lado, la elevada plasticidad génica de los extremos del cromosoma supone una ventaja adaptativa a un medio complejo como es el suelo, hábitat natural de *Streptomyces*. Dicha inestabilidad génica, junto con la interacción del cromosoma de *Streptomyces* con

plásmidos lineares, da lugar al elevado polimorfismo de las regiones terminales del cromosoma, lo que conlleva la aparición de una enorme diversidad de cepas y metabolitos secundarios como mecanismo evolutivo que permite una rápida respuesta a los numerosos cambios fisiológicos y ambientales que tienen lugar en la naturaleza y por tanto constituyendo una ventaja adaptativa para sobrevivir a las condiciones hostiles del medio (Chen *et al.*, 2009; Volff y Altenbuchner, 1998).

1.1.5.5. Elementos genéticos extracromosomales

La presencia de elementos genéticos extracromosomales está ampliamente extendida en el género *Streptomyces*, siendo los plásmidos los principales representantes.

➤ Plásmidos

La mayoría de las cepas de *Streptomyces* presentan elementos plasmídicos, apareciendo de forma muy variada. Se han descrito plásmidos circulares, lineales e integrativos. Las distintas variantes pueden convivir en la misma cepa, un ejemplo de ello es *S. coelicolor* A3(2), donde han sido caracterizados los tres tipos de plásmidos: SCP1, de 350 kb y lineal; SCP2, de 31 kb y circular; y SLP1, que se encuentra integrado en el cromosoma.

El plásmido circular de gran tamaño y bajo número de copias SCP2 fue el primero aislado de un estreptomiceto (Scherempff *et al.*, 1977; Scherempff y Goebel, 1977). Sin embargo, la mayoría de los plásmidos circulares hallados en *Streptomyces* presentan un menor tamaño (8-14 kb) y se encuentran en alto número de copias, como los plásmidos pIJ101, pJV1, pSG5, pSN22, pSVH1, pSB24.2 y pSNA1. Varios de estos plásmidos han sido utilizados para construir vectores derivados que presentan genes de resistencia a antibióticos, vectores bifuncionales, vectores con replicones sensibles a la temperatura y vectores utilizados para remplazamientos e interrupciones génicas, entre otros, constituyendo por tanto una herramienta esencial para desarrollar experimentos de biología molecular (Cohen, 2013; Hopwood *et al.*, 1985; Muth *et al.*, 1995).

Para la transmisión de genes mediante transferencia horizontal son necesarios los genes *tra*, presentes en todos los plásmidos conjugativos, siendo variables los mecanismos de replicación. Los plásmidos circulares de pequeño tamaño y alto número de copias se replican siguiendo el modelo de replicación en σ (sigma) o modelo del círculo rodante, mientras que los plásmidos circulares de gran tamaño y bajo número de copia como SCP2, presentan una replicación bidireccional desde el origen, siguiendo el modelo de replicación en θ (theta) (Grohmann *et al.*, 2003).

Algunos plásmidos circulares como SLP1 (17 kb) de *S. lividans* y pSAM2 (11 kb) de *S. ambofaciens* presentan genes *int* y *xis* que permiten la integración del plásmido en sitios

específicos del cromosoma. Este tipo de plásmidos se encuentran integrados en el genoma del cromosoma del hospedador original, pero se comportan como elementos extracromosomales con replicación autónoma en otros hospedadores diferentes (Kieser *et al.*, 2000; Possoz *et al.*, 2001).

Los plásmidos lineales se replican de manera análoga al cromosoma lineal (Qin y Cohen, 1998) y se cree que han mediado en la evolución de éste hacia su forma lineal actual, ya que ha sido comprobado que algunos plásmidos lineales pueden interactuar con los extremos de los cromosomas. Un ejemplo de ello es el plásmido pPZG103, de 1 Mb, que presenta la agrupación génica de oxitetraciclina adquirida por interacción con el cromosoma de *S. rimosus*, dando lugar a una cepa sobreproductora (Gravius *et al.*, 1994).

Aun no siendo muy frecuente, se han descrito plásmidos lineales que codifican genes de biosíntesis de antibióticos: el plásmido pSCP1 (350 kb) de *S. coelicolor* contiene los genes relacionados con la síntesis de la metilenomicina (Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991); el plásmido pSLA-L (211 kb) de *S. rochei* contiene las agrupaciones génicas de biosíntesis de lancacidina, lancamicina, mitramicina y de un carotenoide (Mochizuki *et al.*, 2003); el plásmido pKSL (520 kb) de *S. lasaliensis* presenta las agrupaciones de los antibióticos lasalócido y equinomicina (Kinashi, 2011); y por último y más llamativo tanto en tamaño como en contenido, el megaplásmido pSCL4 de *S. clavuligerus*, un gigantesco elemento extracromosómico lineal de 1,8 Mb que constituye un inmenso reservorio de información exclusivamente relacionada con la síntesis de múltiples metabolitos secundarios (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2014; Medema *et al.*, 2010).

Todo el conocimiento relativo a los plásmidos del género *Streptomyces* permite constatar que los plásmidos juegan un papel esencial en la evolución y transferencia horizontal de metabolitos secundarios, aumentando la plasticidad del genoma y convirtiendo a los miembros del género en los mayores productores de metabolitos secundarios conocidos.

1.2. Fármacos inmunosupresores: Tacrolimus

1.2.1. Historia de los inmunosupresores

Uno de los mayores hitos en el campo de la medicina moderna ha sido el desarrollo de técnicas de trasplante de órganos éxito posible únicamente tras el desarrollo de agentes inmunosupresores eficaces para evitar el rechazo (Figura 1.5).

Dos fueron los descubrimientos que determinaron el desarrollo de los trasplantes como disciplina clínica: por un lado, el descubrimiento de los antígenos leucocitarios humanos o HLA (del inglés “Human Leukocyte Antigen”) (Dausset, 1958), cuya tipificación se ha convertido en una herramienta esencial para determinar el grado de compatibilidad receptor/donante, y por otro la demostración, a principios de los años 60, de la inmunodepresión farmacológica como terapia para la supervivencia indefinida de los aloinjertos en el receptor (Starzl *et al.*, 1963).

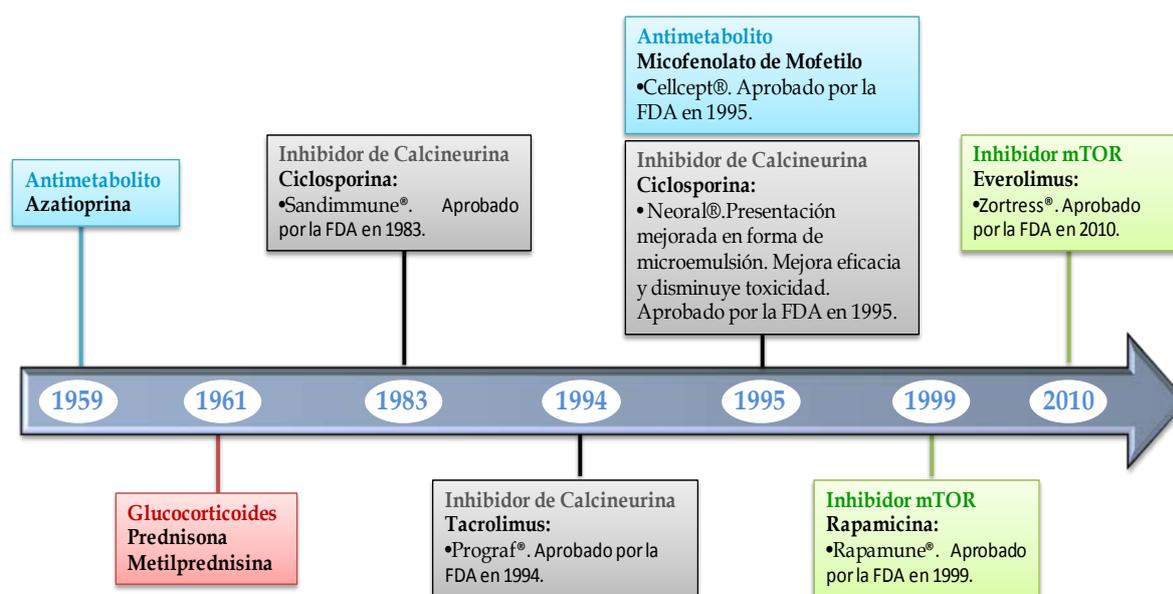


Figura 1.5. Línea temporal de los principales agentes inmunosupresores utilizados en procedimientos de trasplantes agrupados por clases farmacológicas. Se distinguen 4 grupos de compuestos inmunosupresores en función del mecanismo de acción que desencadena la inmunosupresión: Antimetabolitos (azul): inhiben la síntesis de purinas, impidiendo la proliferación de células B y T. Glucocorticoides (rojo): impiden múltiples puntos de la respuesta inmune; inhiben la presentación de antígenos, la producción de citoquinas y la proliferación de linfocitos. Inhibidores de la calcineurina (gris); inhiben la fosfatasa calcineurina y como consecuencia se inhibe la producción de IL-2 y por tanto la activación de células T. Inhibidores mTOR (verde): bloquean la serina-treonina kinasa mTOR y por tanto inhiben la respuesta a la interleucina-2 (IL-2) bloqueando la activación de los linfocitos T y B.

En este sentido, Billingham y Medawar (1951) demostraron el efecto inmunosupresor de los corticoides mediante la prolongación de la supervivencia de un injerto cutáneo en conejo. Posteriormente, Schwartz y Dameshek (1959) descubrieron la 6-mercaptopurina y su derivado la azatioprina (AZA), fármaco que actúa como antimetabolito inhibiendo la síntesis de purinas. Fue la administración combinada de azatioprina y corticoesteroides la que permitió realizar con éxito el primer trasplante renal en humanos sin relación de parentesco en 1963 (Merrill *et al.*, 1960; Murray *et al.*, 1963), constituyéndose la primera terapia inmunosupresora. A partir de 1964, la combinación de corticoides y azatioprina se convirtió en la terapia universal para evitar rechazos post-trasplante, aunque la alta inespecificidad de ambos compuestos limitaba la supervivencia de los pacientes inmunodeprimidos, que fallecían en la mayoría de los casos por infecciones bacterianas.

La búsqueda en los años posteriores de nuevos compuestos inmunosupresores más específicos desembocó en el descubrimiento en 1972 del fármaco revolucionario ciclosporinaA (CsA), un compuesto peptídico de origen fúngico (Borel *et al.*, 1976). La CsA actúa como inhibidor de la calcineurina, suprimiendo la proliferación de linfocitos sin mielosupresión completa, permitiendo por primera vez inhibir la reacción inmunitaria del rechazo sin afectar a la capacidad global de defensa, prolongando la supervivencia del injerto de manera indefinida y haciendo extensible su uso para trasplantes no renales. De este modo, el procedimiento de trasplante de órganos pasó de ser un tratamiento experimental a una importante alternativa clínica (Iwatsuki *et al.*, 1988).

La ciclosporina, comercializada con el nombre de Sandimmune®, fue el fármaco de elección indiscutible durante años, aunque la necesaria aplicación en altas dosis provocaba importantes efectos secundarios como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, diabetogenicidad, desórdenes linfoproliferativos, hipertensión, hiperlipidemia y molestos cambios estéticos: hiperplasia gingival e hirsutismo, entre otros. A pesar de la nefrotoxicidad, la ciclosporina, junto con los esteroides, fue el tratamiento inmunosupresor dominante hasta finales de los 90 (Figura 1.6), momento en que entró en acción el inmunosupresor tacrolimus. El tacrolimus, o compuesto FK506, es un policétido macrólido descubierto a partir de un cultivo de la cepa *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993, la cual fue aislada de una muestra de suelo de Tsukuba, región situada al norte de Japón (Kino *et al.*, 1987). Su característica diferencial frente a la ciclosporina es su elevada potencia inmunosupresora, 100 veces mayor que aquélla. Por ello, Starlz *et al.* (1989) propusieron al tacrolimus como sustituto de la ciclosporina en rechazos refractarios a ésta, comprobándose posteriormente que más del 75 % de los rechazos en trasplante de hígado tras aplicación de ciclosporina podían revertirse después de la

administración de tacrolimus (Fung *et al.*, 1990), haciéndose extensible a procedimientos de trasplante de otros órganos (Armitage *et al.*, 1991; Todo *et al.*, 1990).

A principios de la década de los 90 ya se habían realizado más de 150 cirugías de trasplante donde el inmunosupresor principal era el tacrolimus. Además, su descubrimiento permitió realizar el trasplante de intestino, órgano no trasplantable hasta entonces (Todo *et al.*, 1991). El tacrolimus presenta el mismo mecanismo de acción que la CsA (inhibidor de la calcineurina) y por lo tanto los pacientes muestran similares efectos secundarios en cuanto a nefrotoxicidad, neurotoxicidad o diabetogenicidad, aunque la incidencia de hipertensión se reduce sustancialmente y desaparecen los efectos estéticos. A pesar de ello, su alta potencia inmunosupresora lo ha convertido en el inmunosupresor de elección en la mayoría de las cirugías de trasplante, aumentado su uso de manera imparable desde mediados de la década de los 90 hasta nuestros días (Busuttill y Holt, 1998; Snell *et al.*, 2013; Yussim *et al.*, 1996). Acorde con los datos publicados en el informe anual del SRTR (“The Scientific Registry of Transplant Recipients”), en 2011 el tacrolimus se utilizó como fármaco basal en terapia inmunosupresora post-trasplante en el 83 % de los trasplantes de pulmón, 85% de corazón, 90% de hígado, riñón y páncreas y 97 % de intestino.

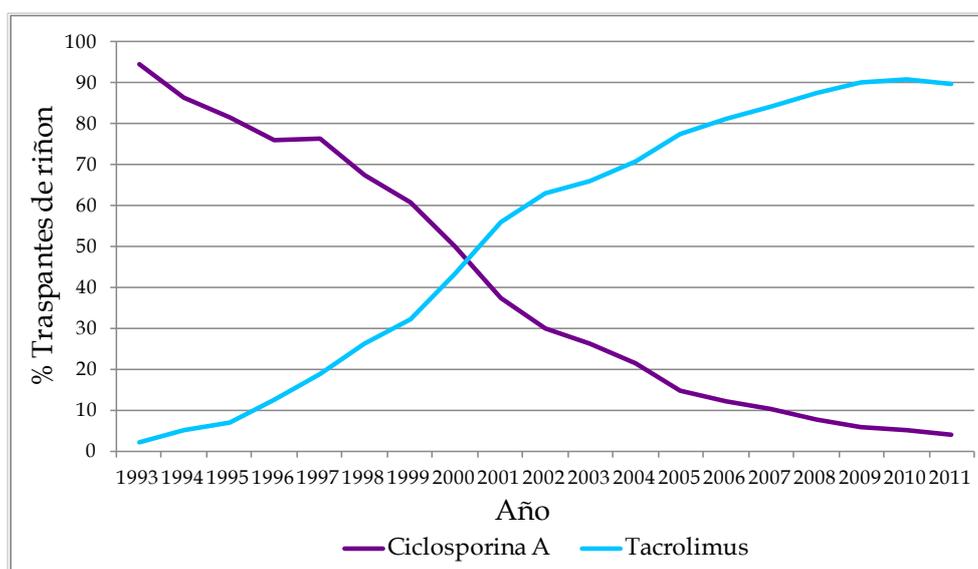


Figura 1.6. Tendencia en el uso de inmunosupresores inhibidores de Calcineurina en el trasplante de riñón. En 1993, la ciclosporina se administró como terapia inmunosupresora en el 95 % de los trasplantes de riñón mientras que el tacrolimus se aplicó únicamente en el 2 % de los pacientes. La tendencia desde entonces indica un declive gradual en el uso de la ciclosporina, presentando un porcentaje de uso de tan solo el 4 % en 2011. El uso de tacrolimus ha aumentado progresivamente a la vez que la ciclosporina entraba en declive, y en 2011 en el 90 % de los trasplantes de riñón se utilizó tacrolimus como terapia inmunosupresora post-trasplante. La menor tasa de rechazo agudo, junto con una menor tasa de rechazos resistentes a esteroides asociados a tacrolimus, motivó el cambio de ciclosporina por tacrolimus. La ausencia de efectos secundarios estéticos (hirsutismo) también contribuyó al cambio. Fuente: Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) and Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). Annual Data Report 1993-2011.

Paralelamente a la introducción en el mercado de tacrolimus, fue desarrollado el fármaco adyuvante micofenolato de mofetilo o MMF (con nombre comercial CellCept®). Su principio activo, el ácido micofenólico, al igual que la azatioprina, actúa como inhibidor de la síntesis *de novo* de las purinas (guanosina y adenosina). Sin embargo, la mejora de la función del injerto a largo plazo hizo que el ácido micofenólico se impusiera a AZA como agente adyuvante en la terapia inmunosupresora (Figura 1.7).

Cuando la triple terapia, tacrolimus- MMF-esteroides, se había implantado como terapia inmunosupresora, se descubrió una nueva clase de inmunosupresores: los inhibidores de la mTOR (del inglés "*mammalian target of rapamycin*"). En el año 2000, se aprobó el uso de la rapamicina o sirolimus (nombre comercial, Rapamune®), un policétido macrólido de estructura similar al tacrolimus, producido por *Streptomyces hygroscopicus* (Kelly *et al.*, 1997). Posteriormente, en el año 2010, se aprobó el uso de un derivado de la rapamicina, el everolimus (nombre comercial Zortress®) (Figura 1.5). Varios ensayos demostraron que la administración combinada con tacrolimus o CsA produce unos excelentes resultados con una toxicidad mínima (McAlister *et al.*, 2000).

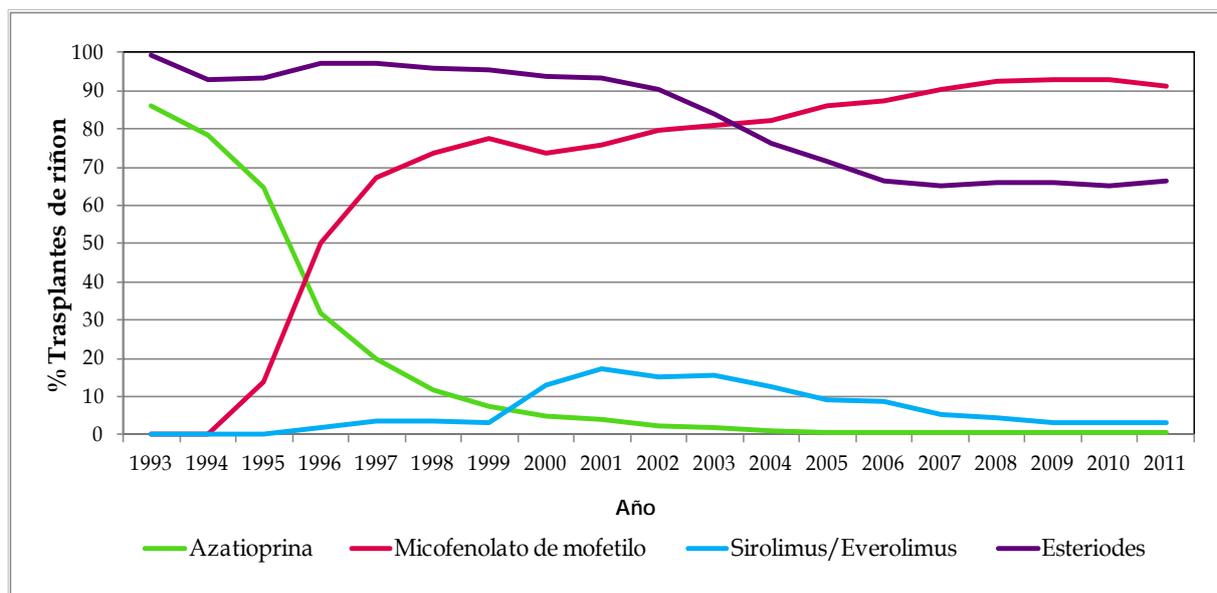


Figura 1.7. Tendencia en el uso de antimetabolitos, inhibidores mTOR y corticoesteroides. En 1993, la azatioprina, el único antimetabolito de rutina disponible, fue usada en el 86 % de los trasplantes de riñón, descendiendo drásticamente hasta valores del 0,4 % en 2011. El uso de micofenolato de mofetilo, aprobado por la FDA en 1995, aumentó rápidamente desde su lanzamiento hasta alcanzar el valor de 91,2 % en 2011. En 1993, el 99 % de los pacientes con trasplante renal recibieron corticoesteroides, en forma de metilprednisona (intravenosa) o prednisona (oral). Su uso ha decrecido en los últimos años hasta valores del 66% en 2011, lo que puede ser debido a estudios recientes donde se ha relacionado su administración con rechazos agudos a largo plazo. Los inhibidores mTOR sirolimus y everolimus, alcanzaron su máximo en el 2001 (17 %), pero su uso ha disminuido progresivamente hasta el 3 % en 2011. En los últimos años, los inhibidores mTOR se han utilizado como triple terapia en combinación con tacrolimus y micofenolato de mofetilo. Fuente: Fuente: OPTN / SRTR 2011. Annual Data Report 1993-2011.

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en encontrar un equilibrio entre los efectos deseados e indeseados de los fármacos inmunosupresores. La última tendencia consiste en eliminar los esteroides de la terapia inmunosupresora, ya que éstos podrían estar relacionados con episodios de rechazo a largo plazo (Lightner *et al.*, 2011) (Figura 1.8 a). La terapia inmunosupresora es dependiente del órgano trasplantado y requiere un estudio personalizado para cada paciente, aunque los datos de los últimos 10 años muestran la hegemonía indiscutible de tacrolimus como agente inmunosupresor basal y la del micofenolato de mofetilo como agente adyuvante (Figura 1.8 b).

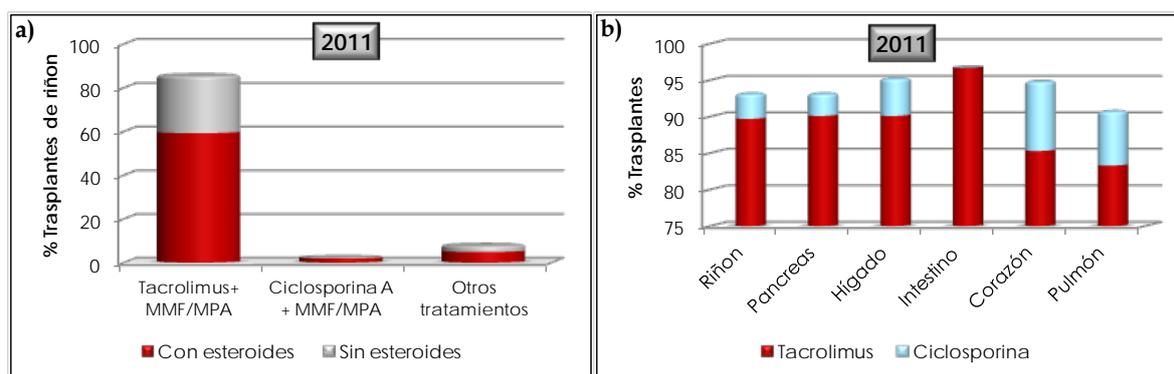


Figura 1.8. a) Terapia de inmunosupresión post-trasplante. En 2011, la combinación farmacológica más utilizada fue tacrolimus como inmunosupresor primario y micomefanolato de mofetilo/ácido micofenólico como agente adyuvante junto con esteroides (59 %) o sin esteroides (26 %), ya que estudios recientes han relacionado su administración con rechazos agudos a largo plazo. **b) Terapia inmunosupresora primaria post-trasplante en órganos sólidos trasplantables.** Tacrolimus fue el inmunosupresor basal de elección en mayor porcentaje en todas las cirugías de trasplante de órganos sólidos, con valores que oscilan entre el 83 % en trasplantes de pulmón y el 97 % en trasplantes de intestino. Fuente: OPTN / SRTR 2011 Annual Data Report.

1.2.2. Industria farmacéutica: Importancia económica de tacrolimus

El mercado de los fármacos inmunosupresores en todo el mundo alcanzó 6974 millones de dólares en 2011 (www.evaluagroup.com). Acorde con la tendencia de uso en la terapia inmunosupresora post-trasplante, tacrolimus es el fármaco inmunosupresor primario más utilizado en la mayoría de las cirugías, lo cual se refleja en la cifra de venta mundial (2.415 millones de dólares en 2011). En 2012, Prograf® (tacrolimus patentado) fue el fármaco inmunosupresor más vendido a nivel mundial con cifras de venta de 1.903 millones de dólares, seguido de Cellcept® (micofenolato de mofetilo patentado), principal fármaco adyuvante en la terapia inmunosupresora (Figura 1.9). Prograf® (Tacrolimus oral y de liberación rápida), comercializado por la farmacéutica japonesa Astellas Pharma, fue aprobado por la FDA en 1994 y no fue hasta 15 años después cuando la farmacéutica perdió el monopolio como productor y vendedor, siendo Prograf® uno de los principales fármacos de la compañía y reportando por tanto importantes beneficios.

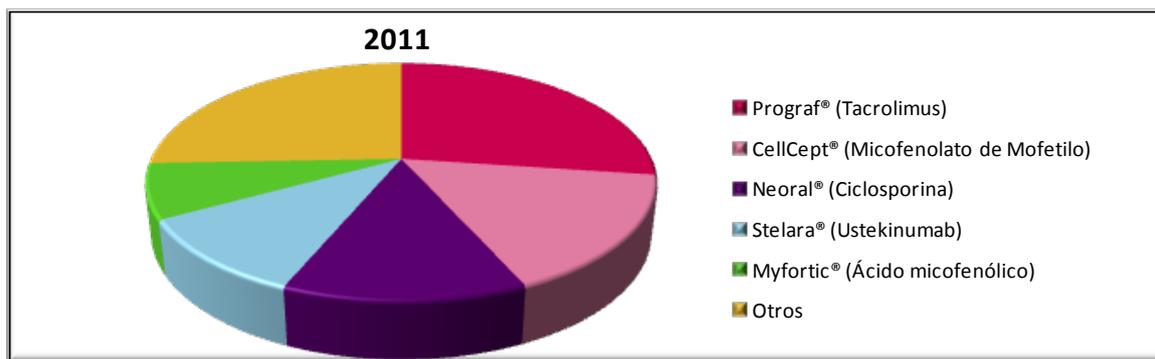


Figura 1.9. Ventas mundiales de inmunosupresores farmacológicos en 2011. Prograf® fue el fármaco inmunosupresor más vendido, alcanzando una cuota de mercado del 27 %, seguido de CellCept® (16 %), Neoral® (13 %), Stelara® (11 %) y Myfortic® (7 %). El resto de los inmunosupresores alcanzó una cuota de mercado del 26 %.

En junio de 2009 expiró la patente de Prograf® y a pesar de los intentos de Astellas Pharma para evitar que la FDA aprobara una versión genérica sin que hubieran sido realizados ensayos de bioequivalencia, en septiembre de 2009 la farmacéutica Sandoz lanzó el primer genérico en EEUU con el nombre de Adoport®. A éste le siguieron un gran número de genéricos de tacrolimus oral y de liberación rápida entre los que se incluyen Aletris, Capexion, Evenil, Miloprosan, Tacni, Takon, Taliximun, Tamitect y Vivadex, lo que supuso un descenso en las ventas de Prograf® de un 22 % en 2011. Por otro lado, recientemente ha sido demostrada la bioequivalencia de Prograf® *versus* sus genéricos con múltiples ensayos clínicos, por lo que es posible un mayor descenso futuro en cifras de venta de tacrolimus no genérico en los próximos años (Alloway *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2013). Por ello, la farmacéutica Astellas Pharma ha buscado nuevas estrategias para mantener la hegemonía en la venta de tacrolimus, entre ellas el lanzamiento de nuevas formulaciones de tacrolimus, de manera que en 2010 se comercializó Modigraf®, un granulado para suspensión oral, y en 2007 fue aprobado por la EMA (“European Medicine Agency”) Advagraf®, así como por la FDA en 2013 con el nombre de Astagraf XL™ una nueva formulación de liberación lenta de tacrolimus y que en 2012 rindió 218 millones de dólares.

Sin embargo, el uso de tacrolimus no es exclusivo de la terapia inmunosupresora post-trasplante; en el año 2000 se comercializó tacrolimus de uso cutáneo (pomada) con el nombre de Protopic®, empleado en el tratamiento de dermatitis atópica y otras enfermedades cutáneas autoinmunes como el vitiligo (Silverberg y Silverberg, 2011). También se ha demostrado la eficacia de tacrolimus en el tratamiento de la enfermedad autoinmune miastenia gravis (Ponseti *et al.*, 2008), la uveítis y otras inflamaciones oculares autoinmunes (Zhai *et al.*, 2011), la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa (Benson *et al.*, 2008; Navas López *et al.*, 2009) y la artritis reumatoide (Takeuchi *et al.*, 2013).

Además de como terapia inmunosupresora, tacrolimus muestra prometedores resultados para otras aplicaciones terapéuticas como anticonvulsionante y neuroprotector gracias a sus actividades neuroprotectora y neuroregenerativa (Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 2008). Este amplio espectro de uso de tacrolimus y su posicionamiento como líder de mercado en terapia inmunosupresora, es lo que convierte a tacrolimus y sus análogos en compuestos de gran interés tanto para compañías farmacéuticas como para investigadores.

1.2.3. Biosíntesis de tacrolimus

1.2.3.1. Policétido sintasa de tacrolimus: síntesis de pre-tacrolimus

A nivel estructural, tacrolimus es un policétido macrólido de 23 miembros, lo que indica que para su síntesis es imprescindible la actuación del complejo enzimático policétido sintasa (PKS). Concretamente, en la síntesis del inmunosupresor tacrolimus, al igual que en la síntesis de rapamicina y ascomicina participan sistemas híbridos de policétidos sintasas (PKS, del inglés “polyketide synthases”) y péptidos sintasas no ribosomales (NRPS, del inglés “nonribosomal peptide synthases”). La PKS de tacrolimus es una PKS de tipo I o modular, formada por varias proteínas multifuncionales, cada una de las cuales presenta dominios catalíticos colocados en el orden preciso en que van a ser utilizados para la elongación de la cadena policétida. La PKS de tacrolimus está codificada por tres genes: *fkbA*, *fkbB* y *fkbC*, que dan lugar a tres polipéptidos multidominio (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi y Shafiee, 1998).

El gen *fkbB* presenta 21 dominios organizados en 5 módulos: el módulo de carga que incorpora la unidad iniciadora y los primeros 4 módulos de elongación. El módulo de carga es el encargado de activar la unidad iniciadora, presentando un dominio con actividad dihidrociclohexenilcarbonil-CoA sintasa (CAS), que cataliza la activación del ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico (DHCHC) a 4,5 dihidrociclohexenocarbonil-CoA, para transferirlo al grupo tiol de la cisteína de la cetosintasa, iniciándose así la síntesis de la cadena policétida. Seguidamente actúan secuencialmente los dominios de los 4 primeros módulos de elongación (Motamedi y Shafiee, 1998). Cabe destacar que la función deshidrogenasa (DH) de los módulos 2 y 4 está presente en la secuencia pero se deduce de la estructura final que no ejercen su acción deshidratasa. La cadena policétida continúa expandiéndose tras la actuación de los dominios de los módulos 5 y 6 codificados por el gen *fkbC* (Motamedi y Shafiee, 1998). Por último, tienen lugar los 4 ciclos de elongación finales, para lo que son requeridos 19 dominios catalíticos repartidos en 4 módulos codificados por el gen *fkbA* (Motamedi *et al.*, 1996) (Figura 1.10).

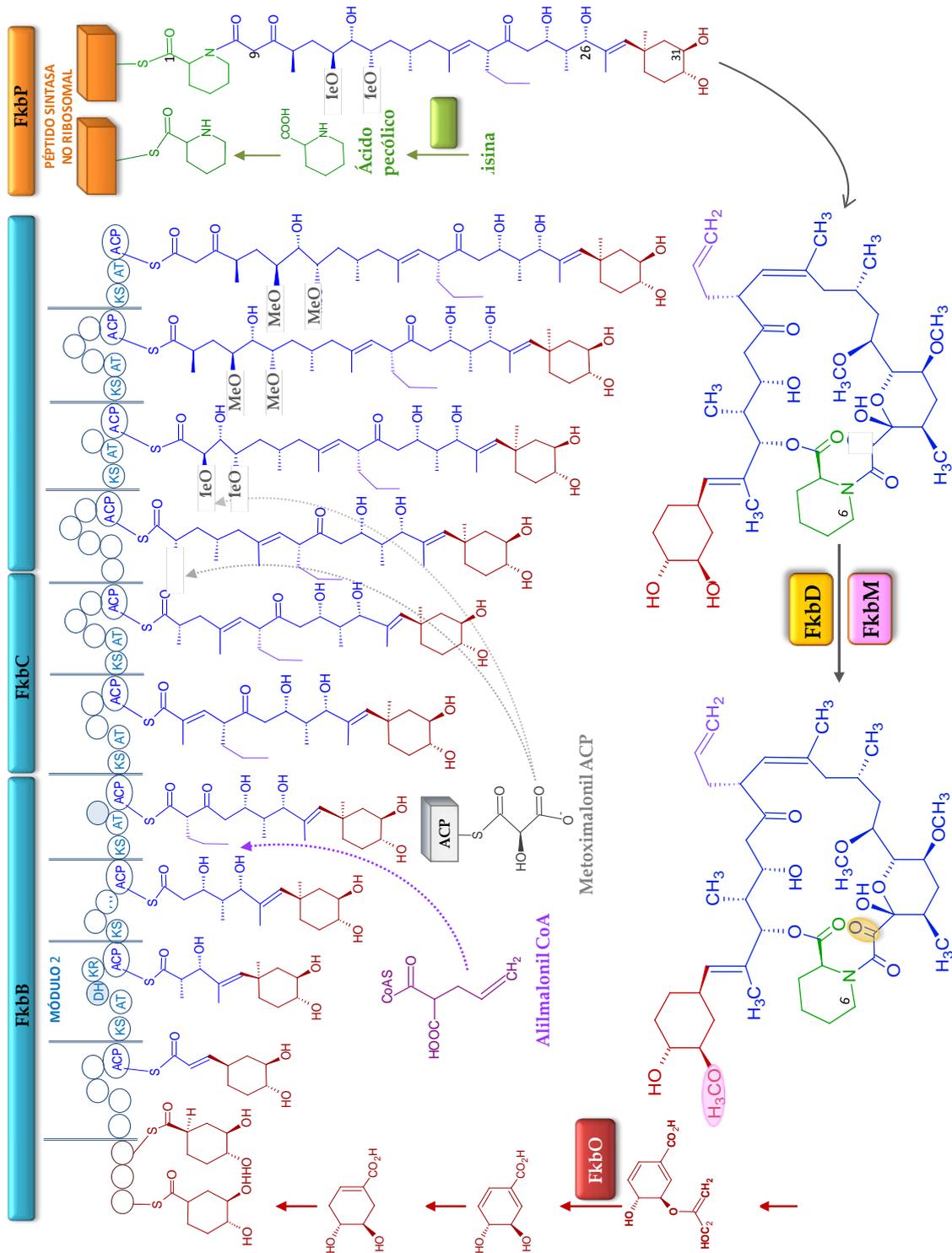


Figura 1.10. Ruta de biosíntesis de tacrolimus (FK506). La síntesis de tacrolimus se inicia con la incorporación de la unidad iniciadora DHCHC, derivado del corismato, en el módulo de carga de FkbB. Posteriormente son incorporadas 10 unidades de elongación: 2 malonil-CoA (incorporadas por los módulos 3 y 10), 5 metilmalonil-CoA (módulos 1, 2, 5, 6 y 9), 2 metoximalonil ACP (módulos 7 y 8) y un alilmalonil-CoA (módulo 4) para formar la cadena policétida lineal. En un siguiente paso se incorpora una molécula de ácido pipercolico y en último lugar se produce la ciclación del policétido lineal liberándose el intermediario inicial pre-FK506. La funcionalización de FK506 tiene lugar mediante la intervención de FkbD y FkbM. Los diferentes dominios catalíticos de las PKSs se representan con círculos: ACP, proteína transportadora de grupos acilo; AT, acil transferasa; CAS, CoA-sintasa; DH, deshidratasa; ER, enoil-reductasa; KR, ceto-reductasa; KS, ceto-sintasa. Los dominios DH de los módulos 2 y 4 no ejercen actividad deshidratasa a pesar de estar presentes en la secuencia. Fuente: Figura basada en Barreiro y Martínez-Castro (2014) y Motamedi y Shafiee (1998).

Por tanto, es necesaria una unidad iniciadora derivada del corismato y 10 unidades de elongación: 2 malonil-CoA (incorporadas por los módulos 3 y 10), 5 metilmalonil-CoA (módulos 1, 2, 5, 6 y 9), 2 metoximalonil ACP (módulos 7 y 8) y un alilmalonil-CoA (módulo 4) para formar la cadena policétida lineal (Figura 1.10). Ésta será adicionada con una molécula de ácido piperólico derivada del catabolismo de la lisina tras la actuación de la lisina ciclodesaminasa FkbL, y posteriormente será ciclada con formación de un enlace lactónico, proceso realizado por la NRPS FkbP, liberándose el intermediario macrolactónico inicial pre-FK506 (9-deoxo-31-O-demetil-FK506).

1.2.3.2. Modificaciones post-PKS: Funcionalización de tacrolimus

Para obtener tacrolimus son necesarias dos reacciones post-PKS; por un lado tiene lugar la hidroxilación del C-9, reacción catalizada por FkbD, que presenta actividad citocromo P450 hidroxilasa (Ban *et al.*, 2013b; Motamedi *et al.*, 1996), y por otro lado, se produce la metilación del C-31 mediada por FkbM con actividad 31-O- metiltransferasa (FKMT) (Ban *et al.*, 2013b; Motamedi *et al.*, 1996). Dicha proteína puede metilar 31-desmetil-FK520 (compuesto análogo a FK506) con la misma eficiencia que su sustrato natural, aunque es incapaz de metilar los C-13 y C-15 de tacrolimus, siendo éstos metilados exclusivamente por incorporación de las unidades extendedoras metoximalonil-ACP (Motamedi *et al.*, 1996; Shafiee *et al.*, 1994). Estas modificaciones post-PKS resultan de gran importancia para alcanzar la actividad inmunosupresora máxima de tacrolimus, ya que el 31-O-desmetil-FK506 presenta una reducción de las propiedades inmunosupresoras de unas 10 veces y el 9-deoxo 31-O-demetil-FK506 presenta menor actividad que el anterior (Motamedi *et al.*, 1996).

1.2.3.3. Tacrolimus y sus análogos

Las primeras patentes de las compañías Fujisawa Pharmaceutical Company, Ltd. y Merck & Co., Inc. relacionadas con la producción de tacrolimus, indican que varios análogos de éste son co-producidos durante el proceso de fermentación de las distintas cepas productoras de tacrolimus (Dumont *et al.*, 1992; Goto *et al.*, 1984; Hatanaka *et al.*, 1989).

Entre los análogos mayoritarios se encuentran FK520 Y FK506D, compuestos estructuralmente casi idénticos a tacrolimus diferenciándose únicamente por la cadena lateral presente en el C-21: radical alilo en tacrolimus, radical etilo en FK520 y radical propilo en FK506D.

FK520 o ascomicina fue aislado en 1962 a partir de un cultivo de la cepa *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891), caracterizándose inicialmente como un metabolito con propiedades antifúngicas (Arai *et al.*, 1962). Sin embargo, en 1988 la compañía farmacéutica Fujisawa aisló un compuesto como parte de un programa de rastreo para

búsqueda de nuevas moléculas con características inmunosupresoras a partir de una muestra de suelo de Yaku-shima (Japón) producido por la cepa *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, que posteriormente sería descrito como FK520 (Hatanaka *et al.*, 1988). A nivel farmacológico, FK520 presenta gran interés por su aplicación en la terapia inmunosupresora de la dermatitis atópica, aprobado en 2001 por la FDA con el nombre de Eidel[®], siendo pimecrolimus (derivado de la ascomicina) el principio activo.

En el año 2000 fue caracterizada la agrupación génica de biosíntesis de FK520, observando que ésta mantenía una organización idéntica y una alta identidad con los genes homólogos descritos hasta ese momento de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus (Wu *et al.*, 2000). Esta alta identidad de las agrupaciones génicas de FK506/FK520 junto con la flexibilidad de sustrato por parte de la AT del módulo 4 de la PKS de tacrolimus es la que hace que en las fermentaciones de cepas productoras de tacrolimus se observe un porcentaje relativamente alto de FK520, superior al 20 % (tomando como referencia la producción de tacrolimus), y cantidades minoritarias de FK506D y otros análogos. Estas impurezas en fermentaciones industriales suponen un incremento significativo del coste del producto final por necesidad de purificar el compuesto mediante sucesivas etapas de extracción con solventes orgánicos y/o separación cromatográfica asociada a un espectrómetro de masas, entre otros (Cabri *et al.*, 2005; Cvak *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

Por ello, en los últimos años varios grupos de investigación han utilizado diferentes estrategias para lograr la producción exclusiva de tacrolimus. Sin embargo, debido a que tacrolimus y sus análogos utilizan los mismos precursores metabólicos y comparten la mayor parte de la ruta biosintética resulta complicado eliminar la producción de los compuestos análogos sin afectar a la producción de tacrolimus. Así, se ha conseguido reducir la producción de los análogos mediante experimentos de ingeniería genética y adición exógena de precursores y nutrientes al medio de fermentación (Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013) e incluso se ha logrado eliminar completamente la síntesis de FK520 mediante interrupción génica del gen *allR* (que codifica una crotonil-CoA carboxilasa/reductasa) seguido de la adición de alilmalonil-SNAC (análogo de la unidad extendidora alilmalonil-CoA) obtenido por quimiosíntesis (Kosec *et al.*, 2012).

1.2.3.4. Rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de tacrolimus

Debido a que la producción de tacrolimus en laboratorio y fermentaciones industriales es relativamente baja, un gran número de investigaciones se han centrado en descifrar los cuellos de botella existentes en el proceso de biosíntesis de tacrolimus, proponiendo la baja

disponibilidad intracelular de los precursores como uno de los principales factores limitantes (Barreiro y Martínez-Castro, 2014).

Recientemente fueron publicados una serie de trabajos de metabolómica donde se descifran las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de tacrolimus así como se identifican los metabolitos claves para su síntesis (Huang *et al.*, 2013a; 2013b; Xia *et al.*, 2013). Previo a dichos trabajos, varios autores lograron un incremento del título de producción de tacrolimus tras realizar experimentos de manipulación de genes de las rutas biosintéticas y enriquecimiento del medio de cultivo con moléculas precursoras. Siguiendo esta estrategia Mo *et al.* (2009) consiguieron un incremento de la producción de 3,4 veces aumentando la concentración intracelular del precursor metilmalonil-CoA en *S. clavuligerus* CKD1119 mediante expresión heteróloga de los genes *mutAB* de *Saccharopolyspora erythraea*, codificantes de la ruta de la metilmalonil mutasa (ruta MutAB), junto con la adición de metil oleato al medio de cultivo. En las otras dos rutas de biosíntesis de metilmalonil-CoA estudiadas, propionil-CoA carboxilasa (ruta PPC) y metilmalonil-CoA ligasa (ruta MatB), no se obtuvo un incremento significativo de la producción de tacrolimus (Figura 1.11).

Sin embargo, un trabajo posterior realizado por Mo *et al.* (2013), en el que los autores estudian nuevamente las tres rutas de síntesis de metilmalonil-CoA, aunque esta vez en la cepa mutante inducida por luz UV y nitrosoguanidina *Streptomyces* sp. RM7011, observaron que únicamente la sobreexpresión de los genes *accAI* y *pccB* implicados en la ruta de la

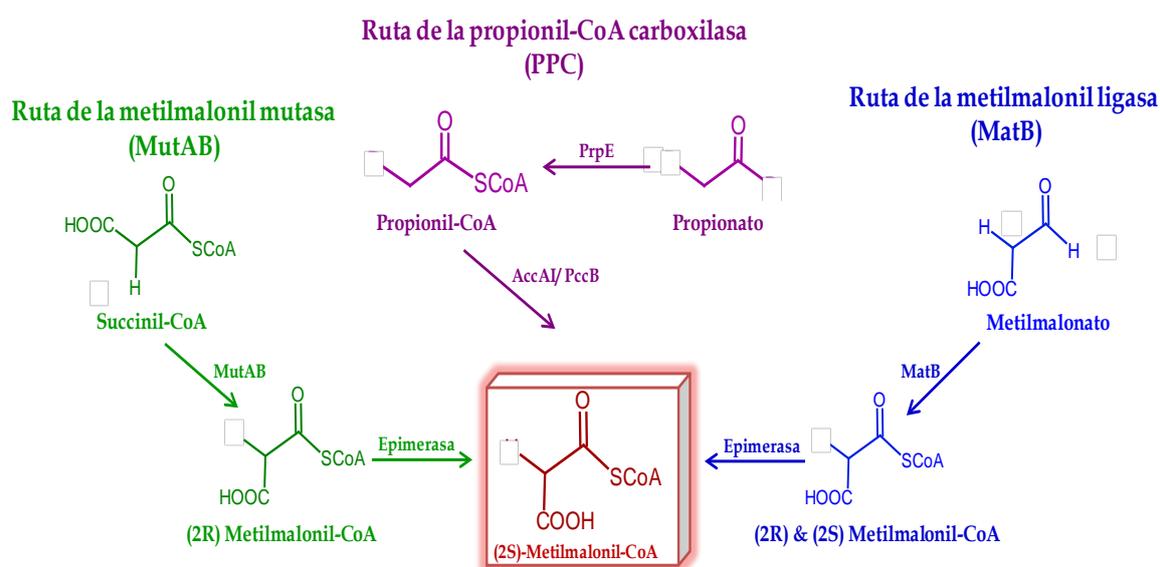


Figura 1.11. Rutas de biosíntesis de la unidad extendedora (2S)-Metilmalonil-CoA. La ruta de la metilmalonil mutasa (MutAB) es la ruta de biosíntesis de la unidad extendedora metilmalonil-CoA en la cepa *S. clavuligerus* CKD1119. Para el resto de las cepas productoras de tacrolimus y rapamicina estudiadas, la ruta de la propionil-CoA carboxilasa (PPC) es la principal ruta de biosíntesis de metilmalonil-CoA. Fuente: figura modificada de Mo *et al.* (2009).

propionil-CoA carboxilasa (PPC) producía un aumento de la producción de tacrolimus. En este caso, el mayor título se obtuvo en el mutante sobreexpresado junto con la adición al medio de cultivo de vinilpropionato (precursor de la ruta PPC) y Tween 80 (agente estimulador de la actividad lipasa). La enzima lipasa cataliza la conversión de vinilpropionato a propionil-CoA, el cual es finalmente convertido a metilmalonil-CoA mediante la ruta PPC (Mo *et al.*, 2013). La actividad lipasa ya fue relacionada con el título de producción de tacrolimus en *S. clavuligerus* CKD1119 (Kim y Park, 2007). Dichos autores observaron que la mayor producción de tacrolimus se obtenía utilizando como fuente de carbono una mezcla de aceite de maíz junto con almidón soluble, de modo que la lipasa actuaba rompiendo los triacil glicerolés (principales componente de aceites) (Kim y Park, 2007).

Al igual que ocurre en la síntesis de tacrolimus, la ruta de la propionil-CoA carboxilasa es la principal ruta de biosíntesis de metilmalonil-CoA en la cepa mutante productora de rapamicina *S. hygroscopicus* UV2-2. La producción de rapamicina se incrementó 1,4 veces tras la sobreexpresión de los genes de la ruta PPC y la suplementación del medio con propionato (Jung *et al.*, 2011).

Otro trabajo publicado en esta línea fue realizado por Chen *et al.* (2012). Los autores lograron un aumento de la producción de tacrolimus en un 150 % en *S. tsukubaensis* tras la duplicación de los genes específicos de las rutas de las unidades extendedoras metoximalonil ACP y alimalonil-CoA, *fkbgHIJK* y *tcsABCD*, respectivamente, junto con la suplementación optimizada de glucosa.

El año 2013 es el año clave para el descifrado y elucidación de todas las rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis de tacrolimus. En un primer trabajo el grupo de Xia *et al.* (2013) realizó análisis metabólicos comparativos entre dos medios de cultivo: uno de alta y otro de baja producción de tacrolimus. Como resultado fueron identificados 98 metabolitos intracelulares, 13 de los cuales fueron relacionados directamente con la biosíntesis de tacrolimus (lactato, piruvato, septoheptulosa 7P, eritrosa 4P, sikimato, valina, prolina, leucina, treonina, metilmalonil-CoA, succinil-CoA, malonil-CoA y acetil-CoA). Estos metabolitos fueron asociados principalmente con 5 rutas metabólicas: las rutas del metabolismo central del carbono (glicólisis o ruta de Embden-Meyerhof-Parnas [EMP], ruta de los ácidos tricarbónicos [TCA] y ruta de las pentosas fosfato [PPP]), la ruta del sikimato y el metabolismo de aa. Basados en esta información se llevaron a cabo estrategias de adición exógena de precursores y aditivos al medio obteniéndose un incremento de la producción de tacrolimus de 251 a 405 mg/L y una reducción del 31% y el 39 % de los análogos FK520 Y FK506D, respectivamente (Xia *et al.*, 2013).

En un par de trabajos posteriores han sido descritas al detalle las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de precursores y cofactores implicados directamente en la síntesis de tacrolimus y sus análogos (Huang *et al.*, 2013a; 2013b). Los trabajos de metabolómica realizados por Huang *et al.* (2013a; 2013b) permitieron construir un modelo metabólico de escala genómica (en inglés “genome-scale metabolic model”-GSMM) obteniéndose 865 reacciones y 621 metabolitos. Este modelo ha permitido describir todas las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis*, así como identificar los genes diana objeto de manipulación génica para incrementar la concentración intracelular de precursores y cofactores implicados en la síntesis de tacrolimus y desviar el flujo de carbono desde otras rutas metabólicas hacia la ruta de tacrolimus (Figura 1.12). De este modo, en un primer trabajo Huang *et al.* (2013a) manipularon los genes de las rutas del metabolismo primario implicadas en la síntesis de tacrolimus; realizaron la disrupción del gen *gdhA*, directamente relacionado con el suministro de cofactores redox (NADPH) para la síntesis de tacrolimus y del gen *ppc* (codificante de una fosfoenolpiruvato carboxilasa), cuya interrupción aumenta la concentración intracelular de fosfoenolpiruvato (PEP), precursor de la unidad iniciadora de tacrolimus DHCHC. También realizaron la sobreexpresión de los genes; *dahp*, implicado en la ruta de biosíntesis de sikimato, aumentando la concentración de corismato (donador del grupo amino de la unidad iniciadora DHCHC); *pntAB*, implicado en la biosíntesis de NADPH; *accA2* implicado en la síntesis del precursor malonil-CoA; y por último *zwf2*, que participa en el suministro del cofactor NADPH y desvia el flujo hacia la síntesis de PEP y eritrosa 4 fosfato (E4P), precursor directo de la ruta del sikimato (Figura 1.12). Tras todas estas manipulaciones se obtuvo la cepa *S. tsukubaensis* HT- Δ GDH-DAZ que combina las siguientes modificaciones génicas: interrupción del gen *gdhA* y sobreexpresión de los genes *dahp*, *accA2* y *zwf2* y que resulta en un aumento de la producción de 1.47 veces con respecto a la cepa *S. tsukubaensis* D852 (158.7 mg/L) (Huang *et al.*, 2013a).

En un segundo trabajo de ingeniería metabólica, se llevó a cabo la sobreexpresión de los genes específicos de la biosíntesis de tacrolimus *fkbO*, *fkbp*, *fkbl*, *fkbm* y *fkbd*, y por tanto pertenecientes a rutas del metabolismo secundario (Huang *et al.*, 2013b) (Figura 1.13). Junto con la manipulación génica se llevaron a cabo estrategias de adición exógena de precursores y aditivos al medio, obteniéndose un incremento máximo de la producción de tacrolimus del 146 % (Huang *et al.*, 2013b). Por lo tanto, al igual que ocurre con otros metabolitos secundarios, un aumento en la producción de tacrolimus implica cambios importantes tanto en los precursores (DHCHC, malonil-CoA, metilmalonil-CoA, metoximalonil-ACP, alilmalonil-CoA y pipecolato), como en los cofactores (NADPH) y la energía (ATP),

aumentando la competencia entre el metabolismo primario y secundario e introduciéndose nuevos cuellos de botella en la síntesis de tacrolimus (Huang *et al.*, 2013b; Olano *et al.*, 2008).

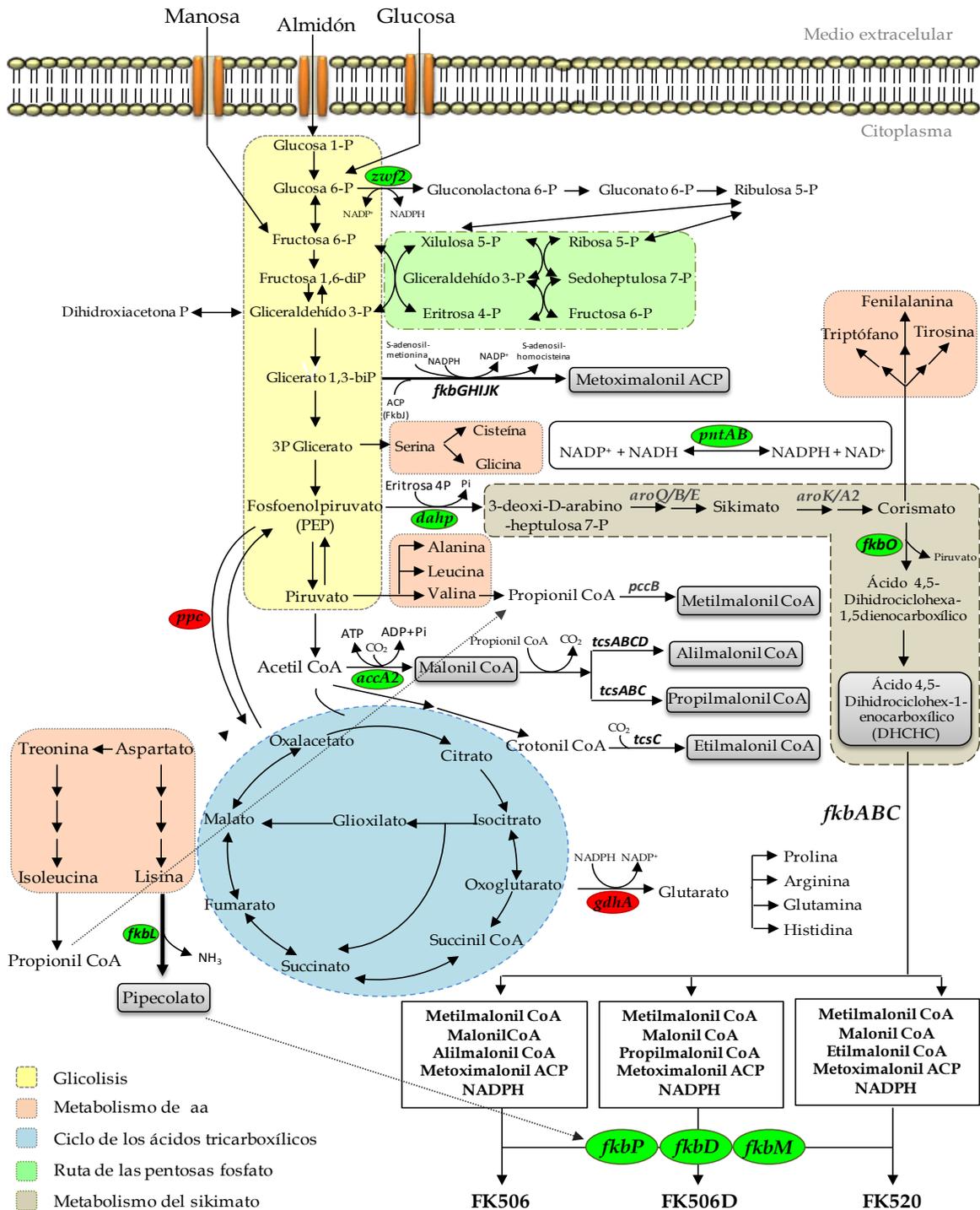


Figura 1.12. Representación de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de tacrolimus y sus análogos FK506D y FK520 en *S. tsukubaensis*. Los genes enmarcados en óvalos indican los genes manipulados genéticamente con influencia en la síntesis de tacrolimus y sus análogos: los ovalo verdes representan los genes sobreexpresados y los óvalos rojos indican los genes interrumpidos (según Huang *et al.*, 2013a; 2013b). Las cinco rutas metabólicas que intervienen en la síntesis de tacrolimus y sus análogos se encuentran coloreadas. Fuente: Figura basada en Barreiro y Martínez-Castro (2014), Huang *et al.* (2013a), Huang *et al.* (2013b) y Xia *et al.* (2013).

1.2.4. Especies productoras de tacrolimus

Tacrolimus fue descubierto a partir de un cultivo de la cepa *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 (Kino *et al.*, 1987), una de las cepas utilizadas en nuestro trabajo. Sin embargo, los primeros estudios relacionados con la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus no se realizaron hasta una década después en las especies *Streptomyces* sp. MA6548 y *Streptomyces* sp. MA6858, también llamada *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y posteriormente caracterizada como *S. tacrolimicus* (Martínez-Castro *et al.*, 2011; Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998; Shafiee *et al.*, 1994) especie utilizada en nuestro trabajo. Debido a la gran importancia tanto económica como farmacológica de tacrolimus, en los últimos años las investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevas cepas productoras de tacrolimus (Tabla 1.2). Estudios filogenéticos de las cepas productoras muestran que los distintos organismos productores de tacrolimus presentan divergencia evolutiva, lo que sugiere que la agrupación génica de biosíntesis se ha transferido horizontalmente dentro del género *Streptomyces* (Garrity *et al.*, 1993; Muramatsu *et al.*, 2005).

1.2.4.1. *Streptomyces tsukubaensis*

El inmunosupresor tacrolimus o FK506 fue descubierto a partir de un cultivo de la cepa *Streptomyces tsukubaensis* aislado de una muestra de suelo de Tsukuba, una región situada al norte de Japón (Kino *et al.*, 1987). De hecho, el nombre de tacrolimus deriva de *Mount Tsukuba* (donde el organismo fue aislado), *macrolide* (porque estructuralmente es un policétido macrólido) e *immunosuppressant* (por su capacidad para inhibir la respuesta inmune). Dicha cepa fue patentada bajo el nombre de *Streptomyces tsukubaensis* N° 9993 por Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd. (posteriormente Astellas Pharmaceutical Co. Ltd) y depositada en el *Fermentation Research Institute* (Japón) con el número de depósito FERM BP-927. Posteriormente, se redepuso en 1989 en el *Agricultural Research Culture Collection International Depository* (EEUU) con el número de depósito NRRL 18488, aunque no ha sido hasta el año 2013 cuando su nombre ha sido validado (Muramatsu *et al.*, 2013).

A los primeros trabajos realizados en esta cepa para caracterizar los genes implicados en la síntesis de tacrolimus (Andexer *et al.*, 2011; Goranovic *et al.*, 2010; Mo *et al.*, 2011) han seguido una batería de investigaciones para intentar aumentar su producción, ya que la baja concentración a la que es producido sigue siendo un factor limitante en procesos industriales. Con este objetivo, en los últimos años se han utilizado estrategias de enriquecimiento de nuevos precursores (Turlo *et al.*, 2012), de unidades extendedoras (Chen *et al.*, 2012), enriquecimiento del medio con nutrientes (Huang *et al.*, 2013 a, b), optimización

de medios de producción semidefinidos (Martínez-Castro *et al.*, 2013) y enriquecimiento con precursores tras realizar ingeniería metabólica (Huang *et al.*, 2013a).

1.2.4.2. *Streptomyces tacrolimicus*

La cepa *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (Merck Culture Collection N^o. MA 6858) fue aislada por primera vez de excrementos de ciervo de cola blanca en Virginia (EEUU) en 1992 (Dumont *et al.*, 1992). Dicha cepa fue patentada por la compañía farmacéutica Merck & Co y las primeras patentes se centraron en caracterizar la cepa morfológicamente y aportar medios de crecimiento y producción de tacrolimus útiles para cualquier cepa productora de tacrolimus pero especialmente para *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (Dumont *et al.*, 1992; Salituro *et al.*, 1993). Recientemente esta cepa fue caracterizada genotípica, fenotípica y quimiotaxonómicamente, proponiéndose el nombre de *S. tacrolimicus* (Martínez-Castro *et al.*, 2011). Fue en esta cepa donde se caracterizó el primer gen de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus (Shafiee *et al.*, 1994).

Tabla 1.2. Listado de cepas productoras de tacrolimus descritas en bibliografía*.

Nombre de la cepa	Referencia
<i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD1119	Kim y Park, 2008
<i>Streptomyces clavuligerus</i> KCTC 10561BP	Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces durmitorensis</i> MS405 ^T (=DSM 41863 ^T ; CIP 108995 ^T) *	Savic <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces glaucescens</i> MTCC 5115	Kumar <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces kanamyceticus</i> KCC S-0433 ^T (=KCTC 9225)	Mo <i>et al.</i> , 2011; Muramatsu <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i> sp.	Mishra y Verma, 2012
<i>Streptomyces</i> sp. 6260	Muramatsu <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i> sp. 49A	Muramatsu <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i> sp. 94128	Muramatsu <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 53770 (=MA 6548)	Garrity <i>et al.</i> , 1993
<i>Streptomyces</i> sp. KCTC 11604BP	Mo <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces</i> sp. KCCM 11116P	Mo <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomyces</i> sp. 6949	Sigmund <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces</i> sp. TST8	Jung <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces tacrolimicus</i> ATCC 55098 ^T (=CECT 7664 ^T) [previamente <i>Streptomyces</i> sp. ATCC 55098 (MA 6858)]	Garrity <i>et al.</i> , 1993; Martínez-Castro <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces tsukubaensis</i> 9993, NRRL18488	Kino <i>et al.</i> , 1987; Martínez-Castro <i>et al.</i> , 2013; Muramatsu y Nagai, 2013

(*)Cepa productora de un compuesto inmunosupresor con mecanismo de acción similar al tacrolimus Fuente: Barreiro y Martínez-Castro (2014).

Al igual que ocurriera con *S. tsukubaensis*, la producción de tacrolimus por *S. tacrolimicus* también ha sido objeto de optimización; en 1997 Yong y Choi describieron un medio definido para la fermentación de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y más recientemente Singh y Behera (2009) optimizaron la producción de tacrolimus modificando las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo. También se han realizado trabajos de ingeniería genética en la cepa caracterizándose un receptor de γ -butirolactonas y su efecto sobre la producción de tacrolimus (Salehi-Najafabadi *et al.*, 2011).

1.3. Metabolismo Secundario y su regulación

1.3.1. Género *Streptomyces*: Gran productor de metabolitos secundarios

La era de los antibióticos tiene su origen en las conocidas observaciones de Alexander Fleming en 1928, en el St. Mary's Hospital de Londres, sobre el efecto inhibitorio que el hongo *Penicillium notatum*, contaminante accidental de una placa de cultivo, ejercía sobre los estafilococos sembrados en ella. Una vez superadas las limitaciones iniciales para la obtención de penicilina en grandes cantidades, en 1943 se consiguió la producción a gran escala en laboratorios industriales, lo que permitió salvar miles de vidas en la Segunda Guerra Mundial.

Un segundo evento que marcaría la historia del tratamiento de enfermedades infectocontagiosas sería el descubrimiento de la estreptomicina, atribuido a Selman Waksman. Durante la primera etapa de su carrera (1915-1939), Waksman centró sus investigaciones en el estudio de la comunidad de microorganismos del suelo, estudiando sus interacciones y potencial para la fertilización del suelo, prestando especial atención a los actinomicetos, lo cual le otorgó reconocimiento internacional como microbiólogo del suelo (Hopwood, 2007). La frase histórica citada por Waksman ante sus colaboradores tras el éxito del descubrimiento de la penicilina: "*Drop everything; see what these English have done with a mould. I know the Actinomycetes will do better*", supuso el inicio de una nueva etapa profesional centrada en la búsqueda de compuestos de actividad farmacológica (Wainwright, 1990). Entre 1939 y 1942, Waksman y colaboradores estudiaron un gran número de actinometos en busca de nuevos antibióticos mediante un rastreo a gran escala de muestras de suelo. En 1940, aisló la actinomicina A a partir de un cultivo de *Actinomyces antibioticus* (reclasificado como *Streptomyces antibioticus*), primer antibiótico aislado a partir de un actinomiceto, aunque no tuvo aplicación médica por su alta toxicidad. Posteriormente fueron descubiertos otros antibióticos a partir de cultivos de *Streptomyces*, como clavacina, fumigatina y estreptotricina, nuevamente sin aplicación clínica. El bajo éxito obtenido con esta estrategia llevó a Waksman a variar la línea de investigación buscando a partir de ese momento antibióticos activos frente al bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (causante de la tuberculosis) identificado por Robert Koch en 1882. Tras cultivar y analizar miles de cepas, en 1944, Albert Schatz, Elizabeth Bugie y Selman Waksman, publicaron el aislamiento del primer antibiótico aminoglucósido y primer fármaco efectivo para el tratamiento de la tuberculosis, aislado de un cultivo de *Streptomyces griseus*: la estreptomicina (Schatz *et al.*, 1944), descubrimiento por el cual Waksman recibió el premio Nobel de Medicina en 1952, reconociéndose la coautoría a Schatz en 1988.

Al descubrimiento de la estreptomycinina siguió una gran batería de antibióticos producidos por especies del género *Streptomyces*, como cefalosporina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina o neomicina, entre otros, convirtiendo al género en uno de los que suscita mayor interés tanto para investigadores como para empresas farmacéuticas, no solo por su capacidad para producir antibióticos (antibacterianos y antifúngicos), sino por ser productores de una gran diversidad de compuestos de importancia farmacológica como antitumorales (actinomicina, daunorrubicina, mitramicina), inmunosupresores (tacrolimus, rapamicina, ascomicina), antifúngicos (pimaricina, nistatina, anfotericina B, candicidina), agentes antihelmínticos (avermectina), herbicidas (bialafos, fosfotricina), pesticidas (polioxina), antivirales (concanamicina A, gilvocarcina), insecticidas (indanomicina), entre otros (Chaudhary *et al.*, 2013; Procópio *et al.*, 2012; Weber *et al.* 2003) (Figura 1.13).

Entre los años 50-70, aproximadamente el 60 % de los antibióticos de nuevo descubrimiento eran producidos por actinomicetos, casi exclusivamente por el género *Streptomyces*. Actualmente el porcentaje ha disminuido considerablemente, siendo producidos el 39 % de los metabolitos microbianos por actinomicetos (y de ellos 80% por *Streptomyces*) aunque esto no significa que hayan perdido interés como fuente de metabolitos secundarios, sino que es reflejo del cambio producido en los últimos años en el mercado farmacéutico (Bérdy, 2012; Watve *et al.*, 2001). En la actualidad, el desarrollo e



Figura 1.13. Fecha de descubrimiento y origen de los principales metabolitos secundarios. En negrita destacan los compuestos producidos por especies del género *Streptomyces*.

introducción de un nuevo compuesto en el mercado supone entre 10 y 12 años y de 800 a 2000 millones de dólares en costes de I+D, siendo la duración media en el mercado de 8-10 años. Esto, junto con las estrictas regulaciones sobre pruebas clínicas y de seguridad de nuevos compuestos terapéuticos impuestas por los organismos reguladores, hace que las compañías farmacéuticas solo lancen al mercado aquellos productos que tendrán mayor incidencia en tratamientos terapéuticos y por tanto reportarán mayores beneficios (Bérdy, 2012).

1.3.2. Regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces*

La producción de metabolitos secundarios tiene lugar a través de rutas biosintéticas complejas mediante el uso de precursores procedentes del metabolismo primario. La biosíntesis de metabolitos secundarios en estreptomicetos coincide o precede ligeramente a la diferenciación morfológica en los cultivos en medio sólido o el inicio de la fase estacionaria en los cultivos en medio líquido, estando fuertemente relacionada con la escasez nutricional (Bibb, 2005; Martín, 2004).

De manera generalizada se considera que los genes necesarios para la producción de un metabolito individual junto con los genes de resistencia y de exportación de dicho metabolito, se encuentran agrupados conjuntamente en el cromosoma, por lo general en los extremos de éste o en ocasiones en plásmidos, siendo el caso más destacado el del megaplásmido pSCL4 de *S. clavuligerus* que acomoda unas 25 agrupaciones de metabolitos secundarios (Medema *et al.*, 2010). Dichas agrupaciones génicas, cuyo tamaño varía desde unas 15 kb a más de 100 kb, presentan frecuentemente genes reguladores de ruta que controlan la expresión de los genes de la agrupación de la que forman parte (Bibb, 1996; Martín y Liras, 2010).

Debido a la gran complejidad del proceso de biosíntesis del metabolismo secundario en *Streptomyces* existe un sistema jerárquico representado por varios niveles de regulación. De este modo se establecen cascadas reguladoras complejas donde los niveles más elevados se localizan separados de las agrupaciones génicas de biosíntesis y ejercen un efecto pleiotrópico o global en la regulación de múltiples metabolitos secundarios o en la producción de éstos y la diferenciación morfológica; mientras que los más bajos (reguladores de ruta) están implicados en la regulación de la producción de un metabolito secundario en particular (Martín y Liras, 2010).

La expresión de los reguladores específicos de ruta es dependiente de uno o varios factores pleiotrópicos, los cuales, a su vez, se activan o reprimen en respuesta a una gran variedad de factores fisiológicos como la tasa de crecimiento del microorganismo o

moléculas de señalización y señales nutricionales o medioambientales, como son la escasez de fosfato y nitrógeno, la presencia en el medio de quitina y N-acetilglucosamina, y los factores de estrés como daño de la pared celular, respuesta a choque térmico o cambios de pH, entre otros, activando la biosíntesis de metabolitos secundarios como una posible respuesta de adaptación al medio (Martín, 2004; Rigali *et al.*, 2008).

Sin embargo, las investigaciones de los últimos años demuestran que el mecanismo de regulación del metabolismo secundario de *Streptomyces* es mucho más complejo que una estructura piramidal de regulación, dando paso a un mecanismo donde la regulación cruzada, la retroalimentación y la versatilidad se asemeja más a una realidad donde los reguladores específicos de ruta ejercen efecto regulador más allá de su propia agrupación actuando sobre otras agrupaciones, y donde, en contra de lo que se creía, reguladores de ruta ejercen un control cruzado sobre reguladores pleiotrópicos (Huang *et al.*, 2005; Martín y Liras, 2010).

El conocimiento de la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios resulta de gran interés, puesto que la manipulación genética de los reguladores constituye una de las principales dianas cuando se busca un aumento en la producción de compuestos de interés industrial (Chen *et al.*, 2010).

1.3.2.1. Reguladores globales

1.3.2.1.1. Reguladores globales de la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios

❖ Señalización intracelular: el papel de ppGpp

Un importante mecanismo que desencadena la respuesta adaptativa ante una situación de estrés nutricional y por tanto una disminución de la tasa de crecimiento, está mediada por los nucleótidos de guanosina altamente fosforilados, ppGpp (guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato) y pppGpp (guanosina 5'-trifosfato-3'-difosfato), también conocida como respuesta estricta (Yang *et al.*, 1974).

La respuesta estricta, descrita inicialmente en *Escherichia coli*, media la regulación de la síntesis de ARNr y la producción de ribosomas como respuesta a escasez de aminoácidos necesarios para sostener el crecimiento de la población bacteriana. Bajo condiciones limitantes de aminoácidos, ppGpp es sintetizado por RelA, una proteína asociada a los ribosomas, en respuesta a la llegada al sitio A del ribosoma de un ARNt que no esté cargado con un aminoácido (Sands y Robert, 1952; Stent y Brenner, 1961). Estudios posteriores mostraron que el ppGpp actúa más como un regulador global que como un regulador específico de la producción de ribosomas, modificando el patrón de transcripción de la

célula, reduciendo la expresión de los genes relacionados con el crecimiento rápido y proliferación y aumentando la de aquellos genes relacionados con la supervivencia, virulencia y diversos mecanismos de repuesta frente a estrés (Magnusson *et al.*, 2005).

En el caso de *Streptomyces*, ha sido demostrado en diferentes especies que el ppGpp presenta efecto regulador tanto en la síntesis de metabolitos secundarios como en la diferenciación morfológica (Hesketh *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 1991; Ochi *et al.*, 1987). Concretamente, en *S. coelicolor* el mutante $\Delta relA$ presenta retraso en el inicio y desarrollo de la diferenciación morfológica, presentando alteración morfológica de la colonia, siendo además defectivo en la producción de los antibióticos undecilprodigiosina y actinorrodina, debido a la disminución de la transcripción de los reguladores específicos de ruta *redD* y *actIII-ORF4*, respectivamente (Chakraborty y Bibb, 1997). Aunque en la mayoría de las especies de *Streptomyces* el (p)ppGpp actúa como una señal intracelular desencadenante de la biosíntesis de metabolitos secundarios, en *S. clavuligerus* parece actuar como un represor de la síntesis de cefamicina C y ácido clavulánico, lo que puede ser explicado por la relación entre la tasa de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, ya que al contrario que ocurre con la mayoría, la cefamicina C y el ácido clavulánico se sintetizan durante la fase de crecimiento exponencial además de en la fase estacionaria (Gómez-Escribano *et al.*, 2008).

❖ Señalización extracelular: γ -butirolactonas

Las γ -butirolactonas, primeras moléculas descritas que median la señalización intercelular entre bacterias, fueron descubiertas en el género *Streptomyces*, siendo características de éste, aunque también están presentes en otros géneros de actinomicetos (Khokhlov *et al.*, 1967; Aroonsri *et al.*, 2008).

La primera γ -butirolactona (GBL) caracterizada fue el factor A o factor autorregulador de *S. griseus* (Khokhlov *et al.*, 1967). Una vez sintetizado el factor A, éste se secreta y acumula en el medio, siendo necesaria una concentración del orden de nanomolar para que se desencadene la cascada de regulación en la que participa y que ha sido completamente elucidada (Horinouchi, 2002). Cuando la concentración del factor A alcanza el nivel crítico, lo que ocurre hacia la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se une a la proteína citoplasmática ArpA (en inglés "A factor receptor protein"), que provoca la liberación de esta última de la región promotora del gen *adpA*, permitiendo su transcripción. Como resultado, AdpA activa la transcripción de los genes del regulón AdpA implicados tanto en el metabolismo secundario (como por ejemplo, el gen *strR*, regulador específico para la ruta biosintética de la estreptomicina) como en la diferenciación morfológica (Higashi *et al.*, 2007; Horinouchi, 2002; Ohnishi *et al.*, 2005).

El efecto regulador ejercido por el factor A sobre la diferenciación morfológica es más la excepción que la norma, ya que la mayoría de las γ -butirolactonas limitan su control exclusivamente al metabolismo secundario. Otras γ -butirolactonas aisladas y caracterizadas han sido el butanólido *virginiae* (VB) de *S. virginiae* (Kawachi *et al.*, 2000), IM-2 de *S. lavendulae* (Kitani *et al.*, 1999), SCB1 de *S. coelicolor* (Takano *et al.*, 2005), SRB1 y SRB2 de *S. rochei* (Arakawa *et al.*, 2012), todas ellas γ -butirolactonas implicadas exclusivamente en la regulación del metabolismo secundario. En la mayoría de los casos no han sido caracterizadas la moléculas señal tipo γ -butirolactona que median la regulación aunque sí han sido identificados un gran número de homólogos de receptores de GBLs, los cuales están codificados por genes que se encuentran localizados, en su mayoría, próximos a la agrupación génica de biosíntesis del antibiótico que regulan (Takano, 2006). Existen distintos niveles de complejidad, y no es raro encontrar múltiples receptores de γ -butirolactonas en la misma bacteria y ocasionalmente varios receptores se encuentran localizados en la misma agrupación, como es el caso de la agrupación génica de biosíntesis de tilosina de *S. fradie*, estableciéndose una cascada reguladora donde el receptor principal denominado TyIP reprime el resto de receptores homólogos y proteínas reguladoras (Bignell *et al.*, 2007; Stratigopoulos *et al.*, 2002).

La mayoría de las proteínas receptoras de γ -butirolactonas actúan como represores de la transcripción, de modo que la unión de las γ -butirolactonas específicas a dichos receptores induce la expresión de los genes diana. Como excepciones al efecto represor encontramos el receptor de butirolactonas SpbR de *S. pristinaespiralis*, que actúa como regulador positivo en la biosíntesis de pristinamicina y Gbr de *S. tacrolimicus* y BulR1 de *S. tsukubaensis*, que actúan como reguladores positivos en la biosíntesis de tacrolimus, afectando también a la diferenciación morfológica, observándose un retraso en la esporulación (Folcher *et al.*, 2001; Salehi-Najafabadi *et al.*, 2011; 2014).

Además de las GBLs han sido descritas varias moléculas que median la señalización extracelular en *Streptomyces* como el factor Pi, que suprime la producción de piramicina a concentraciones del orden de nanomolar de manera similar a moléculas de *quorum-sensing*, en *S. natalensis* (Recio *et al.*, 2004). Una nueva familia de moléculas denominadas metilnomicinafuranos (MMFs), fueron descubiertas en *S. coelicolor*, las cuales actúan como inductores de la biosíntesis de antibióticos de una manera análoga a las GBLs (Corre *et al.*, 2008). Más recientemente, Kitani *et al.* aislaron y caracterizaron una molécula que denominaron avenólido, efectiva a una concentración de 4 nM y que es esencial para la inducción de avermectina en *S. avermitilis*, constituyendo una posible nueva clase de autorreguladores de *Streptomyces* (Kitani *et al.*, 2011).

❖ Señalización intercelular: Genes *bld*

Como ha sido expuesto en el apartado 1.1.4, los miembros del género *Streptomyces* exhiben un ciclo vital complejo, desarrollando como parte de su ciclo estructuras multicelulares (micelio aéreo) que en último término darán lugar a esporas unicelulares. Para que exista una sincronización en esas estructuras multicelulares es necesaria una red de comunicación intercelular que medie el control de los procesos de diferenciación.

En *S. coelicolor*, los genes *bld* (denominados A, B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N) gobiernan una cascada de señalización extracelular que regula tanto la diferenciación morfológica, (controlando entre otras la síntesis de la proteína hidrofóbica SapB esencial para la formación del micelio aéreo), como la diferenciación química o fisiológica (Elliot *et al.*, 1998; Willey *et al.*, 1993) (Figura 1.14). Los mutantes *bld* son incapaces de formar micelio aereo (de ahí la denominación de fenotipo calvo, del inglés “bald”), siendo la mayoría de los mutantes (a excepción de *bldC*) defectivos en la producción de metabolitos secundarios (Chater, 2006; Elliot *et al.*, 1998).

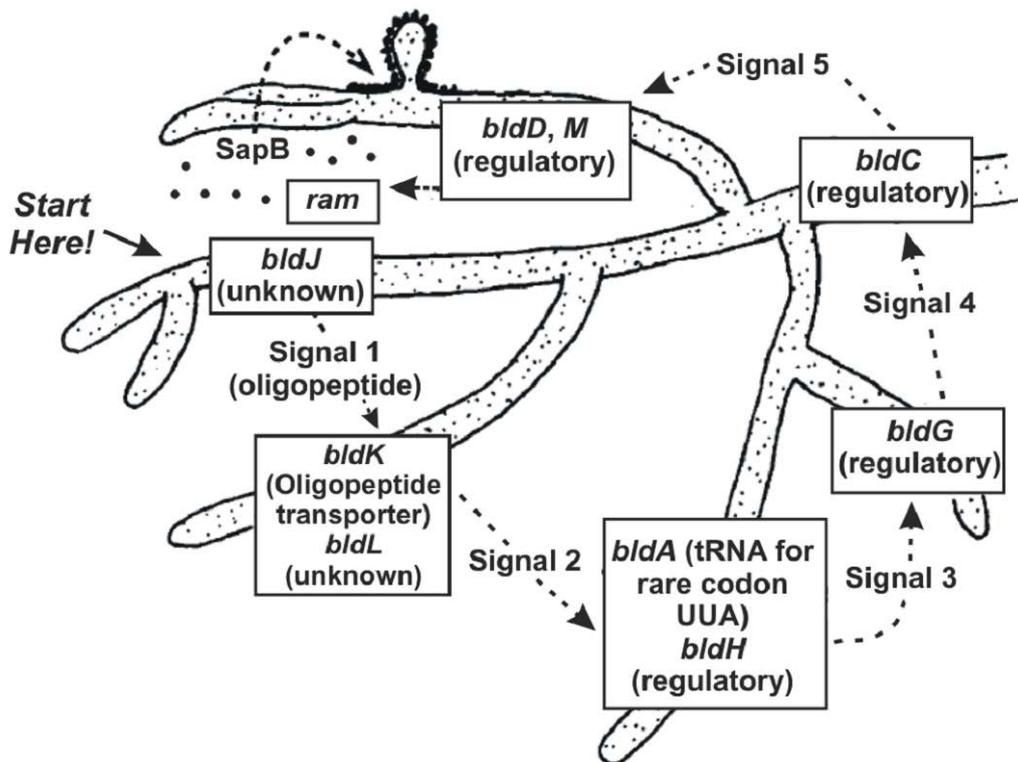


Figura 1.14. Cascada de señalización extracelular mediada por los genes *bld* implicada en el desarrollo del micelio aéreo en *S. coelicolor*. La cascada de señalización se inicia con la señal 1 (oligopéptido), producida de manera dependiente del gen *bldJ*, que se acumula extracelularmente. El oligopéptido es captado por el transportador de oligopéptido, codificado por el gen *bldK*, lo que desencadena la señal 2 y así sucesivamente. Finalmente se produce la proteína hidrofóbica SapB, esencial para la formación del micelio aéreo, bajo la regulación del gen *bldD*. Fuente: Tomada de Salehi-Najafabadi (2010).

Aunque el efecto regulador de los mutantes *bld* en la biosíntesis de metabolitos secundarios puede ser indirecto, el gen *bldA* ejerce una regulación directa en el control de la diferenciación morfológica y química. El gen *bldA* codifica el único ARNt que puede traducir el codón de leucina UUA en *Streptomyces*, siendo la frecuencia de genes que incluyen el codón TTA del orden del 3 %. Cabe destacar que todos los genes que contienen dicho triplete son genes relacionados con la diferenciación morfológica (como el gen *adpA*) o genes del metabolismo secundario, estando presente especialmente en genes reguladores de ruta, como el regulador específico de biosíntesis de actinorrodina, *actIII-ORF4* (Chater y Chandra, 2008).

La formación del micelio aéreo en *Streptomyces* depende de una serie de moléculas extracelulares que son intercambiadas entre células mediante difusión (Willey *et al.*, 1993). Dichos autores observaron que la formación de micelio aéreo en mutantes *bld* puede ser restaurada si éstos se encuentran próximos a cepas silvestres, ejerciéndose una complementación extracelular. Posteriormente, fue demostrado que la cascada de señalización ejercida por los genes *bld* era jerárquica, ya que cuando eran sembrados distintos mutantes en placas de agar se restauraba la formación de micelio aéreo (Nodwell *et al.*, 1996). Los mismos experimentos fueron usados para aislar y caracterizar el factor Pi de *S. natalensis* (Recio *et al.*, 2004)

❖ Señalización nutricional mediada por N-acetilglucosamina: DasR

La ya mencionada coincidencia del inicio de la diferenciación morfológica y bioquímica en el género *Streptomyces* sugiere la presencia de un regulador global que conecta ambos procesos en respuesta a una señal ambiental determinada. Dicho regulador global ha sido caracterizado (denominándose DasR), al igual que la señal nutricional (la N-acetilglucosamina) que desencadena la cascada reguladora (Rigali *et al.*, 2006).

La N-acetilglucosamina (GlcNAc), componente de la pared celular bacteriana (peptidoglicano) y monómero del polímero de origen natural más abundante (quitina), es una de las principales fuentes de carbono y nitrógeno de los estreptomicetos. Además, la GlcNAc es una importante molécula señalizadora, que de manera singular, puede transmitir información opuesta en función del estado nutricional del medio. En condiciones favorables a nivel nutricional (abundancia del polisacárido quitina), la acumulación de GlcNAc promueve el crecimiento, bloqueando por tanto la diferenciación morfológica, mientras que en situación de escasez nutricional (degradación de la pared celular bacteriana), la acumulación de GlcNAc desencadena tanto la biosíntesis de metabolitos secundarios como la morfogénesis (Rigali *et al.*, 2006; 2008).

DasR es un regulador transcripcional de *S. coelicolor*, que controla la expresión de los genes de transporte y metabolismo de N-acetilglucosamina, además de inhibir la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina mediante unión a la secuencia operadora de los genes reguladores específicos de ruta de ambas agrupaciones biosintéticas. En situación de escasez nutricional, la GlcNAc se introduce en la célula y es fosforilada a N-acetilglucosamina-6fosfato (GlcNAc-6P) que actúa como efector alostérico de DasR imposibilitando la unión de este a la secuencia promotora de los genes reguladores de ruta, permitiéndolo su transcripción y por tanto la formación de actinorrodina y undecilprodigiosina. Sin embargo, en situación de abundancia nutricional, la N-acetilglucosamina bloquea la esporulación y la producción de antibióticos, aunque se desconoce el mecanismo molecular completo que media dicho bloqueo (Swiatek *et al.*, 2012).

1.3.2.1.2. Reguladores pleiotrópicos de la biosíntesis de antibióticos

Los reguladores pleiotrópicos que se engloban en este apartado actúan únicamente sobre el metabolismo secundario influyendo sobre la expresión de los reguladores específicos de ruta en respuesta a diferentes señales ambientales.

A continuación se muestran algunos de los ejemplos más relevantes acerca de este nivel de regulación, con algunas de las cascadas de señalización más estudiadas.

❖ **Sistemas de serina-treonina quinasas: Sistema AfsK/ AfsR**

Las fosforilaciones reversibles en residuos de serina, treonina y tirosina mediante la acción de proteínas quinasas y fosfatasa constituyen el sistema regulador principal de muchos procesos celulares en organismos eucariotas (Hanks y Hunter, 1995). Aunque inicialmente se consideraba que el sistema de transducción de señal mediado por quinasas era exclusivo de eucariotas, en las últimas décadas han sido caracterizados sistemas serina-treonina quinasas en procariotas (Bakal y Davies, 2000). La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* reveló la presencia de cerca de 40 proteínas serina/treonina o tirosina quinasas, siendo la más estudiada la quinasa AfsK (Horinouchi, 2003). AfsK y los homólogos AfsL y PkaG son serina/treonina quinasas capaces de autofosforilarse en residuos de serina/treonina en respuesta a señales ambientales aún desconocidas para después transferir el grupo fosfato a residuos serina/treonina del regulador pleiotrópico AfsR, que una vez fosforilado se une al promotor del gen *afsS* permitiendo su transcripción (Sawai *et al.*, 2004).

El gen *afsS* codifica una proteína tipo factor sigma de pequeño tamaño que regula la expresión de un gran número de genes, en su mayoría relacionados con el metabolismo secundario, actuando como activador transcripcional de varios genes reguladores específicos de ruta como *actII-ORF4* y *redD*, implicados en la producción de actinorrodina y

undecilprodigiosina, respectivamente. Además, se ha observado que un número elevado de genes relacionados con el estrés nutricional se ven afectados en el mutante *afsS*, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se ejerce la regulación (Lee *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2008).

El sistema AfsK/AfsR no es exclusivo de *S. coelicolor*, ya que han sido descritos sistemas serina/treonina quinasas homólogos en otras especies del género *Streptomyces*. Al igual que ocurre en *S. coelicolor*, los homólogos AfsK/AfsR están implicados en la mayoría de los casos en la regulación de metabolitos secundarios, como es el caso de *S. venezuelae* (Maharjan *et al.*, 2009), *S. peucetius* (Parajuli *et al.*, 2005) y *S. lividans* (Kim *et al.*, 2001), donde los homólogos AfsK/AfsR regulan la biosíntesis de picromicina, doxorubicina y actinorrodina, respectivamente. Sin embargo en *S. griseus* el sistema tipo AfsK/AfsR es necesario para la diferenciación morfológica, siendo el efecto regulador condicional a la presencia de glucosa en el medio (Umeyama *et al.*, 1999).

❖ **Sistemas de dos componentes: respuesta a limitación de fosfato por el sistema PhoR-PhoP**

Los sistemas de dos componentes (TCSs) son uno de los principales mecanismos de transducción de señal en procariotas. Sin embargo, no son exclusivos de éstos ya que han sido caracterizados TCSs en arqueas, hongos, levaduras y plantas, donde regulan procesos fisiológicos y moleculares tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Perry *et al.*, 2011).

Un sistema de dos componentes clásico está formado por una proteína receptora denominada histidina quinasa (HK) y una proteína efectora denominada regulador de respuesta (RR) codificados por un par de genes que normalmente se encuentran localizados adyacentes en el genoma. Ambas proteínas son proteínas multidominio, y de manera característica las HKs presentan un dominio transmisor en el extremo C-terminal y un dominio sensor o de entrada de naturaleza diversa en el extremo N-terminal. Por otro lado, los RRs presentan un dominio receptor conservado en el extremo N-terminal y un dominio efector variable en el extremo Ct o dominio de salida. Con tal organización, cuando un estímulo es percibido por el dominio sensor de la histidina quinasa, se produce la activación del dominio transmisor de ésta, mediante la autofosforilación de un residuo histidina conservado en dicho dominio. El dominio transmisor fosforilado (HK~P) interacciona con el dominio receptor de su pareja RR, lo que permite transferir el grupo fosfato desde el residuo histidina del dominio transmisor a un residuo aspártico conservado situado en el dominio receptor. En última instancia, el dominio receptor fosforilado interacciona con el dominio efector del RR, activando su efecto regulador (Gao *et al.*, 2007) (Figura 1.15).

A pesar de que los dominios individuales presentan una estructura y un mecanismo funcional común, el amplio rango de interacciones entre el dominio receptor y efector proporciona una gran diversidad en las estrategias reguladoras, optimizando la respuesta en función de la señal percibida.

Los sistemas de dos componentes presentan un amplio rango de respuesta, desde regulaciones metabólicas básicas como la utilización de carbono y nitrógeno, la asimilación de fosfato, el crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis hasta respuestas complejas como la formación de esporas o biofilms.

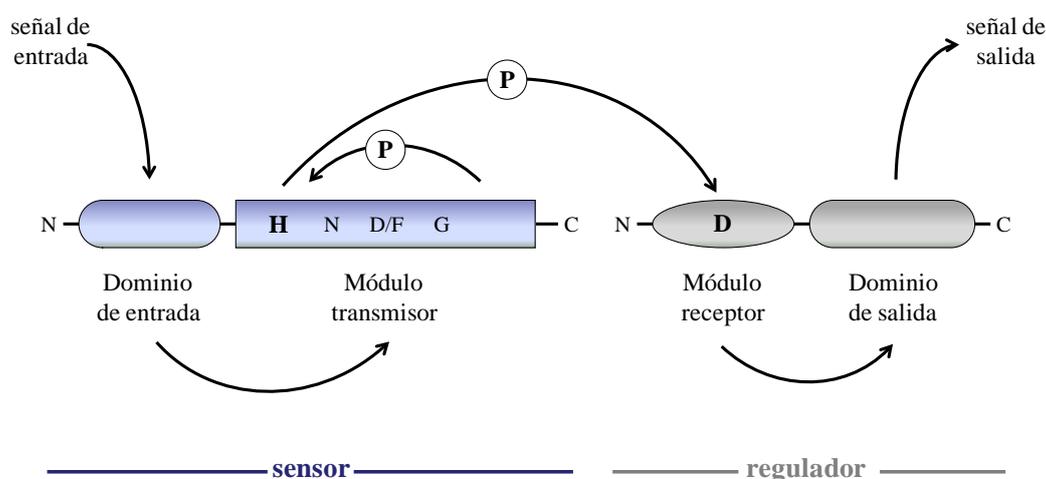


Figura 1.15. Esquema de un sistema clásico de dos componentes. Un sistema de dos componentes está constituido por una quinasa sensora y un regulador de respuesta. Ante un determinado estímulo la quinasa sensora se autofosforila en un residuo de histidina y se transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta provocando su activación. Fuente: Imagen tomada y modificada de Parkinson y Kofoid (1992).

El gran número de genomas bacterianos secuenciados disponibles en la actualidad ha aportado datos de gran interés sobre los sistemas de transducción de señal microbianos. La mayoría de los genomas secuenciados codifican numerosos TCSs, aumentando su número en los genomas de más tamaño y mayor complejidad del ciclo vital. Según las bases de datos MiST2 (“*Microbial Signal Transduction*”) (<http://mistdb.com>) y SENTRA (www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html) existen pocas bacterias que no presenten TCSs (ej. *Mycoplasma*, *Phytoplasma mali*, *Buchnera aphidicola*, *Blochmannia floridanus*), mientras que la mayoría contiene varias docenas (ej. *Bacillus anthracis*, *E. coli*, *S. coelicolor*) y unas pocas contienen más de 100 (ej. *Myxococcus xanthus*, *Desulfatibacillum alkenivorans*, *Methylobacterium radiotolerans* y varias cianobacterias) (Galperin *et al.*, 2010; Ulrich y Zhulin, 2010). En cuanto al género que nos ocupa, las 46 especies del género *Streptomyces* con genomas disponibles presentan un elevado número de TCSs; el microorganismo modelo *S. coelicolor* presenta 148 HKs (2 de ellas en el plásmido SCP1) y 88

RRs; en el genoma de *S. tsukubaensis* NRRL 18488, una de las cepas objeto de estudio de este trabajo, se han identificado 118 HKs y 80 RRs, mientras que el genoma de la especie patógena de humanos *S. somaliensis* presenta el menor número de TCSs, con 78 HKs y 37 RRs (<http://mistdb.com>).

Uno de los TCSs mejor caracterizados en diversas especies del género *Streptomyces* es el sistema PhoR-PhoP que media la respuesta frente a la escasez de fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2003). En respuesta a una limitación de fosfato en el medio, la proteína quinasa sensora PhoR fosforila al regulador de respuesta PhoP, que de este modo queda activado, regulando la expresión de manera directa de un conjunto de genes que constituyen el denominado regulón *pho*, permitiendo así la adaptación fisiológica de la célula a las condiciones de escasez de fosfato mediante activación y represión transcripcional (Rodríguez-García *et al.* 2007; 2009; Sola-Landa *et al.*, 2003; 2005; 2008). La regulación transcripcional de los genes del regulón *pho* está controlada por la unión directa de PhoP a las cajas PHO (Sola-Landa *et al.* 2005; 2008). Sin embargo, aunque la biosíntesis de metabolitos secundarios se suele encontrar reprimida en presencia de concentraciones altas de fostafo (Martín, 2004), los promotores de dichos genes no presentan cajas PHO en ninguno de los casos hasta ahora estudiados, lo que parece indicar una regulación indirecta (Santos-Beneit *et al.*, 2009).

El perfil regulador ejercido por PhoP rompe la visión tradicional de un modelo de regulación piramidal y escalonada, puesto que éste participa de un entramado de regulación complejo donde surgen interacciones con otros reguladores globales y otras rutas metabólicas. Existe una regulación cruzada de PhoP con el regulador AfsR (ver apartado anterior), ya que ambos se unen a la región promotora del también regulador *afsS* activando su expresión, tras lo cual son activados varios reguladores específicos de ruta de biosíntesis de metabolitos secundarios. Por otro lado, AfsR se une al promotor de *phoP* y *pstS* (Santos-Beneit *et al.*, 2009). Otro tipo de regulación cruzada ejercida por PhoP afecta a la ruta de asimilación de nitrógeno, ya que PhoP se une a los promotores de varios genes implicados en el metabolismo del nitrógeno (como *glnR*, *glnA*, *glnII* y *amtB*), no siendo esta regulación cruzada recíproca, ya que GlnR no se une a los promotores del regulón *pho* (Rodríguez-García *et al.* 2009; Sola-Landa *et al.*, 2013). Por su parte, AfsR también regula la expresión de *glnR* mediante unión directa a su promotor (Santos-Beneit *et al.*, 2012) (Figura 1.16).

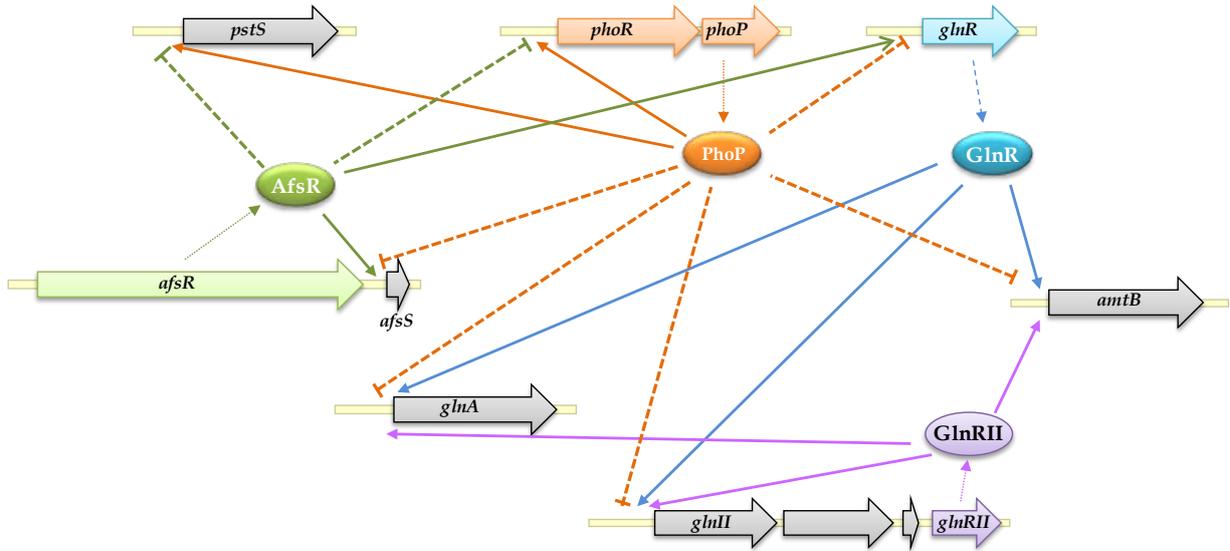


Figura 1.16. Regulación ejercida por PhoP, GlnR, AfsR y GlnRII sobre los principales genes implicados en el metabolismo del fosfato y del nitrógeno. Las flechas de línea continua indican inducción, mientras que las líneas discontinuas y extremos romos indican represión. Las flechas de línea discontinua indican traducción de los genes reguladores. Fuente: Imagen tomada y modificada de Martín *et al.* (2011) y Santos-Beneit *et al.* (2012).

1.3.2.2. Reguladores específicos de ruta.

Aunque se creía que el sistema de dos componentes era el principal modo de transducción de señales en procariotas, los análisis informáticos de más de 1123 genomas indican que la mayoría de los sistemas de transducción de señal (66 %) consisten en una única proteína que presenta un dominio de entrada “input” y otro de salida “output”, no estando presentes los dominios fosfotransferasa típicos de sistemas de dos componentes (Ulrich y Zhuling, 2010).

Si nos referimos al modelo clásico de regulación piramidal, los reguladores específicos de ruta actúan como “sistemas de un componente” acoplando estímulos químicos a respuestas transcripcionales concretas.

Las agrupaciones génicas de biosíntesis de metabolitos secundarios presentan frecuentemente reguladores transcripcionales específicos que ejercen una regulación directa sobre los genes de biosíntesis de la agrupación génica que regulan. Sin embargo, las investigaciones de los últimos años demuestran que el mecanismo de regulación del metabolismo secundario de *Streptomyces* es mucho más complejo, y en ocasiones los reguladores específicos de ruta ejercen un efecto regulador más allá de su propia agrupación, actuando sobre otras agrupaciones (De la Fuente *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005).

El conocimiento de los mecanismos de regulación ejercidos por los reguladores específicos de ruta puede ser de gran interés, ya que su manipulación genética podría

conducir a un incremento del rendimiento del metabolito de interés, ya sea mediante la sobreexpresión de un regulador positivo o la inactivación de un regulador con efecto represor (Chen *et al.*, 2010; Olano *et al.*, 2008).

Los reguladores específicos de ruta se clasifican en distintas familias. A continuación se describen las familias de reguladores más relevantes para el desarrollo de nuestro trabajo.

1.3.2.2.1. Familia de reguladores SARP

Un gran número de los genes reguladores específicos de ruta pertenecen a la familia SARP (del inglés "*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*"). Los miembros de esta familia son activadores transcripcionales y presentan de forma característica un dominio de unión a ADN tipo Hélice-vuelta-Hélice (HTH) alado (en inglés "*winged Hélix-Turn-Helix*") cercano al extremo N-terminal típico de las proteínas de la familia OmpR (Wietzorrek y Bibb, 1997).

Estudios de interacción entre los reguladores tipo SARP y los genes diana identifican secuencias de reconocimiento consistentes en repeticiones directas heptaméricas (5'-TCGAGXX-3') situadas corriente arriba de la región -10 de los promotores con los que interactúan (Arias *et al.*, 1999; Lombó *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2002; Wietzorrek y Bibb, 1997).

Los representantes mejor conocidos de la familia SARP son los reguladores específicos de ruta ActII-ORF4, CdaR y RedD, que controlan la biosíntesis de actinorrodina, CDA (del inglés "*calcium-dependent-antibiotic*") y undecilprodigiocina, respectivamente, en *S. coelicolor* (Fernández-Moreno *et al.*, 1991; Takano *et al.*, 1992); DnrI, que regula la síntesis de daunorubicina en *Streptomyces peuceitius* (Sheldon *et al.*, 2002); CcaR, que controla la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en *Streptomyces clavuligerus* (Pérez-Llanera *et al.*, 1997); y TylS, que regula la biosíntesis de tilosina en *Streptomyces fradiae* (Cundliffe, 2008), entre otros. Sin embargo, la familia de reguladores SARP no incluye exclusivamente reguladores de ruta, ya que el regulador pleiotrópico AfsR de *S. coelicolor* también presenta un dominio tipo SARP en el extremo N-terminal, aunque en este caso su estructura presenta adicionalmente un dominio ATPasa central y un dominio de repetición de tetratricopéptidos en su extremo C-terminal (Tanaka *et al.*, 2007).

La delección de los genes que codifican reguladores SARP se traduce en una disminución o eliminación total de la formación del metabolito secundario que regulan, capacidad que es recuperada mediante complementación con el gen silvestre. Por ello, la manipulación genética de estos genes presenta gran interés ya que puede conducir a un aumento de la producción de compuestos con interés comercial en fermentaciones industrial.

1.3.2.2.2. Familia de reguladores LuxR

Los reguladores de la familia LuxR se caracterizan por presentar un dominio HTH denominado LuxR en la región Carboxilo terminal, mediante el cual se unen al ADN ejerciendo su actividad reguladora (Choi y Greenberg, 1992). Esta familia de reguladores, descrita inicialmente en la bacteria simbiote *Vibrio fischeri*, está ampliamente caracterizada por su implicación en el fenómeno *quorum-sensing* (QS), mecanismo que permite la comunicación intercelular bacteriana mediante la liberación de una molécula señal o autoinductor. Cuando la población de *V. fischeri* alcanza un “quorum” (densidad celular), la bacteria responde al autoinductor N-acil homoserina lactona, sintetizado por LuxI (otro componente esencial del QS), sincronizando el comportamiento poblacional a través del regulador LuxR que activa la transcripción de los genes del operón *lux*, emitiendo la bacteria luminiscencia (Fuqua *et al.*, 1994). Las proteínas tipo LuxR relacionadas con el QS presentan en su estructura una región sensora y/o de unión a la molécula señal en el extremo N-terminal, además del ya mencionado motivo HTH en el extremo C-terminal.

Además de en la producción de luminiscencia, las proteínas homólogas LuxR/LuxI de otras especies de bacterias Gram negativas participan en la regulación de funciones variadas como la síntesis de exoenzimas, producción de factores de virulencia, transferencia de plásmidos, producción de antibióticos o formación de biofilms, entre otras (Bassler, 2002; Duerkop *et al.*, 2009; Swift *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2002). En los últimos años ha cobrado gran interés el papel regulador de las proteínas tipo LuxR en respuesta a moléculas producidas por otras especies bacterianas e incluso organismos eucariotas (plantas), aunque este tipo de reguladores LuxR no responden a la señalización producida por LuxI y por tanto se les denomina LuxR huérfano o tipo “solo” (González y Venturi, 2013; Subramoni y Venturi, 2009).

En cuanto a las bacterias Gram positivas, las proteínas tipo LuxR presentan dos peculiaridades: 1) no ha sido caracterizada ninguna proteína LuxI en el filo Actinobacteria, de modo que las bacterias del género *Streptomyces* no responden a N-acilhomoserina lactona como molécula de señalización, y por ello los reguladores tipo LuxR se consideran huérfanos o “solos”; 2) es frecuente que los reguladores tipo LuxR presenten dominios adicionales al dominio HTH. En este sentido Santos *et al.* (2012) analizaron 991 proteínas que presentan un dominio LuxR en un total de 53 genomas de especies de actinobacterias y determinaron que un 59% de las proteínas presentaban un dominio adicional. Por ello, la familia de reguladores LuxR en actinobacterias se puede clasificar en dos grandes subfamilias: una que

se parece a los reguladores transcripcionales clásicos de las Gram negativas, los cuales presentan un único dominio LuxR y probablemente constituyen reguladores transcripcionales de un componente, y otra subfamilia que engloba a las proteínas con un dominio LuxR en el extremo C-terminal y un dominio receptor (REC, del inglés “receiver domain”) en el extremo N-terminal, que probablemente actúa como en los reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes típico de bacterias Gram positivas. Un tercer grupo minoritario está formado por proteínas que presentan un dominio LuxR junto con algún dominio de transducción de señal, distinto de REC, dando lugar a proteínas multidominio que pueden formar parte de sistemas de dos componentes relacionados con el QS, aunque no se descartan funciones adicionales o complementarias (Santos *et al.*, 2012).

Esta diversidad estructural también se refleja en las especies de *Streptomyces* analizadas: *S. avermitilis* presenta 32 proteínas con un dominio LuxR asociado a un dominio REC y 18 proteínas con un dominio LuxR “solo”; *S. coelicolor* presenta 45 proteínas con un dominio LuxR asociado a un dominio REC, 24 proteínas con un dominio LuxR solo y 2 proteínas con dominio LuxR asociado a un dominio AAA (del inglés “ATPases associated with diverse cellular activities”); y *S. griseus* subsp. *griseus* presenta 36 proteínas con un dominio LuxR asociado a un dominio REC, 11 proteínas con un dominio LuxR solo y una proteína con un dominio LuxR asociado a un dominio TPR (del inglés “tetratricopeptide repeat domain”) (Santos *et al.*, 2012).

❖ Subfamilia de reguladores LAL

En los últimos años, la subfamilia de reguladores LAL (del inglés “large ATP-binding regulators of the LuxR family) ha cobrado gran importancia en el género *Streptomyces* por su implicación en la regulación de diversos metabolitos secundarios, actuando en la mayoría de los casos como reguladores específicos de ruta. Los reguladores LAL están englobados dentro de la familia de reguladores LuxR, y como todos los miembros de esta familia presentan un dominio tipo LuxR, caracterizado por un dominio HTH en el extremo C-terminal. Sin embargo, son los dominios presentes en el extremo N-terminal los que permiten establecer la subfamilia LAL; estos reguladores se caracterizan por presentar un dominio de unión ATP/GTP en su extremo N-terminal, identificable por la presencia de los motivos conservados Walker A y B (Walker *et al.*, 1982), y un tamaño inusualmente grande (aproximadamente 1000 aa) (De Schrijver y De Mot, 1999).

La subfamilia de reguladores LAL ha sido tipificada por el regulador del regulón de la maltosa de *E. coli* MalT, implicado en la captación y catabolismo de maltodextrinas (Débarbouillé *et al.*, 1978). MalT modula los genes del operón *mal*, actuando como regulador

transcripcional positivo junto con los inductores maltotriosa y ATP (Raibaud y Richet, 1987). Respecto al género *Streptomyces*, en la última década han sido identificadas más de tres decenas de proteínas reguladoras de la subfamilia LAL relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Lista de proteínas reguladoras de la familia LAL identificadas en bibliografía y bases de datos implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios producidos por especies del género *Streptomyces*.

Especie	Proteína	Agrupación/Función	Referencia
<i>S. tsukubaensis</i>	FkbN*	Biosíntesis de tacrolimus	Goranovic <i>et al.</i> , 2012; Mo <i>et al.</i> , 2012
<i>S. hygroscopicus</i> NRRL 5491	RapH*	Biosíntesis de rapamicina	Kuscer <i>et al.</i> , 2007
<i>S. natalensis</i>	PimR*	Biosíntesis de pimaricina	Antón <i>et al.</i> , 2004
<i>S. avermitilis</i>	AveR*	Biosíntesis de avermectina	Guo <i>et al.</i> , 2010; Kitani <i>et al.</i> , 2009
<i>S. lydicus</i>	SlgR2, SlgY*	Biosíntesis estreptolidigina	Gomez <i>et al.</i> , 2012; Olano <i>et al.</i> , 2009
<i>S. hygroscopicus</i> 17997	GdmRI, GdmRII*	Biosíntesis de geldanamicina	He <i>et al.</i> , 2008; Kim <i>et al.</i> , 2010
<i>S. noursei</i>	NysRI, NysRII, NysRIII*	Biosíntesis de nistatina	Sekurova <i>et al.</i> , 2004
<i>S. ambofaciens</i>	SAMR0484*	Biosíntesis estambomicina	Laureti <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO1666	TrdH*	Biosíntesis tirandamicina	Mo <i>et al.</i> , 2011
<i>S. coelicolor</i>	SCO0877, SCO7173*	Biosíntesis de actinorrodina. Modulador sistema de dos componentes PhoR-PhoP.	Guerra <i>et al.</i> , 2012
<i>S. venezuelae</i>	PikD*	Biosíntesis de picromicina	Wilson <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces</i> sp. CK4412	TmcN*	Biosíntesis de tautomisetina	Hur <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces</i> sp. CS40	ClmR2*	Colismicina A	Vior <i>et al.</i> , 2014
<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>ascomyceticus</i>	FkbN	Biosíntesis de FK520	Wu <i>et al.</i> , 2000
<i>S. hygroscopicus</i>	Orf6	Agrupación PKS tipo I	Yadav <i>et al.</i> , 2003
<i>S. aizunensis</i>	Orf30	Biosíntesis de ECO-02301	McAlpine <i>et al.</i> , 2005
<i>S. hygroscopicus</i> AM 3672	HbmRII, HbmRI	Biosíntesis de herbimicina	Rascher <i>et al.</i> , 2005
<i>S. avermitilis</i>	OlmRII, OlmRI	Biosíntesis de oligomicina	Guo <i>et al.</i> , 2010
<i>S. albus</i>	SalRI, SalRII	Biosíntesis de salinomicina	Knirschová <i>et al.</i> , 2007
<i>S. nanchangensis</i>	MeiR	Biosíntesis de meilingmicina	Sun <i>et al.</i> , 2003
<i>S. cinnamomensis</i>	MonH	Biosíntesis de monensina	Oliynyk <i>et al.</i> , 2003
<i>S. neyagawaensis</i>	Orf3	Biosíntesis concanamicina	Haydock <i>et al.</i> , 2005
<i>S. nodosus</i>	AmphRI, AmphRII	Biosíntesis anfotericina	Cardomy <i>et al.</i> , 2004
<i>S. carzinostaticus</i>	Orf2	Biosíntesis de neocarilina	Otsuka <i>et al.</i> , 2004
<i>S. platensis</i> Mer-11107	PldR	Biosíntesis pladienolido	Machida <i>et al.</i> , 2008
<i>S. griseus</i>	Sgr6177	Agrupación PKS tipo I	Ohnishi <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces</i> sp.	BecH	Biosíntesis de BE-14106	Jorgensen <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces</i> sp. 307-9	TamH	Biosíntesis de tirandamicina	Carlson <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	FscRII, FscRIII, FscRIV	FR-008/candicidina	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces</i> sp. MP39-85	MlaH	Biosíntesis de ML-449	Jorgensen <i>et al.</i> , 2010
<i>S. antibioticus</i>	IdmG	Biosíntesis de indanomicina	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>S. lasaliensis</i>	Lsd8	Biosíntesis de lasalocida	Migita <i>et al.</i> , 2009

* Reguladores LAL que han sido caracterizados experimentalmente.

Cabe destacar que todos los reguladores LAL caracterizados hasta el momento actúan como reguladores positivos de la biosíntesis del metabolito secundario que modulan. Como casos especiales están los reguladores SCO0877 y SCO7173 de *S. coelicolor*, que aunque afectan positivamente a la síntesis de actinorrodina también ejercen una regulación negativa sobre los genes *phoR-phoP*, que median la respuesta frente a la escasez de fosfato (Guerra *et al.*, 2012). Otro caso particular lo representa el regulador específico de ruta AveR de *S. avermitilis*, el cual regula positivamente la producción de avermectina y simultáneamente afecta negativamente a la biosíntesis de oligomicina, constituyendo un claro ejemplo de la complejidad y versatilidad del mecanismo regulador del metabolismo secundario de *Streptomyces*, donde a diferencia de lo que se creía inicialmente, un regulador específico de ruta puede actuar sobre otras agrupaciones (Guo *et al.*, 2010).

En los últimos años, la disponibilidad de la secuencia de genomas completos ha permitido identificar reguladores LAL en agrupaciones génicas crípticas cuyos productos metabólicos permanecen desconocidos. La expresión constitutiva de estos reguladores específicos de ruta constituye una estrategia eficaz para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales de interés industrial. Esta estrategia ha sido empleada para obtener el metabolito críptico estambomicina en *Streptomyces ambofaciens*, compuesto con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares cancerígenas humanas (Laureti *et al.*, 2011).

1.3.2.2.3. Familia de reguladores TetR

La familia de reguladores transcripcionales TetR (TFRs, del inglés “TetR family transcriptional regulators”) constituye uno de los grupos más grandes de factores transcripcionales de un componente, estando ampliamente distribuido entre bacterias y arqueas (Ramos *et al.*, 2005).

Los TFRs presentan un dominio conservado de unión a ADN tipo HTH en el extremo N-terminal (Ramos *et al.*, 2005). Sin embargo, los dominios presentes en el extremo C-terminal, los cuales interaccionan en la mayoría de los casos con ligandos, son altamente variables, lo que sugiere que esta familia de reguladores puede responder a un amplio rango de estímulos.

La mayoría de los TFRs regulan genes que codifican bombas de expulsión que confieren resistencia a antibióticos. Entre ellos están TetR, presente en el transposón Tn10 que exporta tetraciclina (Hillen y Berens, 1994); ActR en *S. coelicolor*, que confiere resistencia a actinorrodina (Tahlan *et al.*, 2007); AcrR en *Escherichia coli* (Mo *et al.*, 1996) y NfxB en *Pseudomonas aeruginosa*, que confieren resistencia a varios antibióticos, entre otros (Poole *et*

al., 1996). Sin embargo, los TFRs también están implicados en la regulación de otros procesos fisiológicos, incluyendo la biosíntesis de antibióticos (Uguru *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2013), la producción de toxinas (MacEachran *et al.*, 2008), el quorum-sensing y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Krug *et al.*, 2005).

TetR, la proteína modelo de esta familia, es el represor de *tetA*, que codifica una bomba de expulsión de tetraciclina. El gen *tetR* presenta orientación divergente al gen *tetA*, y la región intergénica contiene dos secuencias operadoras palindrómicas de 15 pb, a las que se une un dímero TetR reprimiendo la transcripción de ambos genes. La unión de la tetraciclina a TetR, provoca la liberación del regulador, activándose la expresión de *tetA*, confiriendo así resistencia (McMurry *et al.*, 1980; Meier *et al.*, 1988).

Al igual que TetR, la mayoría de las proteínas pertenecientes a familia de reguladores transcripcionales TetR actúan como represores de la transcripción, aunque también ha sido descrito un pequeño número de activadores (Christen *et al.*, 2006; Hirano *et al.*, 2008; Uguru *et al.*, 2005) y alguna proteína con actividad dual represor/activador (Pompeani *et al.*, 2008).

1.3.2.2.4. Familia de reguladores LysR

La familia de reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR, del inglés “LysR-type transcriptional regulator family”) está presente de manera ubicua en bacterias, aunque también han sido identificados ortólogos funcionales en arqueas y eucariotas (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2001; Sun y Klein, 2004). La familia de LTTR está tipificada por el regulador LysR de *E. coli*, que actúa como activador transcripcional del gen *lysA*, el cual codifica una diaminopimelato descarboxilasa, enzima que cataliza la descarboxilación de diaminopimelato liberando lisina. El gen *lysR* se transcribe cuando la proteína LysR se disocia de su propio promotor, y una vez transcrito, LysR se une a la región promotora del gen *lysA*, activando su transcripción (Stragier *et al.*, 1983).

La familia LTTR constituye la mayor familia de proteínas de unión a ADN en procariontes. A pesar de su gran tamaño y de la gran diversidad de los genes que regulan, los miembros de esta familia presentan un dominio HTH de unión a ADN altamente conservado en el extremo N-terminal. De manera opuesta, el dominio de unión de moléculas cofactoras del extremo C-terminal presenta un bajo grado de conservación de secuencia (Maddocks y Oyston, 2008). Aunque inicialmente los reguladores de la familia LysR fueron descritos como activadores transcripcionales, han sido caracterizados tanto represores como reguladores duales activadores/represores (Maddocks y Oyston, 2008). Un ejemplo de regulador dual es el factor transcripcional ClaR de *S. clavuligerus*, el cual tiene un efecto

positivo sobre la síntesis de ácido clavulánico y un efecto negativo sobre la biosíntesis de cefamicina C (Pérez-Redondo *et al.*, 1998).

1.4. Objetivos

Dada la importancia industrial y terapéutica del inmunosupresor tacrolimus, y debido a que al inicio de este trabajo no se disponía de la secuencia de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus al completo junto con el escaso conocimiento existente acerca de los mecanismos que regulan la producción del inmunosupresor, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Secuenciación y análisis bioinformático de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus en *Streptomyces tacrolimicus*.
2. Secuenciación y análisis bioinformático de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis*.
3. Construcción de mutantes de *S. tacrolimicus* con los genes reguladores delecionados y/o sobreexpresados.
4. Análisis funcional de los mutantes obtenidos en los posibles genes reguladores de ruta de la biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.
5. Análisis transcripcional mediante qRT-PCR en las cepas mutadas en los genes reguladores de la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Microorganismos utilizados

2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983). Cepa utilizada habitualmente en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico, debido a la alta eficiencia de transformación de sus células competentes (hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN plasmídico) y su baja tasa de recombinación. Posee una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac*, lo que permite seleccionar aquellos transformantes portadores de cualquier plásmido capaz de realizar la α -complementación de dicha mutación, como pBluescript® (Stratagene) o pUC19 (New England Biolabs), por ejemplo.

Genotipo: F^- , *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*rk-mk+*), *supE44*, *relA1*, λ^- , ($\phi 80\text{d lacZ}\Delta\text{M15}$), $\Delta(\text{lacZYA-argF})$, U169.

E. coli BW25113/pIJ790 (Datsenko y Wanner, 2000). Cepa utilizada en la tecnología REDIRECT®. El plásmido pIJ790 contiene la función λ RED (*gam*, *bet*, *exo*), la cual incrementa la tasa de recombinación utilizando ADN lineal; el gen de resistencia a cloranfenicol, que permite la selección de cepas transformadas con derivados del SuperCos 1 (contiene los genes de resistencia a apramicina y a kanamicina); y un origen de replicación sensible a la temperatura (requiere 30 °C para la replicación).

Genotipo: *lacI^q*, *rrnB_{T14}*, $\Delta\text{lacZ}_{\text{WJ16}}$, *hsdR514*, $\Delta\text{araBAD}_{\text{AH33}}$, $\Delta\text{rhaBAD}_{\text{LD78}}$.

E. coli ET12567/pUZ8002 (MacNeil *et al.*, 1992). Cepa donadora en el proceso de conjugación con especies del género *Streptomyces*. Carece de un sistema de metilación funcional (*dam-*, *dcm-*, *hsd*) por lo que el material genético que se transfiere no es metilado y por lo tanto no es degradado por el potente sistema de restricción sensible a la metilación de algunas especies de *Streptomyces*. El plásmido no movilizable pUZ8002 (Sia *et al.*, 1996; Paget *et al.*, 1999) contiene las funciones necesarias para que se produzca la transferencia de vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*. Se cultiva en presencia de cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para mantener la mutación *dam-* y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para mantener el plásmido pUZ8002.

Genotipo: *dam-13:Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdR*, *recF143*, *zjj201:Tn10*, *galK2*, *galT22*, *ara14*, *lacY1*, *xy15*, *leuB6*, *thi1*, *tonA31*, *rpsL136*, *hisG4*, *tsx78*, *mtli glnV44*, F^- .

E. coli XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987). Cepa deficiente para la recombinación, necesaria para mantener la estabilidad de las construcciones que porta. La mutación *hsdR* evita la digestión del ADN clonado por el sistema de endonucleasas *EcoK* de *E. coli*. Cepa utilizada como hospedadora de las genotecas construidas en SuperCos 1.

Genotipo: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)].

2.1.2. Cepas pertenecientes al género *Streptomyces*

Streptomyces tacrolimicus [antiguamente *Streptomyces* sp. ATCC 55098^T (MA 6858)] (Martínez-Castro *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 1992). Cepa tipo de la especie *S. tacrolimicus* aislada por la compañía farmacéutica Merck & Co., Inc. (EEUU) descrita como productora del inmunosupresor tacrolimus. Procedente de la colección americana de cultivos tipo ATCC.

Streptomyces tsukubaensis 9993 (NRRL 18488) (Kino *et al.*, 1987). Cepa silvestre aislada por la compañía Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD. (Japón). Fue la primera especie de *Streptomyces* definida como productora de tacrolimus. Además, también produce un compuesto de estructura y función similar conocido como ascomicina. Dicha especie ha sido obtenida de la colección americana de cultivos tipo ARS o NRRL.

2.1.3. Otros microorganismos

Saccharomyces cerevisiae TB23 (Arndt *et al.*, 1999; Breuder *et al.*, 1994). Cepa de *S. cerevisiae* sensible a tacrolimus (FK506) y ciclosporina (CsA) utilizada en la detección de tacrolimus mediante el método de bioensayo. Dicha cepa fue cedida por el Dr. J. Heitman del Departamento de Genética, Farmacología y Biología del Cáncer del Centro Médico Universitario Duke de Durham (EEUU).

Genotipo: *MATα p^o, ilv5, ura3, feu2, hisG* (CsA^S FK506^S).

Candida utilis CECT 1061. Cepa empleada para la detección de la actividad antifúngica mediante bioensayo de los compuestos extraídos con acetato de etilo tras la fermentación.

2.1.4. Crecimiento y conservación de los microorganismos

✱ Crecimiento

Crecimiento de *E. coli*. El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo en medio LA a 37°C. Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio LB, a 37 °C, en matraces lisos y con agitación orbital a 250 rpm.

Crecimiento de *Streptomyces* spp. El crecimiento rápido en medio sólido se realizó en TSA mientras que los cultivos para la recolección de esporas se realizaron en TBO a 28 °C. El crecimiento de *Streptomyces* en medio líquido se llevó a cabo en YEME a 30 °C o BASAm a 28°C y con agitación orbital a 220 rpm, empleándose en todos los casos matraces indentados, con el fin de mejorar la oxigenación del cultivo. La fermentación en medio sólido se realizó en medio FKAm.

Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* TB23. El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo en medio YPD a 37°C. Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio YPD, a 37 °C, en matraces lisos y con agitación orbital a 250 rpm.

Crecimiento de *C. utilis*. El crecimiento se llevó a cabo a 30 °C en medio líquido YED.

* **Conservación**

Conservación de *E. coli*. La preservación de las cepas se llevó a cabo mediante congelación en glicerol al 20% (v/v), a -20 °C o a -80 °C.

Conservación de *Streptomyces spp.* La conservación a medio plazo se realizó en placas de medio sólido, protegidas con Parafilm®. La conservación durante largos periodos de tiempo se hizo mediante congelación de las esporas en glicerol al 20 % (v/v) a -80 %.

* **Protocolo:**

- Sembrar esporas o micelio en placas de TBO e incubar a 28 °C durante 10-15 días.
- Verter sobre el cultivo 3 ml de glicerol (20 %) y raspar la superficie con un bastoncillo de algodón estéril, de manera que las esporas se desprendan.
- Recoger la solución de esporas y repetir el proceso hasta que se hayan recolectado la mayor parte de las esporas.
- Agitar la solución de esporas vigorosamente (*vortex*) y filtrar a través de una punta de micropipeta de 5 ml obturada con un poco de algodón hidrófilo estéril.
- Centrifugar la solución a 4 °C, durante 10 minutos a 3500 g y retirar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de esporas en glicerol al 20 %. Conservar a -80 °C.

Conservación de *S. cerevisiae*. La conservación de esta cepa se realizó mediante siembra periódica en placas en medio sólido YPD, las cuales se mantuvieron a 4 °C.

Conservación de *C. utilis*. La preservación de esta cepa se realizó en forma de cultivo crecido almacenado a 4 °C.

2.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo se esterilizaron en autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. La esterilización de soluciones por filtración se llevó a cabo mediante filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). Para la obtención de los medios sólidos, salvo que se indique lo contrario, se añadió un 2 % (p/v) de agar a la composición particular de cada medio. A continuación se detallan las cantidades necesarias para la preparación de un litro de medio. Todos los medios se prepararon en agua destilada.

2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972). Medio utilizado tanto sólido como líquido para el cultivo de *E. coli*.

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Ajustar el pH a 7,3 con NaOH 1 N.

SOB (Hanahan, 1983) y **SOC**. Medios líquidos utilizados para la obtención de células competentes de alta eficiencia de *E. coli*. Composición medio SOB:

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g

Tras disolver estos componentes, añadir 10 ml de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7,0 con KOH 5 M y añadir agua destilada hasta 1 litro. Después de esterilizar, añadir 5 ml de MgCl₂ 2 M esterilizado por filtración. Al añadir a dicho medio glucosa al 50 % (88 ml) se denomina medio SOC.

2.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces* spp.

TSB (Sambrook y Russell, 2001). Medio utilizado tanto sólido como líquido para el crecimiento rápido de cepas de *Streptomyces*.

Peptona de caseína	17 g
NaCl	5 g
Peptona de soja	3 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g

Ajustar el pH a 7,3. Para su utilización como medio sólido (**TSA**) añadir 20 g/l de agar.

TBO (Higgins *et al.*, 1974). Medio sólido utilizado para la esporulación de *S. tacrolimicus*.

Pasta de tomate	20 g
Copos de avena	20 g
Agar	2,5 g

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N.

MS (Hobbs *et al.*, 1989). Medio sólido utilizado para la conjugación intergenérica de *Streptomyces* con células de *E. coli*.

Manitol	20 g
Harina de soja	20 g
Agar	20 g

ISP4 (Difco™) (Shirling y Gottlieb, 1966). Medio sólido comercial utilizado para la esporulación de *S. tsukubaensis*.

Almidón soluble	10 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Agar	20 g
Elementos traza:	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg

El medio viene preparado de manera que solo es necesaria la disolución de 37 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de 7,2 ±0,2.

FKAm. Medio FKA (Dumont *et al.*, 1992) modificado (Martínez-Castro, 2011) utilizado para las fermentaciones de *S. tacrolimicus*.

Almidón (Difco)	45 g
Líquido de maceración del maíz (Sigma)	10 g
Levadura seca (Sensient)	10 g
MOPS	10 g
CaCO ₃	1 g

YEME (Chater *et al.*, 1992). Medio empleado para el crecimiento rutinario de *Streptomyces* en medio líquido.

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Glicina	5 g
MgCl ₂	0,5 g

2xTY (Sambrook y Russell, 2001). Medio utilizado para la conjugación de *S. tacrolimicus* con *E. coli*, para la germinación de las esporas de *Streptomyces* mediante choque térmico.

Triptona	1,6 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	85 mM

Ajustar el pH a 7,2 con NaOH 1 N.

BASAm. Medio BASA (Dumont *et al.*, 1992) modificado (Martínez-Castro, 2011) utilizado para el crecimiento rápido de *Streptomyces*, y también para el preinóculo de alguno de los medios de producción de tacrolimus.

Extracto de levadura	20 g
Mezcla de peptonas*	20 g
KNO ₃	2 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Elementos traza:	
MnSO ₄ · H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	20 mg

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 1 N.

Tras autoclavar añadir al medio las siguientes soluciones esterilizadas por filtración: 40 ml de glucosa al 50 % p/v y 1 ml FeSO₄ · 7H₂O al 2,5 % p/v.

*Composición de mezcla de peptonas: 25 % extracto de caldo de carne, 25 % extracto de levadura, 25 % peptona de carne, 12,5 % peptona de caseína, 12,5 % NaCl.

2.2.3. Otros medios de cultivo

YPD (Lodder, 1970). Medio utilizado para el crecimiento de *S. cerevisiae* TB23, tanto líquido como sólido.

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	10 g
Peptona bacteriana	20 g

YED (Gil *et al.*, 1985). Empleado para el crecimiento de *C. utilis*. Su formulación sólida se empleó en los bioensayos para detectar la actividad antifúngica de los compuestos extraídos con acetato de etilo a partir de cultivos de *S. tacrolimicus*.

Extracto de levadura	10g
Glucosa	10g

El pH se ajusta a 7,0 con NaOH.

2.2.4. Aditivos empleados en los medios de cultivo

En ocasiones, fue necesario añadir antibióticos y otros compuestos a los medios de cultivos. Los aditivos fueron utilizados siguiendo las instrucciones de Sambrook y Russell (2001).

Las soluciones concentradas (“stocks”) disueltas en agua se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos disueltos en solventes orgánicos no necesitan ser esterilizados. Todas estas disoluciones se conservaron a -20°C . En la Tabla 2.1 se detalla la concentración utilizada según el microorganismo y el tipo de medio.

Tabla 2.1. Concentración de las soluciones de aditivos utilizados para la selección de transformantes y concentración final de uso tanto en medio sólido como en líquido.

Aditivo	Concentración inicial	Concentración final	
		<i>Streptomyces</i> sp.	<i>E. coli</i>
Ácido nalidíxico (Nal)	25 mg/ml en NaOH 1N	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-
Ampicilina (Amp)	200 mg/ml en agua destilada	-	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Apramicina (Apr)	100 mg/ml en agua destilada	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Cloranfenicol (Cm)	50 mg/ml en etanol absoluto	-	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Kanamicina (Kn)	100 mg/ml en agua destilada	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tioestreptona (Tio)	50 mg/ml en DMSO (dimetilsulfóxido)	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-
IPTG (1-isopropil- β -D-galactopiranosido)	100 mM en agua destilada	-	0,05 mM
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)	20 mg/ml en dimetilformamida	-	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.3. Vectores plasmídicos

2.3.1. Plásmidos de *E. coli*

pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Es un plásmido multicopia derivado del plásmido pBR322 y con el origen de replicación *colE1* de *E. coli*. Con un tamaño de 2.686 pb, este plásmido contiene dos marcadores de selección: un gen de resistencia a ampicilina (Amp^{R}) llamado *bla* y una parte del gen *lacZ* que codifica el fragmento amino terminal (146 aminoácidos) de la β -galactosidasa, lo que posibilita la complementación de la deleción *lacZ* Δ M15 presente en las cepas de *E. coli* que se transforman de manera habitual con este plásmido, como *E. coli* DH5 α . De este modo, las células de *E. coli* que contengan el plásmido, en presencia de IPTG (ya que *lacZ* se expresa bajo control de un promotor inducible por IPTG) serán capaces de metabolizar el X-Gal (un análogo del sustrato natural de la β -

galactosidasa, la lactosa), dando lugar a un compuesto azul que teñirá las colonias. El sitio de clonación múltiple (MCS) existente en el plásmido contienen 11 sitios únicos de restricción y está situado al inicio del gen *lacZ*, de tal modo que la clonación de un fragmento de ADN provoca la interrupción del gen *lacZ* imposibilitando la complementación y provocando que la colonia sea de color blanco. Este vector se empleó de manera sistemática para la clonación de fragmentos de ADN.

pBluescript® KS (Agilent Technologies Genomics). Fagémido comercial (plásmido con origen de replicación del fago f1) derivado del plásmido pUC19. Incluye en su secuencia un gen de resistencia a ampicilina y permite la selección por color. Presenta un policonector con 21 sitios únicos para enzimas de restricción. En la orientación KS, el sitio de restricción *KpnI* es el más cercano al promotor de *lacZ*. Contiene 454 pb de la región intergénica del fago f1 que incluye el origen de replicación.

pGEM-T Easy (Promega): Vector comercial de 3 kb para la clonación de productos de PCR. Este vector se suministra digerido con *EcoRV* y con una timina en cada extremo 3', de tal forma que los productos de PCR generados con determinadas ADN polimerasas, que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, tienen una elevada compatibilidad para ligar con el vector. Presenta también el origen de replicación *colE1* y un gen de resistencia a ampicilina. Contiene los promotores de la ARN polimerasa SP6 y T7 flanqueando el MCS dentro de la región codificante de la enzima β galactosidasa, lo que permite la selección por color.

SuperCos 1 (Agilent Technologies Genomics): Cósmido (7,9 kb) (Evans *et al.*, 1989) que se caracteriza por contener: a) secuencias promotoras de los bacteriófagos T3 y T7 flanqueando un sitio único de clonación (*Bam*HI); b) sitios *cos* que permiten la inserción de fragmentos de ADN de un tamaño determinado (30-42 kb); c) sitios únicos de restricción *NotI*, *SacII* y *SfiI* flanqueando el sitio de clonación que permiten extraer el ADN inserto y d) genes que permiten la amplificación y expresión de los cósmidos recombinantes en células eucariotas. Presenta el origen de replicación en *E. coli colE1* y genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina.

pIJ773. Vector de 4,3 kb derivado del pBluescript que contiene el casete *aac(3)IV-oriT* (gen de resistencia a apramicina y el origen de transferencia *oriT*) que sustituye al gen de interés cuando se lleva a cabo la delección mediante REDIRECT® (Gust *et al.*, 2002).

2.3.2. Plásmidos de *Streptomyces* spp.

pAMB1 (Botas, 2013). Vector (7,8 kb) replicativo conjugativo derivado de pIJ699 (Kieser y Melton, 1988) y de pIJ773. Este vector está constituido por un fragmento de 3,5 kb procedente de pIJ699 que contiene un terminador, genes de replicación (*rep*) y el origen de replicación en *Streptomyces* pIJ101. Contiene también el plásmido completo pIJ773 que incorpora el origen de transferencia *oriT* para su transferencia por conjugación, además de los genes de resistencia a apramicina y a ampicilina, así como el origen de replicación *colE1* para *E. coli*.

2.4. Productos de biología molecular

2.4.1. Enzimas

Las enzimas de restricción mencionadas en esta memoria fueron suministradas por las casas comerciales New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara. Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Roche); ADN polimerasa del fago T4 (Fermentas); ligasa del fago T4 (Roche), fosfatasa (*Antarctic Phosphatase*-BioLabs); lisozima (Fluka Chemical & Biochemical Co); *Taq* ADN polimerasa (Takara), Go Taq™ ADN polimerasa (Promega); Phusion® ADN polimerasa de alta fidelidad (New England Biolabs), DNasa I (*Lyophilized bovine pancreas DNase*-Roche grade I).

2.4.2. Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular para ADN utilizados (Figura 2.1) así como las casas comerciales en las que se adquirieron han sido:

1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), marcador comercial que presenta bandas desde 1,5 kb a 100 pb. Este marcador se diluye en TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) a una concentración final de 50 ng/μl. Se utilizan 5 μl por gel.

DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche), marcador comercial marcado con digoxigenina que presenta bandas desde 23 kb a 125 pb (ADN del fago λ digerido con *HindIII*). Se utilizan 10 μl por gel.

ADN del fago λ digerido con *HindIII*, presenta bandas desde 23 kb a 125 pb. Se utilizan 10 μl por gel.

ADN del fago λ digerido con *PstI*, presenta bandas desde 11,5 kb a 247 pb. Se utilizan 10 μl por gel.

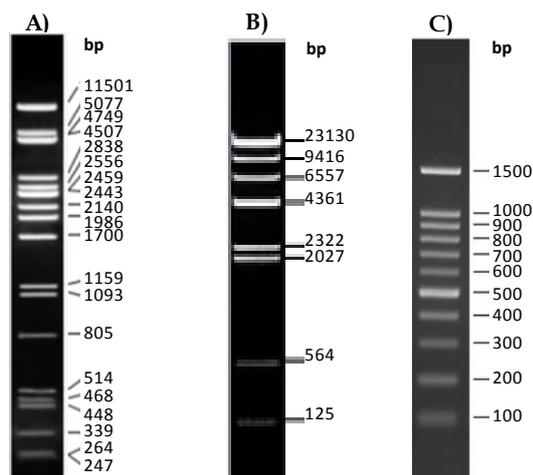


Figura 2.1. Esquema de los patrones de peso molecular de ADN en geles de agarosa. Se indica el tamaño de los fragmentos en pares de bases. **A)** ADN del fago λ digerido con *Pst*I; **B)** ADN del fago λ digerido con *Hind*III; **C)** *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

2.4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich® e IDT (Integrated DNA Technologies) o a Bonsai Technologies en el caso de cebadores necesarios para la tecnología REDIRECT®.

Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para enzimas de restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el catálogo comercial de New England Biolabs Inc. En el Anexo I se detalla la secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

2.4.4. Conjunto de reactivos comerciales

Para el desarrollo de varios experimentos se utilizaron kits comerciales:

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare): Recuperación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa y purificación de ADN de soluciones.

QIAEX® II Gel Extraction Kit (Qiagen): Recuperación de bandas de gran tamaño (a partir de 5 kb) de ADN a partir de geles de agarosa.

Ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare): Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen): Obtención de ADN plasmídico de gran tamaño de *E. coli*.

Big Dye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems): Sistema de secuenciación mediante PCR.

DIG-High Prime DNA Labeling Kit (Roche Applied Science): Kit utilizado para el marcaje de las sondas utilizadas en experimentos de *Southern blot*.

RNeasy® mini (Qiagen). Columnas utilizadas para la extracción de ARN de *Streptomyces* a partir de cultivos en medio sólido.

2.5. Extracción de ADN

2.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

2.5.1.1. Extracción a gran escala: Lisis alcalina

Este procedimiento se utilizó para obtener ADN plasmídico a gran escala. El método fue inicialmente descrito por Birnboim y Doly (1979).

*** Protocolo:**

- Inocular una colonia aislada en 50 ml de medio TB suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Cultivar durante 14-16 horas a 37°C y 250 rpm.
- Recoger las células por centrifugación en tubos Falcon durante 15 minutos a 3500 g y 4°C y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 7,5 ml de TEG. Añadir lisozima a una concentración de 10 mg/ml. Incubar 5 minutos a T^a ambiente.
- Añadir 15 ml de solución NaOH-SDS fresca. Incubar 10 minutos en hielo, mezclando por inversión suavemente cada 2 minutos. La mezcla debe ir adquiriendo un aspecto cada vez más mucoso.
- Añadir 11,25 ml de solución de acetato potásico frío y agitar vigorosamente. Mantener 10 minutos en hielo.
- Centrifugar durante 15 minutos a 3500 g y 4 °C. Filtrar el sobrenadante a través de un algodón hidrófilo y transferir a un tubo nuevo.
- Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión y dejar precipitar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 minutos a 3500 g. Descartar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70 % y transferir la muestra a un tubo de 2 ml. Centrifugar 10 minutos a 16000 g, descartar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol.
- Resuspender en 2 ml de agua mQ. Añadir 8 µl de RNasa (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C.
- Extraer con fenol neutro, fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato sódico (AcNa) 3 M durante un mínimo de 2 horas a -20 °C.
- Centrifugar a 16000 g y 4 °C durante 30 minutos, y lavar con etanol al 70 %. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 500 µl de agua mQ.

*** Soluciones:**

- **Solución TEG:** Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM; pH 8,0; glucosa 50 mM.
- **Solución NaOH-SDS:** NaOH 0,2 N; SDS (docedil sulfato sódico) 1 %. Esta solución se prepara justo antes de usar.
- **Solución acetato potásico:** 60 % acetato potásico 5 M (autoclavado); 11,5 % ácido acético glacial y 28,5 % agua. Conservar a 4 °C.
- **RNasa:** resuspender en agua a una concentración final de 10 mg/ml. Hervir 10 minutos para eliminar actividad DNasa.
- **Fenol neutro:** Se mezclan por agitación fuerte 3 vol. de fenol ácido con 1 vol. de Tris-HCl 1 M pH 8 y 8-hidroxiquinoleína (50 mg por cada 100 ml de fenol ácido). Se deja reposar hasta que se separan las dos fases, se elimina la fase acuosa y se guarda a 4 °C.
- **CIA:** Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v:v).
- **Fenol-CIA:** Fenol neutro:CIA (1:1, v:v).

2.5.1.2. Extracción a pequeña escala: Minipreparaciones (minipreps)

El método empleado fue básicamente el descrito por Holmes y Quigley (1981) y fue utilizado para obtener ADN plasmídico de *E. coli* de forma rápida. Con este método se obtienen cantidades de ADN suficientes para el análisis de plásmidos recombinantes aislados de transformantes de *E. coli*.

* Protocolo:

- Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio TB suplementado con el/los antibióticos necesario/s para el mantenimiento del plásmido. Incubar durante 12-16 horas.
- Precipitar las células mediante centrifugación a 16000 g durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante.
- Añadir 350 µl de STET y 10 de lisozima (50 mg/ml) a cada tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
- Hervir las muestras 45 segundos y centrifugar inmediatamente, 10 minutos a 16000 g.
- Retirar el precipitado de restos celulares con un palillo estéril.
- Añadir 600 µl de isopropanol y 45 µl de AcNa 3 M. Mezclar por inversión e incubar 5 minutos a Tª ambiente.
- Centrifugar a temperatura ambiente 15 minutos a 16000 g, eliminar el sobrenadante y lavar con etanol 70 %.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30 µl de agua mQ.

* Soluciones:

- STET: sacarosa 8 %; Triton X-100 0,5 %; EDTA 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 8,0.

2.5.2. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces*

El método empleado para el aislamiento de ADN total de *Streptomyces* spp. fue el llamado "Método de bromuro de cetil-trimetil amonio o CTAB" (Tripathi y Rawal, 1998). El ADN genómico así obtenido se empleó como molde en reacciones de PCR y para su digestión mediante enzimas de restricción, así como para experimentos de hibridación de ácidos nucleicos.

* Protocolo:

- Inocular 50 ml de medio YEME más sacarosa 34 % con esporas de *Streptomyces*. Incubar con agitación orbital intensa (250 rpm) durante 48 horas a 30 °C.
- Recoger el micelio por centrifugación en un tubo Falcon a 3500 g durante 10 minutos y retirar el sobrenadante. Si el micelio es difícil de precipitar se puede añadir un volumen de agua destilada antes de centrifugar.
- Lavar el micelio precipitado con 25 ml de agua mQ.
- Resuspender el micelio en 10 ml de tampón TE suplementado con lisozima a una concentración de 1 µg/ml. Incubar a 37 °C durante 30 minutos. Transferir 1,7 ml de la muestra a un microtubo de 2 ml y añadir 50 µl de SDS 20 % y 50 µl de RNasa (10 mg/ml). Incubar 1 hora a 37 °C, volteando el tubo cada 10 minutos.

- ↻ Separar el contenido del microtubo en dos partes iguales y añadir por microtubo 150 µl de NaCl 5 M y 120 µl de CTAB/NaCl. Incubar 10 minutos a 65 °C.
- ↻ Extraer con fenol neutro, dos veces con fenol-CIA y CIA hasta que la interfase quede limpia.
- ↻ Precipitar el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol. Agitar suavemente hasta que el precipitado de ADN sea visible.
- ↻ Recoger el “ovillo” de ADN con la punta de una pipeta Pasteur y lavar dos veces con etanol 70 %. Después de cada lavado centrifugar 15 minutos a 16000 g y eliminar el sobrenadante. Dejar evaporar el etanol.
- ↻ Resuspender en 500 µl de agua mQ.

* Soluciones:

- ↻ **Solución CTAB/NaCl:** NaCl 0,7 M; CTAB 5 %.

2.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realizó básicamente según las descripciones realizadas por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón TAE con concentraciones entre 0,5 y 2 % (p/v) dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 2.2). Se mezclaron las muestras de ADN con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10X. Dicho tampón de carga incluía azul de bromofenol y xilencianol como colorantes, para ayudar en la carga de los pocillos y para servir de referencia de la movilidad de la muestra durante la electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas de metacrilato (Bio-Rad) y a un voltaje de entre 70 y 90 V. A continuación los geles se tiñeron mediante su inmersión en una solución de bromuro de etidio, y el resultado fue visualizado y fotografiado (sistema de video Graphic Printer UP-890 CE, Sony) durante su exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (Spectroline TR-302, a una longitud de onda de 302 nm).

El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se determinó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN.

* Soluciones:

- ↻ **TAE 50x:** 242 g de Tris base; 57,1 ml de ácido acético glacial [5,7 % (v/v)]; 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 y agua destilada hasta completar un litro.
- ↻ **Tampón de carga concentrado (10x):** azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilen-cianol 0,25 % (p/v); glicerol 40 % (v/v); EDTA 0,1 M; SDS 0,1 %; Tris-HCl 10 mM; pH 8,0. Se conserva a 4 °C o a temperatura ambiente.

Tabla 2.2. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN separados (kb)
0,5	1-20
0,7	0,8-12
1	0,5-10
1,5	0,2-3
2	0,05-2

2.6.1. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para realizar la extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa separados mediante electroforesis se utilizaron tres métodos distintos dependiendo del tamaño del fragmento a extraer. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa y su posterior centrifugación a través de algodón hidrófobo y fue usado para fragmentos de gran tamaño. También para fragmentos de gran tamaño se usó el sistema comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit*. El tercer procedimiento es el sistema comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* y se utilizó para la extracción de fragmentos de un tamaño menor de 5 kb.

2.6.1.1. Método de congelación rápido (*Freeze-squeeze*)

Esta técnica conocida como *freeze-squeeze* (Tautz y Renz, 1983) es un método rápido y sencillo con un porcentaje de recuperación de ADN del 70 %.

* Protocolo:

- ✎ Cortar la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml y congelar la banda a -20 °C durante 2 horas o a -80 °C durante 30 minutos.
- ✎ Colocar un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con una pequeña cantidad de algodón hidrófobo, sobre un microtubo intacto. Transferir la banda al microtubo agujereado y centrifugar a 16000 g durante 10 minutos.
- ✎ Recoger la fase acuosa del tubo inferior, y limpiar la solución de ADN de impurezas mediante dos extracciones: una con fenol/CIA (1:1) y otra con CIA (1:1). Recuperar la fase acuosa.
- ✎ Precipitar el ADN con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol 100% mantenido a -20 °C. Resuspender el precipitado en un volumen de agua destilada de 10 µl.

2.6.1.2. Extracción mediante QIAEX® II Gel Extraction Kit

La extracción mediante kits se basa en la solubilización de la agarosa y una adsorción selectiva del ADN en presencia de un agente caotrópico, que permite la unión de ADN de doble cadena a la matriz. De esta manera los contaminantes son eliminados mediante lavados y el ADN se eluye en un tampón de baja fuerza iónica, como agua mili-Q.

Este kit está especificado para la extracción de ADN de tamaños comprendidos entre 40 pb a 50 kb desde geles de agarosa o soluciones. Utiliza partículas de silica gel como matriz para la adsorción del ADN.

El porcentaje de recuperación depende del tamaño del ADN a extraer y está comprendido entre 60 y 95 %, consiguiéndose la mayor tasa de recuperación para ADN cuyo tamaño es próximo a 500 pb. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante.

2.6.1.3. Extracción mediante GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

Este kit utiliza una matriz (*glass fiber matrix*) colocada sobre una mini-columna para la extracción de fragmentos de ADN comprendidos entre 50 pb y 10 kb. El proceso de extracción es rápido y permite un porcentaje de recuperación del ADN en torno al 60 %-80 % en el caso de fragmentos cargados en geles de agarosa, y del 95 % de productos de PCR de solución. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante.

2.6.2. Evaluación de la concentración y análisis de pureza del ADN

La cuantificación de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una solución se realizó con el equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). El aparato estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A_{260}), teniendo en cuenta que la absorptividad específica (concentración de una sustancia que determina una unidad de absorbancia a una longitud de onda establecida) para el ADN de doble cadena (ADNdc) es de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que en el caso del ADN de cadena sencilla (ADNsc) tiene un valor de 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Además, el cociente A_{260}/A_{280} indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8; mientras que un de 2,0 se acepta como una muestra pura de ARN (Sambrook & Russell, 2001). La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente, ya que algunos de los residuos de aminoácidos que típicamente aparecen formando parte de las proteínas presentan picos de absorción a 280 nm.

Si se obtiene un valor algo menor en ambos casos es debido a la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que tienen un máximo de absorbancia cercano a 280 nm. La relación A_{260}/A_{230} ofrece otra medida de la pureza de la solución de ácidos nucleicos. Por lo

general, el valor 260/230 para una muestra pura de ADN es más alto que la relación 260/280. Dicho valor se encuentra comprendido entre 1,8 y 2,2; si la relación A_{260}/A_{230} es apreciablemente menor indica la presencia de sustancias contaminantes (ND-1000 Spectrophotometer. V3.2 *User's Manual*).

2.7. Tratamiento enzimático del ADN

2.7.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción necesarias para este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los proveedores (New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara). Cada enzima posee unas condiciones óptimas de reacción. De este modo, la temperatura de incubación, el pH, las condiciones salinas y los aditivos presentes en el tampón específico de cada enzima resultan factores determinantes para que pueda desarrollar su actividad endonucleasa de manera adecuada.

La digestión se realizó con 2 unidades de enzima por cada μg de ADN en el tampón recomendado por el fabricante y se incubó a la temperatura adecuada para cada enzima, durante un tiempo variable, generalmente de entre dos y cuatro horas.

2.7.2. Desfosforilación de los extremos 5' libres del ADN

Este tipo de tratamiento se aplica a los vectores de clonación que han sido linealizados, para prevenir su religación. Sólo es recomendable recurrir a la desfosforilación cuando se pretendan conseguir ligaciones que por algún motivo resulten problemáticas.

La fosfatasa hidroliza los extremos 5' fosfato del ADN, lo cual impide la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula.

* Protocolo:

- ↻ Incubar 15 minutos a 37°C en el caso de extremos 5' protuberantes o extremos cohesivos o 60 minutos a 37°C para la desfosforilación de extremos romos.
- ↻ Realizar dos rondas de desfosforilación entre las cuales la mezcla se incubaba a 65 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima.
- ↻ La enzima se elimina mediante extracción con fenol y CIA o bien mediante el uso de los kit de extracción de ADN.

2.7.3. Ligación de fragmentos de ADN

La ADN ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo Mg^{2+} y ATP como cofactores. Se empleó en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

La relación estequiométrica entre vector e inserto varió entre 1:3 y 1:15. En general, las ligaciones de moléculas de ADN con los extremos romos resultan más improbables y complicadas, por lo que se procuró que en esos casos existiera un mayor número de moléculas de inserto en relación al vector que en los casos de extremos cohesivos, con el fin de facilitar su incorporación.

La ligasa del fago T4 es enormemente flexible en cuanto a las temperaturas de incubación que admite su actividad. En general, para las ligaciones con extremos cohesivos se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos, y a temperatura ambiente y cuatro horas para los romos. En algunos casos concretos las incubaciones se realizaron a temperaturas más bajas (entre 4 y 16 °C) y tiempos más largos (toda la noche).

Cuando se trató de una ligación con extremos romos se empleó polietilenglicol (PEG 4000) al 5 % de concentración final, para favorecer la concentración “efectiva” de moléculas de ADN.

2.8. Método de hibridación tipo *Southern*

2.8.1. Transferencia de ácidos nucleicos

* Transferencia de ADN a filtros de nailon (*Southern*)

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* o transferencia tipo *Southern* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, separación de las cadenas del mismo y transferencia de éstas en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV. La transferencia se realizó mediante un sistema de vacío (*VacuGene XL*, GE Healthcare).

* Protocolo:

- Separar el ADN mediante electroforesis, teñir el gel y fotografiarlo con un marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.
- Cortar una membrana de nailon de 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel. Depositarla en la unidad de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Humedecer la membrana con SSC 2X y conectar el vacío.
- Colocar el gel sobre la membrana. Es importante que no queden burbujas, las cuales interferirían en la transferencia de ADN.
- Cubrir toda la superficie del gel con solución despurinizante y dejar 20-30 minutos (en este tiempo la banda de menor tamaño del tampón de carga, azul de bromofenol, debe cambiar su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo se retira la solución.
- Cubrir la superficie del gel con Solución desnaturalizante durante 20-30 minutos (la banda perteneciente al tampón de carga recupera su color azul original).

- ↻ Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante durante 30 minutos.
- ↻ Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20X durante 90 minutos.
- ↻ Retirar todo el líquido y marcar con un bolígrafo la posición de los pocillos del gel sobre la membrana antes de retirarlo.
- ↻ Colocar la membrana sobre papel de filtro y fijar el ADN a la misma mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene). Dejar secar la membrana.
- ↻ Las membranas se pueden conservar a 4 °C protegidas con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

* **Soluciones:**

- **Solución despurinizante:** HCl 0,25 M.
- **Solución desnaturalizante:** NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M.
- **Solución neutralizante:** NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,05 M; EDTA 1 mM, pH 7,2.
- **SSC 20X:** NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M; pH 7,0.

2.8.2. Marcaje de sondas para *Southern*

* **Marcaje mediante *DIG-High Prime DNA labeling random kit***

El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (*random primed*) descrito por Feinberg y Vogelstein (1983).

El método se basa en la incorporación al azar en el ADN de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-11-dUTP), gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El protocolo está ajustado (proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP) para que cada 20-25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos en el ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina.

* **Protocolo:**

- ↻ Obtener 1µg de ADN en forma lineal del fragmento a marcar en un volumen máximo de 15 µl.
- ↻ Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y transferirlo rápidamente a hielo. Añadir 2 µl de *DIG DNA labeling mix* 10X, 2 µl de *hexanucleotides mix* 10X y 1 µl de Klenow. Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- ↻ Incubar la mezcla a 37 °C al menos durante 60 minutos. Preferiblemente incubar entre 16 y 24 horas.
- ↻ Parar la reacción congelando directamente o añadiendo 2 µl de EDTA 0,25 mM (pH 8,0) y mantener a -20 °C hasta su utilización.

* Cuantificación del marcaje

Un paso importante antes de utilizar las sondas marcadas es comprobar la eficiencia de su marcaje. La cantidad de ADN marcado depende de la cantidad inicial y la pureza del ADN molde y el tiempo de incubación a 37 °C.

Para cuantificar el marcaje se realizan diluciones seriadas (1:5) de la solución de ADN marcado asumiendo que a partir de 1 µg de ADN se obtienen 780 ng de sonda marcada tras 20 horas de incubación (según el proveedor) en un volumen final de 20 µl de producto.

Dilución	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
Cantidad de ADN (pg/µl)	78	15,6	3,12	0,624	0,1248

- ↻ Aplicar 1 µl de cada dilución sobre una membrana *Hybond-NTM* (GE Healthcare).
- ↻ Fijar la sonda mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).
- ↻ Seguir los mismos pasos de los que consta la detección de ADN del protocolo del *Southern* (2.9.4.) a partir del equilibrado de membrana con Tampón I durante 1 minuto en agitación.

2.8.3. Hibridación ADN-ADN

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN y se ha marcado la sonda. En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

La prehibridación tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de prehibridación.

La hibridación en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada con digoxigenina al ADN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y la concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

Los lavados permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue: a) disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, b) aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado y c) aumentando la temperatura y la duración del lavado.

La detección permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos mediante reacción colorimétrica en las hibridaciones resueltas con NBT y BCIP, o bien mediante quimioluminiscencia en caso de hibridaciones realizadas utilizando CDP-Star.

*** Protocolo:**

- ↻ Colocar la membrana en un tubo de hibridación y añadir 25 ml de Solución de prehibridación. Incubar a 70°C durante 1-2 horas.
- ↻ Hervir la sonda previamente marcada durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir la sonda desnaturalizada a una nueva Solución de prehibridación. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces. En caso de ser así, desnaturalizar de igual manera antes de cada uso.
- ↻ Eliminar la solución de prehibridación y añadir la Solución de hibridación, dejando el conjunto a la temperatura de hibridación un mínimo de 8-10 horas. Tras el tiempo de hibridación, recuperar la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20°C.
- ↻ Lavar dos veces la membrana con solución de lavado I durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- ↻ Lavar dos veces la membrana con Solución de lavado II durante 25 minutos a 68 °C en agitación.

*** Soluciones:**

- ↻ **Solución de prehibridación:** SSC 5X; agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche) 1 %; N-lauril sarcosina 0,1 %; SDS 0,02 %.
- ↻ **Solución de hibridación:** Solución de prehibridación más la sonda marcada.
- ↻ **Solución de lavado I:** SSC 2X; SDS 0,1 %.
- ↻ **Solución de lavado II:** SSC 0,5X; SDS 0,1%.

2.8.4. Detección de ADN

Las hibridaciones tipo *Southern* siempre se realizaron con sondas de ADN bicatenario marcadas con digoxigenina. La temperatura óptima de hibridación para cada sonda se dedujo de forma experimental, en el caso de las sondas 100 % homólogas la temperatura utilizada fue de 65-70°C, siendo reducida sólo en casos de sondas con baja homología.

*** Detección mediante quimioluminiscencia**

El proceso de detección se basa en la reacción inmunológica antígeno-anticuerpo (molécula de digoxigenina y anticuerpo anti-digoxigenina, respectivamente). El anticuerpo se encuentra conjugado con la fosfatasa alcalina, que en presencia de un sustrato quimioluminiscente apropiado (CDP-Star), induce la descomposición del mismo mediante desfosforilación, generando una emisión de luz (con una λ de 466 nm), detectada en una película de rayos X. Todos los lavados se realizan en agitación a temperatura del ambiente.

*** Protocolo:**

- ↻ Equilibrar la membrana con Tampón I durante 5 minutos en agitación.
- ↻ Bloquear la membrana con Tampón II durante 30 minutos, en agitación.
- ↻ Sustituir el tampón II por la Solución de anticuerpos y dejar al menos 30 minutos en agitación.
- ↻ Eliminar la Solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con Tampón I durante 15 minutos en agitación.
- ↻ Eliminar el Tampón I y sustituirlo por Tampón III durante 5 minutos, en agitación.

- ↻ Tratar la membrana con la solución CDP-Star durante 5 minutos en oscuridad y con el lado de la membrana por el que fue transferido el ADN, hacia abajo. Guardar la solución de CDP-Star™ (varios usos).
- ↻ Secar y envolver la membrana en plástico de hibridación.
- ↻ Exponer la membrana bajo una película de autorradiografía (Hyperfilm, GE Healthcare) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo, durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.
- ↻ Revelar la película sometiéndola al siguiente tratamiento: 1-5 minutos en líquido revelador de rayos X Kodak, 1 minuto en solución de paro, y 5 minutos en líquido fijador Kodak. Lavar con agua y dejar secar la película de autorradiografía.

* **Soluciones:**

- ↻ **Tampón I:** ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,3 %; pH 7,5.
- ↻ **Tampón II:** Tampón I más 1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).
- ↻ **Tampón III:** Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 6H₂O 50 mM.
- ↻ **Solución de anticuerpos:** Diluir en una proporción 1:10.000 anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en Tampón II.
- ↻ **Solución CDP-Star:** Diluir en una proporción 1:100 CDP-Star en Tampón III.
- ↻ **Líquido revelador de rayos X:** Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:31 en agua mQ.
- ↻ **Solución de paro:** 3 % (v/v) ácido acético.
- ↻ **Líquido fijador:** Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:4 en agua mQ.

* **Detección colorimétrica**

La detección colorimétrica permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos mediante reacción colorimétrica en las hibridaciones resueltas con NBT y BCIP.

* **Protocolo:**

- ↻ Equilibrar la membrana con Tampón I durante 5 minutos en agitación.
- ↻ Bloquear la membrana con Tampón II durante 30 minutos, en agitación.
- ↻ Sustituir el tampón II por la Solución de anticuerpos y dejar al menos 30 minutos en agitación.
- ↻ Eliminar la Solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con Tampón I durante 15 minutos en agitación.
- ↻ Eliminar el Tampón I y sustituirlo por Tampón III durante 2 minutos, en agitación.
- ↻ Mezclar 45 µl de Solución NBT y 35 µl de Solución X-fosfato por cada 10 ml de Tampón III y añadir esta solución de color. Mantenerla en oscuridad hasta que aparezcan señales de hibridación (precipitado morado en el filtro).
- ↻ Retirar la solución de color y detener la reacción añadiendo agua destilada.

* **Soluciones:**

- ↻ **Tampón I:** ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,3 %; pH 7,5.
- ↻ **Tampón II:** Tampón I más 1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).
- ↻ **Tampón III:** Tris-HCl mM, pH 9,5; NaCl 100mM; MgCl₂ 6H₂O 500 mM.
- ↻ **Solución de anticuerpos:** diluir en una proporción 1:10.000 anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en Tampón II.
- ↻ **Solución NBT** (Azul de nitrotetrazolio): NBT 75 mg/ml en dimetilformamida 70 %.

🔹 **Solución X-fosfato (BCIP):** (X-fosfato = 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) 50 mg/ml en dimetilformamida.

2.9. Reacción en cadena de la ADN Polimerasa (PCR)

Esta técnica descrita inicialmente por Mullis y Faloona (1987) permite la amplificación de ácidos nucleicos. Partiendo de una molécula de ADN diana se pueden obtener entre 10^5 y 10^9 veces una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos (o cebadores) diseñados al efecto y una ADN polimerasa termoestable.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR y cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. Para la realización de este trabajo, han sido utilizadas dos enzimas de diferentes casas comerciales y un kit comercial: a) *GoTaq* (Promega), cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (p. ej.: sondas). Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega); b) *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), se utilizó cuando la fidelidad en la copia era imprescindible (p. ej.: clonación de fragmentos); c) kit *PCR Exterder System* (5Prime), se utilizó cuando el fragmento a amplificar presentaba un tamaño mayor de 3 kb y era imprescindible la fidelidad de copia.

2.9.1. Reacción de PCR

En la Tabla 2.3 se especifican, de acuerdo al catálogo *PCR applications manual* (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa, el tipo de región a amplificar, etc.

Tabla 2.3: Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 50 µl de reacción, de acuerdo al catálogo *PCR applications manual* (Roche).

ADN molde	10-50 ng ADN total/0,1-1 ng ADN plasmídico
Cebadores (18-20 pb)	0,1-1,0 Mm
ADN polimerasa	0,5-2,5 unidades
MgCl ₂	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
dNTP	50-500 µM (normalmente 200 µM)
Tampón 10X	1X
DMSO (ver nota)	7 %
Agua destilada	Hasta 50 µl

Nota: En la amplificación de fragmentos de ADN pertenecientes a *Streptomyces* (genoma con alto contenido en G+C) es necesario añadir DMSO en la mezcla de PCR. El DMSO facilita la separación de la doble cadena de ADN por lo que incrementa la eficiencia de la reacción de PCR.

Los tiempos y temperaturas empleados para llevar a cabo una reacción de PCR dependen de diversos factores, como el contenido en G+C del ADN, la secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores (que determina la temperatura de hibridación empleada), la longitud del fragmento a amplificar o la velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, entre otros. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la Tabla 2.4.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, es recomendable analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando la cantidad de amplificación, la ausencia de bandas inespecíficas, etc.

Tabla 2.4: Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

Desnaturalización inicial		5 min. a 94-98 °C	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	30 s. a 94-98 °C	30-40 ciclos
	Anillamiento	30-45 s T ^a según cebadores	
	Extensión	X s a 72 °C (depende de la polimerasa)	
Extensión final		10 min. a 72 °C	1 ciclo

2.10. Secuenciación del ADN

La secuenciación por el método de Sanger *et al.* (1977) requiere como molde ADN de cadena sencilla para que la ADN polimerasa actúe. Este molde puede conseguirse a partir de vectores del tipo fagémido o por desnaturalización de ADN bicatenario en una reacción de PCR.

El proceso de secuenciación se realizó por el método de los didesoxinucleótidos descrito por Sanger (1977). Para ello se empleó el sistema de secuenciación automática no radiactiva *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) utilizando un secuenciador *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

La síntesis de ADN complementario a un ADN de cadena sencilla a partir de un cebador la realiza la ADN polimerasa del fago T7. La síntesis se puede detener de forma aleatoria por la introducción de pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos (ddNTP), análogos a los desoxinucleótidos (dNTP) y que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Estos ddNTPs están conjugados con un fluoróforo específico para cada uno de los mismos.

En la fase de elongación, la ADN polimerasa incorpora los ddNTPs al azar en distintos puntos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños. Las reacciones son sometidas a electroforesis capilar y los fragmentos de ADN en su migración a

lo largo del mismo atraviesan un haz fijo de luz láser, lo que genera señales fluorescentes que son detectadas y almacenadas por el sistema.

Cada reacción de secuencia se realiza en un volumen de 20 μ l, manteniendo las proporciones que a continuación se reflejan:

Premix sequencing buffer (P)	2 μ l
5X Sequencing buffer (B)	2 μ l
Cebador (20 μ M)	1 μ l
ADN molde	200-500 ng
DMSO	0,7-1,4 μ l
Agua destilada	Hasta 20 μ l

Nota: El *Premix sequencing buffer (P)* contiene los ddNTPs, dNTPs y la ADN polimerasa. El *5X Sequencing buffer (B)* es el tampón de la reacción. La cantidad de ADN molde indicada es para el caso de ADN plasmídico, siendo entre 5 y 80 ng para productos de PCR, entre 25-50 ng para ADN de cadena sencilla y de 0,5 a 1 μ g para cósmidos.

*** Protocolo:**

- Realizar una reacción de PCR para cada muestra con los siguientes valores: 1 ciclo de 94 °C, 3 minutos; 25 ciclos de 96 °C 10 segundos, 50 °C 5 segundos, 60 °C 4 minutos.
- Pasar la reacción a un microtubo de 1,5 ml. Añadir 5 μ l de EDTA (125 mM, pH 8,0) y 60 μ l de etanol absoluto. Mezclar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4°C durante 20 minutos a 16000 g. Retirar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado (casi invisible) con 60-70 μ l de etanol al 70 %.
- Centrifugar 15 minutos a 16000 g y temperatura ambiente. Retirar el etanol y dejar evaporar los posibles restos.
- Conservar a -20°C hasta el momento de su análisis.
- Descongelar la muestra a temperatura ambiente durante unos minutos.
- Añadir 30 μ l de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) y mezclar con *vortex* durante 1 minuto.
- Desnaturalizar la reacción calentando a 95 °C durante 3-5 minutos.
- Mezclar nuevamente con *vortex* y centrifugar para recoger la reacción en el fondo del tubo.

2.11. Introducción de ADN en microorganismos

2.11.1. Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

A lo largo de este trabajo, la transformación mediante choque térmico fue el método empleado para la introducción en *E. coli* de las diferentes construcciones plasmídicas. Para ello, primero fue necesario obtener células competentes de la cepa que se pretendía usar en cada caso como receptora del plásmido.

Se siguieron dos métodos de inducción del estado de competencia: el método SEM (*simple and efficient method*) descrito por Inoue *et al.* (1990) y el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1985). Con éste se consigue alta eficiencia de transformación (hasta 5×10^8

transformantes/ μg de ADN), aunque el descrito por Inoue es más reproducible en cuanto a la alta eficiencia conseguida. Ambos métodos se utilizaron de manera rutinaria para inducir el estado de competencia de diferentes cepas de *E. coli*, especialmente de DH5 α que se utilizó como célula hospedadora de mezclas de ligación (nuevas construcciones de plásmidos), y *E. coli* ET12567/pUZ8002, que se utilizó para la transformación con cósmidos.

2.11.1.1. Inducción del estado de competencia

A) Método SEM

En este protocolo son importantes: la temperatura de crecimiento del cultivo (18 °C), trabajar durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia a 4 °C, mantener la relación de 1/10 entre el medio y la capacidad del matraz para que exista una buena aireación y agitar las células de forma suave, no utilizando el vortex.

* Protocolo:

- ↻ Crecer *E. coli* en medio LB sólido (LA) para obtener un cultivo fresco.
- ↻ Inocular un preinóculo en medio SOC (50 ml) con 20-30 colonias de *E. coli* y cultivar durante la noche a 37 °.
- ↻ Inocular 200 ml de medio SOC con un 1 % de preinóculo. Crecer en agitación (250 rpm) a 18 °C.
- ↻ Cuando el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0.6, colocar el matraz en hielo 10 minutos. A partir de este paso trabajar en frío.
- ↻ Centrifugar a 1500 g en tubos tipo GSA durante 10 minutos.
- ↻ Retirar los restos de medio y resuspender en 64 ml de tampón TB frío (4 °C). No usar agitador. Dejar en hielo 10 minutos.
- ↻ Centrifugar a 1500 g durante 10 minutos.
- ↻ Retirar los restos de medio y resuspender en 16 ml de tampón TB frío agitando manualmente. Añadir 1,12 ml de DMSO (concentración final 7 %). Agitar suavemente y dejar en hielo 10 minutos.
- ↻ Repartir en alícuotas de 100 μl de células en microtubos de 1,5 ml. Inmediatamente congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80 °C.
- ↻ Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, se comprueba la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/ μg de ADN.

* Soluciones:

- ↻ **Tampón TB** (Para 1 litro): PIPES 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM. Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y a la par ajustar el pH a 6,7. Después añadir 10,9 g de MnCl₂ · 4H₂O. Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

B) Método del Cloruro de Rubidio

La utilización de este método permite la obtención de células competentes de *E. coli* con una eficiencia de transformación de hasta 5×10^8 transformantes por μg de ADN.

* Protocolo:

- Crecer *E. coli* en medio LB sólido para obtener un cultivo fresco.
- Inocular 5 ml de medio SOB suplementado con la solución madre de magnesio (2 ml por cada 100 ml de SOB) con una colonia de *E. coli*. Incubar toda la noche (12-14 horas) a 37 °C y 250 rpm.
- Inocular 100 ml de SOB suplementado con magnesio con 200-400 μl del preinóculo. Incubar a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,48.
- Enfriar el matraz en hielo, a partir de este paso trabajar en frío. Recoger las células por centrifugación en tubos de centrifuga tipo GSA a 4000 g y 4°C durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- Resuspender suavemente el precipitado celular en 30 ml de solución RF1 fría (4 °C). Mantener en hielo durante 30 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 4000 g y 4°C y retirar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 8 ml de la solución RF2 fría (4 °C).
- Repartir en alícuotas de 120 μl en microtubos de 1,5 ml y congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80 °C.
- Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/ μg de ADN.

* Soluciones:

- **RF1:** RbCl 100 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM; acetato potásico 30 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM; glicerol 15 %. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M.
- **RF2:** MOPS 10 mM; RbCl 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mM; glicerol 15 %. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 1 N.
- **Solución madre de magnesio:** $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M.

Esterilizar las anteriores soluciones por filtración.

2.11.1.2. Procedimiento de transformación por choque térmico

El método de transformación empleado fue descrito por Hanahan (1983) y es prácticamente universal para las diversas cepas de *E. coli*, pudiendo ser usado para transformar células competentes preparadas por cualquier método.

* Protocolo:

- Descongelar las células competentes manteniendo el tubo en hielo.
- A 100 μl de células descongeladas se les añade el ADN hasta un volumen máximo de 10 μl y se mantiene la mezcla en hielo durante 20 minutos.
- Choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Enfriar inmediatamente en hielo durante 2 minutos.
- Añadir 600 μl de LB e incubar las células durante 1 hora en agitación (250 rpm) a 37°C. Este tiempo de incubación permite que la célula exprese los genes de resistencia a antibióticos incluidos en el plásmido con el que se acaba de transformar.

➤ Finalmente, sembrar las células en placas con medio suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes.

2.11.2. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

El método de transformación mediante el método físico de electroporación consiste en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso.

Este método fue utilizado para transformar la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 que contiene el cósmido correspondiente con el casete de resistencia a apramicina (Ver apartado 2.12.4.) (Gust *et al.*, 2002).

2.11.3. Transferencia de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp. mediante conjugación

La conjugación se define como la transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, por un mecanismo que incluye un contacto directo célula a célula, un plásmido conjugativo en la célula donadora y la intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas. Este proceso se puede dar entre células de un mismo género o entre células de géneros diferentes (conjugación intergenérica).

La introducción de material genético en las diferentes cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo en todos los casos mediante conjugación intergenérica, empleándose como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta cepa es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, y porta el plásmido pUZ8002, no movilizable pero contiene los genes *tra* necesarios para la movilización de vectores que contengan en su secuencia el origen de replicación *oriT*.

El protocolo descrito para la transferencia genética es una modificación (Flett *et al.*, 1997) del método descrito por Mazodier *et al.* (1989), empleándose como células receptoras esporas de *Streptomyces*.

* Protocolo:

➤ Preparar células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 en presencia de kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) para mantener el plásmido pUZ8002 y la mutación *dam*, respectivamente.

➤ Transformar el plásmido o cósmido a conjugar en las células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002. Distribuir en placas de LB suplementado con el antibiótico adecuado e incubar a 37 °C.

➤ Inocular una colonia en 5 ml de LB con cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y el antibiótico correspondiente a la construcción a conjugar. Incubar durante toda la noche, con agitación orbital a 250 rpm y a una temperatura de 37 °C.

➤ Diluir 1 ml del cultivo en 25 ml de LB con antibióticos. Incubar en agitación orbital (250 rpm), a 37 °C, durante 3-5 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4-0,6.

↻ Lavar dos veces las células con 25 ml de LB para eliminar los antibióticos que pueden inhibir el crecimiento de *Streptomyces*.

↻ Mientras se lavan las células, resuspender una concentración de esporas determinada (depende de la especie de *Streptomyces*) en 500 µl de medio 2xTY. Aplicar un choque térmico de 50 °C durante 10 min. Alternativamente, se puede usar micelio; para lo cual se recoge con un bastoncillo el micelio (1/8 de la superficie de una placa de 9 cm de diámetro) crecido en TSA durante 24 horas a 28 °C. El micelio se resuspende en 500 µl de glicerol 20 %. En este caso no es necesario aplicar choque térmico.

↻ Mezclar 0,5 ml de células de *E. coli* con 0,5 ml de suspensión de esporas o de micelio de *Streptomyces* y agitar vigorosamente. Centrifugar y resuspender el precipitado en unos 50 µl del sobrenadante.

↻ Sembrar en placas con 30 ml de medio MS al que se ha añadido 10-20 mM de MgCl₂ (sin antibióticos) e incubar a 28 °C, durante 18-24 h.

↻ Añadir una cobertera de 1,5 ml de agua con 0,5 mg de ácido nalidíxico (impide el crecimiento de microorganismos Gram-negativos como *E. coli*) y el antibiótico de selección adecuado, en la mayoría de los casos 1,25 mg de apramicina. Extender la cobertera por toda la superficie de la placa. Incubar a 28 °C, durante 5-6 días hasta que aparezcan las colonias.

2.12. Obtención de mutantes mediante REDIRECT®

La tecnología REDIRECT® permite la obtención de mutantes de *Streptomyces* mediante el reemplazamiento del gen de interés por un casete de resistencia. Esta técnica consta de tres partes, además de una cuarta opcional (Gust *et al.*, 2004).

En un primer paso, el gen de interés se ha de encontrar clonado en un vector replicativo de *E. coli*, generalmente en un cósmido. Dicha construcción es transformada en la cepa *E. coli* BW25113 que contiene el plásmido pIJ790 con genes del sistema de recombinación del bacteriófago λ (genes *red*). Estas proteínas aumentan considerablemente la eficiencia de recombinación homóloga en *E. coli* y permiten que se produzca el reemplazamiento del gen de interés contenido en el cósmido por un producto de PCR. Dicho producto de PCR contiene secuencias homólogas (36-50 pb) a las secuencias que flanquean el gen que se va a reemplazar, así como un gen de resistencia a antibióticos y el origen de transferencia *oriT*.

Una vez obtenido el cósmido recombinante, dicha construcción se transforma en la cepa *E. coli* ET12567 deficiente en metilación, de manera que posteriormente la construcción no se vea afectada por el potente sistema de restricción específico de metilación que tienen muchas de las especies del género *Streptomyces*. Además, esta cepa posee el plásmido pUZ8002, capaz de movilizar en trans otros vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*.

Por último, se lleva a cabo la transferencia del cósmido recombinante desde *E. coli* hasta *Streptomyces* mediante el proceso de conjugación. Una vez que la célula de *Streptomyces* ha incorporado el cósmido se debe producir una doble recombinación para conseguir la

sustitución en el genoma de *Streptomyces* del gen de interés por el casete de resistencia (Figura 2.2).

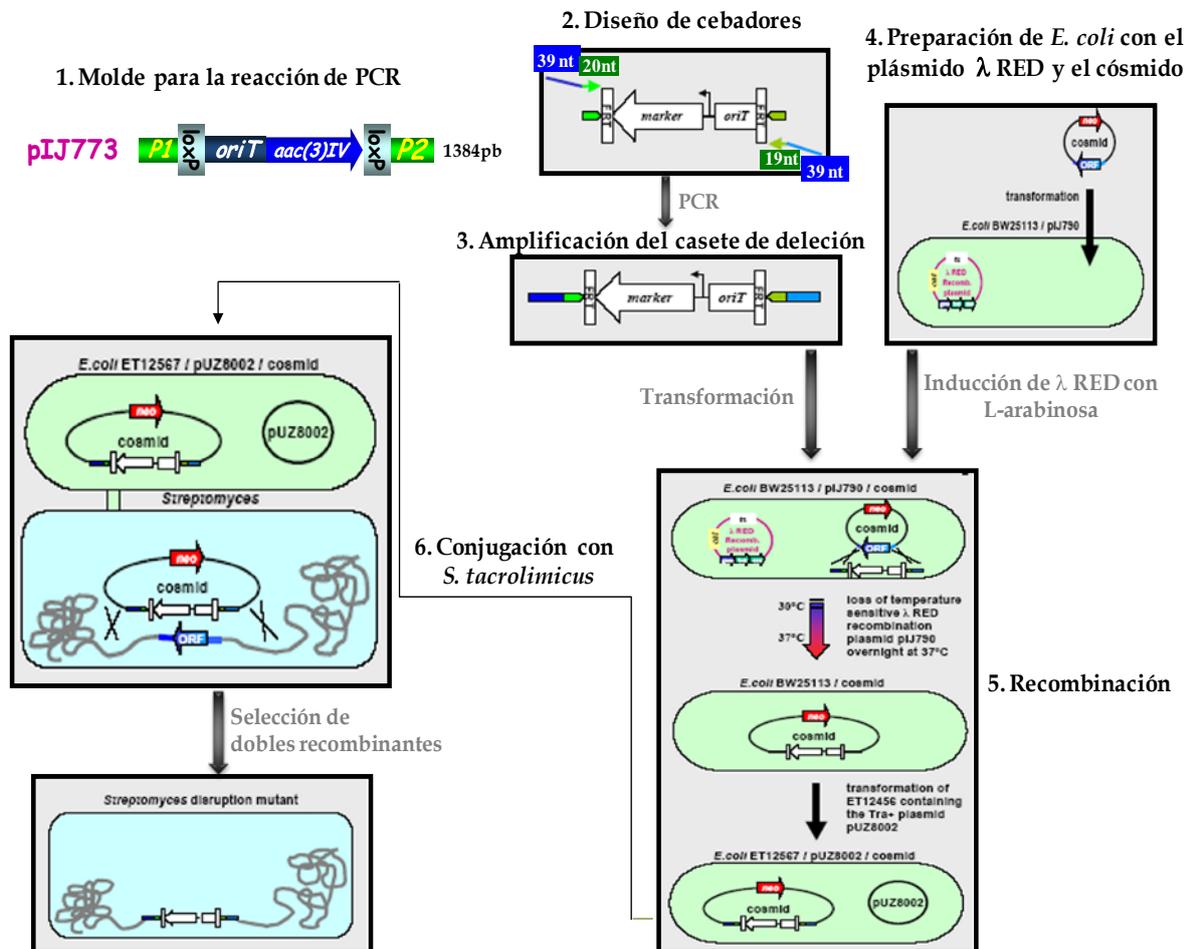


Figura 2.2. Diagrama de pasos seguidos para el reemplazamiento en *Streptomyces* del gen de interés por un casete de resistencia a apramicina mediante la tecnología REDIRECT.

Además, esta técnica permite eliminar el casete de resistencia del mutante deleciónado mediante el uso de recombinasas. La secuencia del casete de resistencia se encuentra flanqueada por sitios de reconocimiento de diferentes recombinasas, las cuales actúan catalizando la recombinación entre dichos puntos y por tanto eliminando el casete de resistencia. Existen dos tipos de sistemas de recombinasas: la recombinasa FLP, la cual reconoce los sitios *frt* presentes en el plásmido pIJ773 y la recombinasa Cre, que reconoce los sitios *loxP* presentes en el plásmido pIJ774.

El protocolo seguido es prácticamente el descrito en el manual del REDIRECT® (Gust *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido desarrollada en el centro John Innes (Reino Unido) para *S. coelicolor*, por lo que precisa de las pertinentes modificaciones y optimizaciones para su aplicación con éxito a otras especies de *Streptomyces*.

2.12.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR

El gen que deseamos inactivar debe ser sustituido por un casete de resistencia a un antibiótico. A la hora de diseñar el experimento es necesario elegir un marcador de resistencia adecuado para poder diferenciar en cada paso aquellas células que porten la construcción deseada. El centro John Innes ha desarrollado diferentes plásmidos (<http://Streptomyces.org.uk/redirect/index.html>) que contienen distintos casetes de resistencia. En este trabajo se ha utilizado el plásmido pIJ773, que contiene el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) como marcador de selección dentro del casete.

Se ha observado que el uso de plásmidos circulares como molde para la obtención del producto de PCR (casete de resistencia) resulta en un gran número de falsos positivos por lo que es importante extraer del plásmido la secuencia molde por digestión con enzimas de restricción.

* Protocolo:

➤ Digerir aproximadamente 10 µg del plásmido molde con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*) en un volumen final de 100 µl e incubar a 37 °C durante al menos 1 hora.

➤ Analizar el producto de digestión en un gel de agarosa al 0,8 % y cortar el fragmento de gel que contiene el ADN correspondiente al casete de resistencia (1382 pb). Purificar mediante el uso de *GFX PCR DNA kit and Gel Band Purification*, resuspender en agua destilada y determinar su concentración.

➤ La ausencia de contaminación con el plásmido completo se comprueba utilizando 1 µl de la suspensión purificada para la transformación de células competentes de *E. coli*. Si no se obtiene ningún transformante se puede proseguir con el protocolo.

2.12.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR

La delección de un determinado gen requiere el diseño de una pareja de cebadores específicos. Cada uno de ellos posee en el extremo 5' 39 nucleótidos que coinciden exactamente con la región situada corriente abajo o arriba del gen que se desea inactivar. Estos 39 nucleótidos incluyen el codón de inicio o de paro (dependiendo del cebador) del gen a inactivar. Mientras que el extremo 3' de cada cebador presenta una secuencia de 20 ó 19 nucleótidos (dependiendo si es el cebador directo o el reverso, respectivamente) propios de los casetes de inactivación (Figura 2.2).

En nuestro caso se diseñaron 4 parejas de cebadores, ya que se pretendía inactivar cuatro genes, denominados *fkfN*, *orfX*, *orfW* y *orfD*. La secuencia de dichos oligonucleótidos se muestra en el Anexo I.

2.12.3. Amplificación del casete de resistencia

Una vez diseñados los cebadores y purificado el fragmento *HindIII-EcoRI* se llevó a cabo una PCR teniendo en cuenta las condiciones especificadas en el protocolo desarrollado por Gust *et al.* (2002).

Es recomendable realizar la PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad para evitar la generación de errores en la amplificación del casete de resistencia, los cuales pueden interferir en posteriores pasos del protocolo. En este trabajo se ha usado la polimerasa Phusion®, para la cual se detalla la mezcla de PCR y el programa seguido:

Mezcla de PCR

Buffer HF 5X	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Cebadores (10 µM)	2,5 µl/cebador
ADN molde	50 ng
DMSO	2,5 µL
Phusion	0,5 µl
Agua destilada	Hasta 50 µl

Programa de PCR

Desnaturalización inicial	120 s a 94 °C	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	45 s a 94 °C
	Anillamiento	45 s a 50 °C
	Extensión	90 s a 72 °C
Amplificación	Desnaturalización	45 s a 94 °C
	Anillamiento	45 s a 55 °C
	Extensión	90 s a 72 °C
Extensión final	5 min a 72 °C	1 ciclo

Se analizaron 5 µl de la mezcla de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y tras comprobar que la amplificación era correcta se limpiaron los 45 µl restantes con *GFX PCR DNA kit and Gel Band Purification* y se determinó su concentración.

2.12.4. Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con cósmidos de *Streptomyces*

El plásmido pIJ790 contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y un origen de replicación sensible a la temperatura que requiere 30 °C para su replicación pero se pierde a 37 °C.

* Protocolo:

- Preparar células competentes *E. coli* BW25113/pIJ790 mediante el método SEM (ver apartado 2.11.1.1.A).
- Transformar las células competentes con el cósmido que contiene los genes de interés de *Streptomyces*. **Importante:** Realizar los cultivos a 30 °C.
- Comprobar mediante digestiones enzimáticas la introducción del cósmido en *E. coli* sin reorganizaciones y confirmar la presencia del plásmido pIJ790.

2.12.5. Inactivación del gen de *Streptomyces* en el cósmido

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790 portadoras del cósmido de interés son electrotransformadas con el casete de resistencia obtenido mediante PCR.

* Protocolo:

- Inocular las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido en 5 ml de LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml) para mantener el plásmido pIJ790 y con los antibióticos de selección del cósmido. Incubar a 30 °C (para no perder el plásmido pIJ790) durante 14-16 horas.
- Inocular con 1 % del preinóculo 100 ml de SOB suplementado con 2 ml de MgSO₄ 1 M + MgCl₂ 1 M (concentración final 40 mM), cloranfenicol (25 µg/ml), los antibióticos de selección del cósmido y 1 ml de L-arabinosa 1 M (concentración final 10 mM, necesaria para inducir los genes *red*). Incubar a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ próxima a 0,4 (3-4 horas).
- Centrifugar a 4 °C durante 5 minutos a 2000 g. Resuspender el precipitado en 20 ml de glicerol 10 % frío (4 °C).
- Centrifugar como en el paso anterior y resuspender el precipitado en 10 ml de glicerol 10 % frío. Volver a centrifugar y finalmente resuspender en 400 µl de glicerol 10 % frío.
- Mezclar 50 µl de la suspensión de células con 100-200 ng del producto de PCR. Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría (4 °C).
- Aplicar un pulso eléctrico con el electroporador (BioRad GenePulser II) en las siguientes condiciones: 2,5 kV, 500 Ω y 10 µF, debiendo transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5 y 4,9 milisegundos.
- Añadir 1 ml de medio LB frío (4 °C) a la cubeta y transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 ml. Incubar durante al menos 3 horas a 30 °C.
- Sembrar en placas de medio LB suplementado con los antibióticos de selección del cósmido y apramicina (50 µg/ml). Incubar durante toda la noche a 37 °C (de este modo se perderá el plásmido pIJ790). Si se van a realizar otras delecciones en el mismo cósmido con diferentes casetes de resistencia a antibióticos, incubar a 30 °C y añadir cloranfenicol (25 µg/ml) a las placas para evitar la pérdida del plásmido pIJ790.
- Analizar las construcciones obtenidas mediante PCR o patrón de digestión.
- Una vez comprobado que la recombinación se ha producido eficientemente, extraer los cósmidos recombinantes mediante lisis alcalina (ver apartado 2.6.1.1). Realizar la extracción tan pronto como sea posible porque se pueden producir reorganizaciones debido a que las células BW25113 son altamente recombinogénicas.

Nota: En la misma colonia pueden co-existir cósmidos recombinantes y cósmidos silvestres. Estos últimos se perderán durante la transformación a la siguiente cepa de *E. coli* y además no contienen *oriT*, por lo que no podrán ser transferidos a *Streptomyces*.

2.12.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces*

La transferencia se produce mediante conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces*.

* Protocolo:

- Preparar células competentes ET12567/pUZ8002 mediante el método del SEM (ver apartado 2.11.1.1.A). Crecer en medio suplementado con kanamicina (25 µg/ml) y con cloranfenicol (25 µg/ml), para mantener el plásmido pUZ8002 y la mutación *dam* (metilación deficiente), respectivamente.
- Transformar las células competentes ET12567/pUZ8002 con el cósmido recombinante.

- ↻ Seleccionar uno de los transformantes e incubar durante la noche a 37 °C un preinóculo en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml).
- ↻ Llevar a cabo el proceso de conjugación para transferir el cósmido recombinante a *Streptomyces* (ver apartado 2.11.3).
- ↻ Una vez añadida la cobertera con los antibióticos adecuados incubar a 28 °C durante 5-6 días.
- ↻ Comprobar si se ha producido la doble recombinación mediante la siembra en placas de TSA suplementado con ácido nalidíxico (25 µg/ml) y los antibióticos de selección, donde el fenotipo debe ser apramicina resistente y kanamicina sensible.
- ↻ Realizar dos rondas de esporulación con los antibióticos pertinentes. En la primera ronda sembrar en estría para obtener colonias aisladas y en la segunda amplificar a partir de una sola colonia.
- ↻ Una vez obtenidas las esporas del mutante delecionado, volver a comprobar el fenotipo mediante siembra en TSA suplementado con los antibióticos necesarios.

2.13. Métodos relacionados con la extracción y análisis de ARN

En general, y dada la facilidad con la que el ARN es objeto de procesos degradativos, así como la práctica ubicuidad en el ambiente de RNasas, se siguieron las precauciones clásicas en cuanto al manejo de muestras de ARN durante la manipulación de las mismas. Las micropipetas empleadas se sometieron a tratamiento con el sistema inhibidor de RNasas *RNaseZap* (Ambion inc.), del mismo modo que todo el material no esterilizable en autoclave. El agua mQ y todo el material de plástico desechable (como tubos eppendorf y puntas para las micropipetas) fueron esterilizados dos veces consecutivas en autoclave.

2.13.1. Aislamiento de ARN total de *S. tacrolimicus*

Con objeto de estudiar determinados aspectos de la expresión génica de varios genes de la agrupación génica de tacrolimus, se procedió a la purificación del ARN total de *S. tacrolimicus*. Puesto que las fermentaciones de las distintas cepas de *S. tacrolimicus* para detectar la producción de tacrolimus se realizaron en medio sólido, la extracción del ARN se realizó a partir de micelio crecido en medio sólido, con el fin de estandarizar las condiciones de cultivo.

Para iniciar las fermentaciones en medio sólido se partió de un preinóculo crecido en matraces indentados de 500 ml conteniendo 50 ml de medio BASAm, inoculados con una suspensión de 100 µl de esporas a una concentración final de 10⁷ UFC/ml. El preinóculo se incubó durante 48 horas a 28 °C y 220 rpm, tras lo cual se sembraron 500 µl/placa en medio de producción FKAm, incubando las placas a 28 °C.

La muestra de cultivo para llevar a cabo la extracción del ARN se tomó al cumplirse las 72 horas del cultivo, empleándose una adaptación de un método descrito anteriormente para *Streptomyces* (Tunca *et al.*, 2007).

*** Protocolo:**

➤ Recoger el micelio (crecido sobre un disco de celofán) correspondiente a un cuarto de placa. Añadir 600 µl de *RNA Protect Bacteria Reagent* (Qiagen), agitar con vortex y mantener la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente.

➤ Centrifugar la mezcla 8 minutos a 9300 g y T^a ambiente. Decantar el sobrenadante asegurándose de que no queda líquido residual en el precipitado. Congelar el precipitado a -80 °C hasta el momento de hacer la extracción de ARN.

➤ Descongelar el micelio y añadir 100 µl de lisozima a una concentración de 15 mg/ml, resuspendiendo mediante pequeños golpes.

➤ Incubar un máximo de 10 minutos, mezclando por inversión cada 2 minutos aproximadamente.

➤ Añadir 700 µl de RLT-β-Me a cada tubo. Agitar con vortex.

➤ Transferir a tubos *Lysing Matrix B* con esferas de sílica (qBiogen).

➤ Colocar los tubos en un aparato FastPrepTMF120 (BIO 101) para llevar a cabo la ruptura celular. Aplicar dos ciclos de ruptura de 30 segundos de duración a velocidad 6,5 y separados por un minuto de refrigeración en hielo.

➤ Centrifugar 1 minuto a T^a ambiente para que las esferas de sílica se compacten.

➤ Recuperar el lisado y transferir a un tubo *Phase Lock Gel* (PLG; 5Prime) ya empaquetado. Añadir ½ volumen de aqua-fenol (Fisher BioReagents) y ½ volumen de CIA. Agitar y homogeneizar durante 30 segundos. Centrifugar 5 minutos a T^a ambiente.

➤ Transferir la fase superior en un nuevo tubo PLG y repetir el paso anterior.

➤ Transferir la fase superior a un nuevo tubo de 2 ml y añadir etanol 100 % (volumen de muestra multiplicado por 0,55). Mezclar pipeteando.

➤ Añadir 750 µl de la mezcla a una columna de purificación *RNeasy Mini Spin Columns* (Qiagen) y centrifugar durante 15 segundos a 9300 g. Descartar el eluido y volver a pasar el resto de la mezcla. Centrifugar durante 15 segundos a 9300 g.

➤ Añadir sobre la membrana de la columna 350 µl de tampón RW1 (Qiagen). Centrifugar durante 30 segundos a 9.300 g y descartar el eluido.

➤ Añadir 80 µl de la solución de DNasaI (Quiagen) sobre la membrana de la columna e incubar 30 minutos a 30 °C. Añadir 100 µl de RW1. Dar un pulso de centrifugación.

➤ Repetir el paso de digestión añadiendo 80 µl de la solución de DNasa I sobre la membrana de la columna, incubando otros 30 minutos a 30 °C.

➤ Añadir 350 µl de RW1, dejar 5 minutos y centrifugar 15 segundos a 9300 g. Descartar el eluido en el tubo de colección.

➤ Cambiar el tubo colector. Añadir 500 µl de tampón RPE (Qiagen). Centrifugar 15 segundos a 9300 g. Descartar el eluido.

➤ Añadir 500 µl de tampón RPE. Centrifugar 2 minutos a 9300 g para secar la membrana.

➤ Transferir la minicolumna a un tubo eppendorf nuevo de 1,5 ml.

- Añadir 50 µl de agua mQ directamente sobre la membrana y dejar 1 minuto. Centrifugar 1 minuto a 9.300 g para eluir el ARN.
- Transferir el ARN tras la elución a un eppendorf de 0,5 ml.
- Añadir 1 µl de DNasa (Ambion). Incubar 30 minutos a 37 °C.
- Inactivar la DNasa añadiendo 0,2 vol del inactivador (Ambion). Mezclar durante 2-3 veces durante los dos minutos de la incubación. Centrifugar 1,5 minutos a 16000 g. Trasferir a un nuevo tubo, con cuidado de no remover la resina (inactivador).
- Cuantificar la concentración de ARN y determinar su integridad (ver apartado 2.14.2).
- Conservar la muestra de ARN a -80 °C.

Nota: Las columnas *RNeasy mini spin*, así como los tampones RLT, RW1 y RPE están incluidos en el kit comercial *RNeasy™ Mini Kit* (Qiagen).

- **RLT-β-Me:** Añadir 10 µl de β-Mercaptoetanol por cada 1000 µl de RLT
- **Solución de DNasa I** (Quiagen): Añadir 10 µl de DNasa I a 70 µl de RDD

2.13.2. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN

2.13.2.1. Concentración y pureza del ARN

Al igual que en el caso del ADN (ver apartado 2.7.3), la concentración y pureza de las muestras de ARN fueron evaluadas con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), teniendo en cuenta en esta ocasión que la absorptividad específica para el ARN tiene un valor de 40 µg/ml, y que en el caso de la pureza, ésta se considera óptima cuando el valor del cociente $A_{260/280}$ se encuentra entre 1,9 y 2,1 (Sambrook y Rusell, 2001).

2.13.2.2. Integridad del ARN

Se midió la integridad del ARN en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando los chips incluidos en *RNA 6000 Nano LabChip® kits* (Agilent). Este sistema permite la separación del ARN según su peso molecular mediante una electroforesis que tiene lugar en microcanales, detectando los fragmentos a través de fluorescencia inducida por láser (Mueller *et al.*, 2000). El resultado se expresa en forma de un electroforetograma, donde cada pico se corresponde con un fragmento de ARN, siendo el área de cada pico proporcional a la cantidad de ARN de ese tamaño. El aparato es capaz de transformar este electroforetograma en una imagen similar a la que se obtendría en un gel, pudiendo observarse bandas que se corresponderían con cada pico del electroforetograma y, por tanto, con cada fragmento de ARN presente en la muestra.

El bioanalizador expresa la integridad del ARN a través del número RIN (*RNA Integrity Number*), calculado mediante la aplicación informática suministrada con el equipo a través de un algoritmo, que no sólo tiene en cuenta la relación entre las bandas ribosomales 23S y 16S, en el caso de las bacterias, sino que también considera otros parámetros, como la intensidad

y cantidad de otros picos presentes en la muestra (Schroeder *et al.*, 2006). El RIN varía entre un valor de 10 (muestras sin ninguna degradación) y 1 (muestras totalmente degradadas).

Para medir la integridad de las muestras en el bioanalizador se siguieron las indicaciones del fabricante, analizando 50-500 ng de ARN, previamente cuantificado mediante NanoDrop.

2.14. Técnicas aplicadas en el análisis de la expresión génica

El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*) a tiempo real. Esta técnica permite la cuantificación relativa de las diferencias de expresión de un determinado gen en la cepa silvestre y los mutantes.

2.14.1. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

En esta técnica, la retrotranscripción del ARN a ADNc se combina con la amplificación posterior del ADNc mediante una PCR a tiempo real. Esta variante de la PCR se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR a lo largo de todo el proceso de amplificación (Higuchi *et al.*, 1993).

En este trabajo, las reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron en dos pasos, de manera que la retrotranscripción y la posterior reacción de amplificación del ADNc se llevaron a cabo en dos fases y tubos diferentes. Como marcador del producto amplificado se utilizó *SYBR® Green* (Applied Biosystems), fluoróforo que sólo emite fluorescencia al unirse a ADN de doble cadena, siendo la cantidad de fluorescencia emitida durante una reacción de PCR proporcional a la cantidad de producto amplificado. Debido a que el *SYBR® Green* se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, es muy importante que en la reacción de PCR no se amplifiquen productos inespecíficos ni se formen dímeros de oligonucleótidos.

El diseño de los cebadores se llevó a cabo de manera que amplificasen fragmentos de entre 100 y 200 pb cercanos al extremo 5' del ARNm que se deseaba amplificar. Se intentó que la complementariedad de los cebadores fuera lo menor posible para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, los cuales disminuyen la eficiencia de la amplificación y alteran los resultados al producir un aumento inespecífico de la fluorescencia.

2.14.1.1. Retrotranscripción

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando la retrotranscriptasa *SuperScript™ III* (Invitrogen), utilizando como molde una cantidad de ARN que varió entre 0,5 y 3µg. La retrotranscripción se llevó a cabo con hexanucleótidos al azar (*Random Primers*, Invitrogen) a una concentración final de 12,5 ng/µl.

*** Protocolo:**

- ↻ Mezclar los cebadores, el ARN molde y los dNTPs (concentración final de 0,5 mM) y añadir agua hasta completar un volumen final de 14 μ l.
- ↻ Incubar a 70 °C durante 5 minutos e inmediatamente enfriar a 4°C durante un tiempo mínimo de 1 minuto.
- ↻ Añadir 4 μ l de Tampón 5X, 1 μ l de DTT 0,1 M y 1 μ l de retrotranscriptasa (200 unidades). Mezclar con la pipeta.
- ↻ Incubar durante 1 hora a 55 °C.
- ↻ Inactivar la retrotranscriptasa incubando a 70 °C durante 15 minutos.
- ↻ Guardar el ADNc a 4 °C si va a usarse en las siguientes 48 horas. Si no es así, almacenar a -20 °C hasta el momento de su uso.

*** Soluciones:**

- 🔹 **Tampón 5X y DTT 0,1 M:** Suministrados junto a la retrotranscriptasa *SuperScript™ III*.

2.14.1.2. PCR a tiempo real

La amplificación y cuantificación del ADNc mediante PCR a tiempo real se realizó usando *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), en un termociclador *StepOnePlus™* (Applied Biosystems).

Las reacciones se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 20 μ l. Como molde se utilizaron 2 μ l de ADNc sintetizado del modo indicado en el apartado anterior y que, según el gen analizado, se utilizó sin diluir o diluido de 2 a 10 veces, de manera que el inicio de la amplificación del producto se detectara entre los ciclos 15 y 25. La concentración de oligonucleótidos se optimizó para cada pareja, de manera que se obtuviera la mayor amplificación de producto específico, en el menor Ct, y sin formación de dímeros de oligonucleótidos. Para la mayoría de los cebadores la concentración óptima fue de 300 nM.

Para comprobar que en las muestras de ARN no existía contaminación con ADN, se llevaron a cabo controles negativos donde se sustituyó el ADNc molde por ARN. La detección de producto específico de amplificación en estas reacciones de PCR solo puede ser debido a la presencia de ADN contaminante en las muestras de ARN.

El programa de amplificación que se aplicó se muestra a continuación:

	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	50 °C	2 minutos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 minutos
PCR (40 ciclos)		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Hibridación/Extensión	60 °C	1 minuto

En todos los casos, finalizado el programa de amplificación, se llevó a cabo una curva de disociación para detectar la posible amplificación de productos inespecíficos o la formación de dímeros de oligonucleotidos. La ausencia de dímeros y contaminantes se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% del producto final.

La determinación de la línea base así como del ciclo umbral se llevó a cabo mediante la aplicación informática suministrada junto a termociclador (*StepOnePlus™ Software*, versión 1.2.3, Applied Biosystems).

2.14.1.3. Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación del producto durante una PCR a tiempo real debe producirse en la fase exponencial de amplificación antes de que los componentes de la reacción comiencen a ser limitantes, ya que sólo entonces la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad de molde inicial (Bustin, 2000). Debido a esto, la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en la determinación del ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*), definido como el ciclo en el cual la fluorescencia debida al producto sobrepasa el umbral de la fluorescencia basal.

La cuantificación relativa de las diferencias de expresión de un gen diana entre dos cepas se realizó a través del modelo matemático descrito por Pfaffl (2001). Este método requiere la co-amplificación de un gen de referencia cuya expresión no muestre diferencias entre las cepas analizadas, permitiendo compensar pequeñas variaciones en la cantidad de ARN molde presente en las reacciones, originadas por errores en la cuantificación y pipeteo de las muestras y difiere del método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001), en que este último no tiene en cuenta el valor de la eficiencia de la reacción de PCR que se obtiene a partir de la curva standard realizada a partir de diluciones seriadas de ADNg (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia se empleó el *hrdB*, el cual codifica un factor sigma de expresión constitutiva en *Streptomyces* (Buttner *et al.*, 1990).

En la ecuación de Pfaffl, la cuantificación relativa (R) del gen diana (objeto de estudio) se calcula en base a la eficiencia (E) y la desviación del Ct de una muestra desconocida (en nuestro caso el mutante) frente al control (cepa silvestre) y expresado en comparación con el gen de referencia, en nuestro caso *hrdB* (Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta Ct_{\text{diana}}(\text{control-mutante})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-mutante})}}$$

Valores relativos de expresión superiores a 1 indican que la expresión del gen analizado se encuentra sobreexpresado en la cepa mutante, mientras que valores inferiores a 1 indican la represión del gen en la cepa mutante.

La eficiencia de amplificación de los cebadores empleados debe encontrarse próxima al 100%. La eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos se determinó amplificando diluciones seriadas (1:4) de ADN genómico (6 diluciones diferentes, cada una de ellas amplificadas por triplicado), y midiendo la pendiente de la recta resultante de la representación los Ct obtenidos frente al logaritmo de la concentración de ADN. Se consideraron como válidos valores de pendiente comprendidos entre -3,6 y -3,1, que se corresponden con una eficiencia del 90-100%.

2.15. Análisis de la producción de tacrolimus

2.15.1. Tratamiento de las muestras de fermentación

Para conseguir una concentración de tacrolimus más alta, se procedió a la optimización del proceso de fermentación en medio sólido para *S. tacrolimicus* (ver apartado 3.2.7.2).

* Extracción de tacrolimus con acetato de etilo

* Protocolo:

- Recoger el micelio crecido sobre el disco de celofán correspondiente a 8 placas en un tubo Falcon de 50 ml (pesado previamente para la posterior determinación del peso seco) y añadir el mismo volumen de acetato de etilo grado HPLC.
- Agitar vigorosamente durante 10 minutos y centrifugar a 3500 g durante 10 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo Falcon nuevo.
- Añadir un volumen de acetato del etilo al micelio precipitado y agitar durante 10 minutos. Centrifugar igualmente a 3500 g durante 10 minutos y juntar con el anterior.
- Concentrar la muestra en un rotavapor (Büchi® R-20), hasta la completa evaporación del disolvente.
- Resuspender la muestra en 150 µl de metanol grado HPLC: agua mQ (1:1; v:v).
- Reservar 50 µl para la realización del bioensayo dejando el resto para su análisis mediante HPLC.

* Determinación del peso seco

* Protocolo:

- Pesar el tubo Falcon de 50 ml en el que se va a realizar la extracción de tacrolimus con acetato de etilo.
- Tras la extracción (ver apartado anterior), secar los tubos con el precipitado a 80 °C hasta que el peso sea constante, en unas 48 horas.
- Pesar los tubos con el micelio seco y restar el peso del tubo Falcon.

2.15.2. Cuantificación de tacrolimus

➤ **Bioensayo**

El bioensayo permite detectar la presencia de un determinado compuesto gracias a su actividad biológica, por lo que al crecer en medio sólido un microorganismo sensible en presencia de dicho compuesto se observarán halos de inhibición.

El tacrolimus, además de ser un inmunosupresor, tiene actividad antifúngica, lo que permite medir su actividad mediante bioensayo con levaduras. Las cepas de *S. cerevisiae* que normalmente se utilizan en los laboratorios no son sensibles al tacrolimus, ya que no precisan de la calcineurina (la enzima inhibida por el tacrolimus) para el crecimiento vegetativo. Estas cepas se pueden convertir en sensibles mediante un tratamiento con sal de litio 0,5 M. Los bioensayos se realizaron con la cepa mutante *S. cerevisiae* TB23, sensible a tacrolimus (Arndt *et al.*, 1999; Breuder *et al.*, 1994).

* Protocolo:

- Inocular medio YPD líquido con colonias de *S. cerevisiae* TB23 obtenidas a partir de placas de medio YPD sólido. Incubar a 30 °C en agitación hasta que alcance una DO₆₀₀ 1,8-2,2.
- Añadir 3 ml del cultivo a 60 ml de YPD estéril (1,5% de agar) previamente fundido y mantenido en un baño de agua a una temperatura de 42 °C. Agitar la mezcla suavemente evitando la formación de burbujas.
- Colocar la placa en una superficie plana y verter la mezcla de YPD con la levadura sobre la misma, procurando que el medio quede homogéneamente distribuido por toda la placa. Dejar solidificar durante unos 20 minutos.
- Realizar los pocillos con un sacabocados de 5 mm de diámetro. Colocar en cada pocillo 50 µl de muestra y dejar las placas durante 2 horas a 4 °C para permitir la difusión de la muestra.
- Incubar las placas a 30 °C para permitir el crecimiento de la levadura. A las 24 horas ya se pueden observar los halos de inhibición.

➤ **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La determinación cuantitativa de la producción de tacrolimus se realizó en un equipo de HPLC (Waters Alliance®). Como control se utilizó tacrolimus puro (cedido por Antibioticos SA), disuelto en metanol (50 %) a una concentración final de 1 mg/ml.

El sistema de Waters Alliance HPLC está equipado con una columna XBridge™ C18 (2,1 mm x 150 mm, 3,5 µm tamaño de partícula) y la cuantificación se realizó a una temperatura de 50 °C (Goranovic *et al.*, 2010). La separación se realizó con un método isocrático con la siguiente fase móvil: A: ácido trifluoroacético (TFA) al 0,01 % en agua; B: acetonitrilo y C: Metiliterbutileter, en proporción 65:28:7. El flujo fue mantenido a 0,5 ml/min y la detección de tacrolimus se realizó a una longitud de onda de 210 nm.

2.16. Análisis informático

A lo largo de todo este trabajo se emplearon diversas herramientas informáticas específicamente diseñadas para el manejo de información biológica.

- El análisis y tratamiento rutinario de las secuencias de ADN se realizó mediante el paquete informático Vector NTI Advance™ (Invitrogene™).
- Las comparaciones de secuencias de ADN y proteínas con las bases de datos disponibles se llevaron a cabo con la ayuda del programa BLAST, disponible *online* en el *European Bioinformatic Institute*, EBI (www.ebi.ac.uk) y en el *National Center of Biotechnology Information*, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).
- Para el diseño de los oligonucleótidos se empleó el paquete informático Vector NTI Advance™ (Invitrogene™) y el programa PRIMER3 Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/).
- Para el cálculo de similitud entre dos secuencias se utilizó el algoritmo EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).
- Para el editado de secuencias como obtener la secuencia reversa y complementaria, entre otros, se empleó el *software* DNASTAR (www.dnastar.com).
- Para los análisis de las reacciones de PCR a tiempo real se empleó el software StepOne™ (Applied Biosystems®).

Diversos recursos de internet han sido de gran utilidad, especialmente las bases de datos:

1. EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk).
2. GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).
3. PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

3. Resultados y Discusión

3.1. Secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tacrolimicus*

Al inicio de este trabajo únicamente se encontraban secuenciados los 8 genes centrales de la agrupación génica de la biosíntesis de tacrolimus (Figura 3.1). Dichos genes fueron secuenciados a partir de la cepa *Streptomyces* sp. MA6548. Por otro lado, también habían sido secuenciados 2 de los 8 genes en la cepa *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (MA6858), denominada posteriormente *Streptomyces tacrolimicus* (Martínez-Castro *et al.*, 2011), objeto de estudio de este trabajo. De dicha cepa se disponía de la secuencia de los genes *fkB*A y *fkB*B, codificantes de 2 de las 3 PKSs implicados en la formación de tacrolimus. La tercera PKS, codificada por el gen *fkB*C, se encontraba totalmente secuenciada (Motamedi y Shafiee, 1998), pero a pesar de disponerse del número de acceso, su secuencia no estaba disponible en las bases de datos. Otros genes secuenciados eran: *fkB*P, que codifica una péptido sintasa específica de pipecolato; *fkB*O, cuyo producto está implicado en la síntesis de la unidad iniciadora 4,5-dihidroxiciclohexenilcarboxílico (DHCHC); y *fkB*L, codificante de una lisina ciclodesaminasa, cuya secuencia tampoco estaba disponible en las bases de datos a pesar de disponerse del teórico n° de acceso (Motamedi y Shafiee, 1998). Por último, estaban caracterizados y secuenciados los genes situados a la derecha del cluster: *fkB*D, codificante del citocromo P450 C9-hidroxilasa y *fkB*M, que codifica una O-metiltransferasa (Ban *et al.*, 2013b; Motamedi *et al.*, 1996). En el caso de *S. tacrolimicus* sólo se disponía de la secuencia de los genes *fkB*D y *fkB*M (Motamedi *et al.*, 1996).

Debido a que las secuencias de los genes *fkB*C y *fkB*L no se encontraban disponibles en las bases de datos, solo se pudo acceder a la secuencia de los 6 genes situados a la derecha de la agrupación.

Dada la gran complejidad del inmunosupresor tacrolimus y por comparación con las agrupaciones génicas de los inmunosupresores rapamicina y FK520 (análogo C21 etilo de FK506), era razonable esperar que la agrupación génica de tacrolimus contuviera en la zona adyacente a la región conocida tanto genes biosintéticos aún desconocidos como genes reguladores. Por tanto, era necesario completar la secuenciación de toda la agrupación con el fin de conocer la totalidad de los genes implicados en la biosíntesis y regulación de tacrolimus para su posterior estudio.

Para proceder a la secuenciación complementaria de la agrupación de los genes de biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus* se utilizaron distintos cósmidos contenedores de las regiones de interés. Para ello inicialmente se llevó a cabo la organización de la genoteca de una manera piramidal.

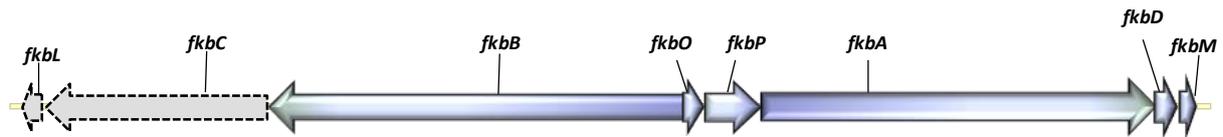


Figura 3.1. Representación gráfica de la región central de la agrupación génica de biosíntesis de FK506. Los genes delineados con líneas discontinuas representan los genes cuya secuencia no se encontraba disponible en las bases de datos a pesar de disponerse de su número de acceso.

3.1.1. Organización de la genoteca

Debido a que los métodos clásicos de rastreo de genotecas son, en su mayoría, muy laboriosos, fue necesario desarrollar un sistema que facilitara el rastreo, permitiendo la identificación de los cósmidos de interés de una manera rápida y eficaz (Martínez-Castro *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio se disponía de una librería génica de *S. tacrolimicus* y *S. tsukubaensis* de 1656 clones cada uno de ellos, organizados en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Según la ecuación de Clarke y Carbon (1976) la representatividad de una librería génica viene dada por la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Siendo N el número de clones necesarios, P la probabilidad de que estén representadas todas las secuencias del genoma y f el cociente entre el tamaño medio de los insertos de ADN clonados y el tamaño total del genoma.

El tamaño del genoma de ambas especies de *Streptomyces* se estimó en 8700 kb, realizando dicha estimación a partir del tamaño de los genomas de *Streptomyces* conocidos en el momento de la realización de la genoteca (*S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus* subsp. *griseus*). Ya que el tamaño medio de los insertos que son incorporados en el cósmido SuperCos1 es de 37,5 kb (Redenbach *et al.*, 1996), para que los genomas de *S. tacrolimicus* y *S. tsukubaensis* estén representados con un 99,9% de probabilidad se necesitan 1600 clones. Por lo tanto, la ordenación de 1656 clones constituye una genoteca representativa de cada uno de los genomas.

La organización de la genoteca se hizo del siguiente modo:

- 1) Se cultivaron 1700 clones de manera individual en 1 ml de medio TB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) en microtubos de 1,5 ml a 37 °C en agitación durante 20-24 horas.
- 2) Posteriormente, a cada tubo se le añadieron 350 µl de glicerol al 80 % (concentración final 20%) y fue etiquetado con la posición ocupada en la correspondiente placa de

microtitulación. Del cultivo de cada microtubo se dispensaron 350 μl en la posición correspondiente de la placa de microtitulación, dejando las cuatro esquinas libres para controles:

A1 : ADNt de *S. tacrolimicus* o de *S. tsukubaensis* (50 ng/ μl)

A12: ADN del cósmido SuperCos 1 (5 ng/ μl)

H1 : Cultivo en medio LB de *E. coli* XL1-Blue

H12: Cultivo en medio LB de *E. coli* DH5 α transformada con SuperCos 1

- 3) Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas diferentes (1 a 6, 7 a 12 y 13 a 18) se mezclaron en una única placa llamada Máster Parcial. En cada posición de esta placa se añadieron 50 μl de los cultivos que ocupan la misma posición en las placas individuales, disponiéndose de un volumen final de 300 μl , correspondientes a la mezcla de 6 clones.
- 4) Por último, las tres placas Máster Parcial se agruparon en una única placa llamada Máster Total, lo que nos permite tener la totalidad de los clones de la genoteca en una sola placa pero colocados en posiciones concretas de la misma. La placa Máster Total se obtuvo mezclando 100 μl de los pocillos que ocupan posiciones equivalentes en cada placa Máster Parcial, resultando en una mezcla de 18 clones por posición. Se realizaron 3 réplicas, tanto de las placas Máster Parcial como de la placa Máster Total, a modo de reserva (Figura 3.2).

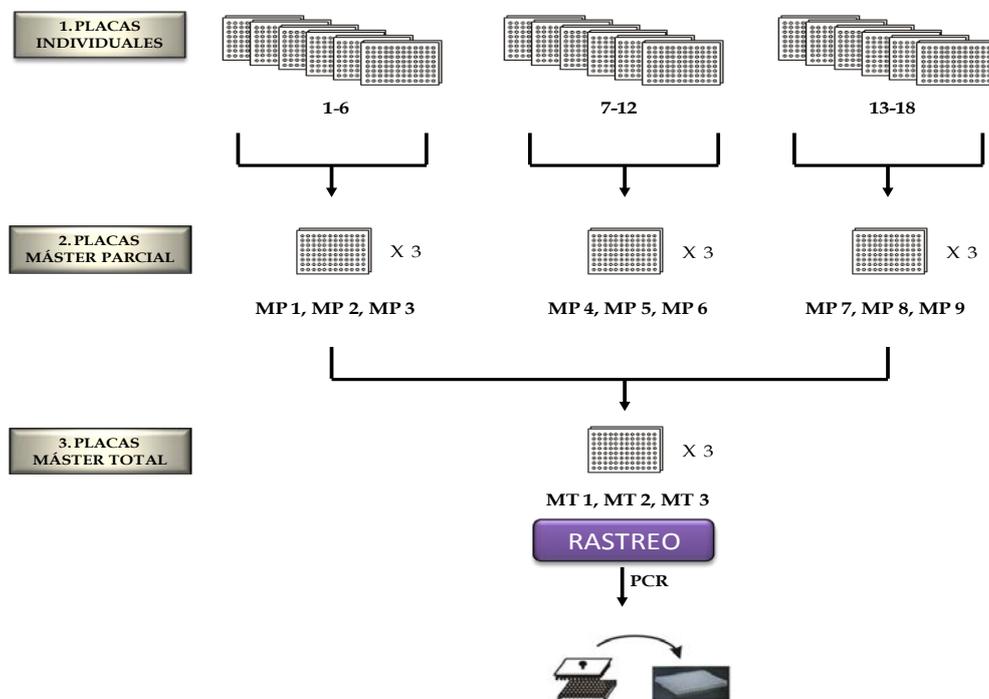


Figura 3.2. Esquema de la organización piramidal de una librería génica en placas de microtitulación. 1) Los 1656 clones se cultivaron de manera individual y se colocaron en diferentes posiciones de las 18 placas de microtitulación. 2) Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas se mezclaron de manera ordenada en una sola placa, denominada Máster Parcial (MP). 3) Las tres placas Máster Parcial se mezclaron en una sola placa, Máster Total (MT). En la parte inferior de la figura se representa el modo de rastreo de la genoteca, mediante PCR.

El resultado final de la organización comprende 1656 clones colocados de manera individual en 18 placas de microtitulación y en los correspondientes microtubos de 1,5 ml donde se realizó el cultivo (reserva de cada clon), 3 placas Máster Parcial con una mezcla de 6 clones por posición y 1 placa Máster Total con una mezcla de 18 clones por posición. Todo este material se conservó a -80 °C.

3.1.2. Rastreo de la genoteca mediante la técnica de PCR

3.1.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos

El objetivo del rastreo de la genoteca fue localizar los cósmidos que contienen los genes de biosíntesis de la agrupación génica de tacrolimus. Debido al gran tamaño de la agrupación génica (cerca a 90 kb) se realizaron 3 rastreos: uno para la región “derecha”, otro para la región “izquierda” y otro para la central. Por simplicidad en las secciones siguientes nos referiremos a la región anterior (5´) y posterior (3´) de la agrupación génica tal como se representa en la Figura 3.1 como región “izquierda” y región “derecha”.

El rastreo de la genoteca se realizó mediante la técnica de PCR. Para la zona derecha se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos a partir de la secuencia de los genes *fkbD* y *fkbM* de tacrolimus de *S. tacrolimicus*: *fkb1-fkb2*, que anillan internamente en el gen *fkbD* dando un producto de amplificación de 356 pb, y *fkb3-fkb4*, que amplifican una región de 1229 pb correspondiente a los genes *fkbD* y *fkbM*. Se realizó una PCR utilizando como ADN molde el ADN genómico total de *S. tacrolimicus* y como enzima de amplificación la Taq polimerasa. Los productos de amplificación de la PCR se clonaron en el plásmido pGEM®-T Easy obteniendo los plásmidos pGEMT-*fkbD* y pGEMT-*fkbDM*, respectivamente. Se comprobaron los distintos clones por patrones de digestión, obteniéndose varios positivos que fueron secuenciados con los oligonucleótidos universales F (forward) y R (reverse). Tras analizarse las secuencias se comprobó que todos los clones con la construcción pGEMT-*fkbDM* habían incorporado el fragmento de 1229 pb, seleccionando uno de ellos para su posterior uso como sonda.

En el caso de la construcción pGEMT-*fkbD* ningún clon presentaba la secuencia esperada. Debido a que ambas construcciones tenían clonados un fragmento de la región derecha, se decidió utilizar la pareja de cebadores *fkb3-fkb4* para el rastreo de la genoteca.

Para el rastreo de la zona izquierda se siguió una estrategia distinta. Los genes *fkbC* y *fkbl* estaban secuenciados y caracterizados según la bibliografía (Motamedi y Shafiee, 1998), pero su secuencia no está actualmente disponible en las bases de datos. Se diseñaron 2 oligonucleótidos degenerados, *fkbl5* y *fkbl6*, a partir de las zonas conservadas de los genes *fkbl* (ortólogo implicado en la síntesis de FK520) y *rapL* (ortólogo implicado en la síntesis de

rapamicina), esperando una amplificación de 788 pb. Tras realizar múltiples reacciones de PCR, probando distintas temperaturas de anillamiento, polimerasas y condiciones de reacción, no se obtuvo la banda deseada. Por ello se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos degenerados, fkb7-fkb8, que amplifican un fragmento de 680 pb y la banda obtenida se clonó en pGEM®-T Easy. En este caso obtuvimos 7 colonias positivas por patrones de digestión y tras el análisis de las secuencias obtenidas con los cebadores universales F y R se comprobó que uno de los clones presentaba la construcción correcta, a la que se llamó pGEMT-*fkbL*. A partir de la banda secuenciada de 680 pb, y ya con la secuencia propia de *fkbL* de *S. tacrolimicus*, se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos, fkb9-fkb10, cuyo producto de amplificación era de 552 pb. Esta pareja de cebadores específicos fue la usada para el rastreo de la genoteca.

Los fragmentos obtenidos de las amplificaciones por PCR con los oligonucleótidos específicos fkb3-fkb4 (amplificación parcial de los genes *fkbD* y *fkbM*) y fkb9-fkb10 (amplificación parcial de *fkbL*) se utilizaron como sondas para la hibridación tipo *Southern* y comprobar así que no daban duplicidad de banda, confirmando lo obtenido por PCR (Figura 3.3).

Finalmente, para el rastreo de la zona central de la agrupación génica se utilizaron los oligonucleótidos denominados fkbO1 (utilizado también en el rastreo de la genoteca de *S. tsukubaensis*) y fkbO2-St diseñados a partir de la secuencia del gen *fkbO* de la agrupación génica de tacrolimus de la cepa *Streptomyces* sp. MA6548. El producto de amplificación esperado era de 754 pb. Tras comprobar que la amplificación era específica, se utilizaron dichos cebadores para el rastreo de la zona central.

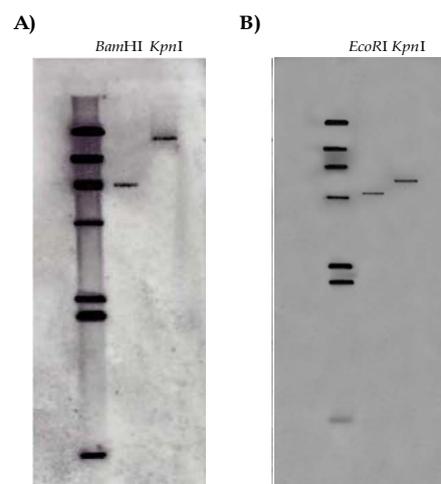


Figura 3.3. Análisis mediante *Southern* del ADN genómico de *S. tacrolimicus*. A) *Southern* utilizando como sonda parte de los genes *fkbD* y *fkbM*. Carril 1, ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción HindIII; carril 2, ADNg digerido con *Bam*HI; carril 3, ADNg digerido con *Kpn*I. B) *Southern* utilizando como sonda parte del gen *fkbL*. Carril 1, ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción HindIII; carril 2, ADNg digerido con *Eco*RI; carril 3, ADNg digerido con *Kpn*I.

3.1.2.2. Rastreo de la genoteca

La técnica de PCR permite realizar el rastreo completo de la placa Máster Total en muy poco tiempo (horas). Para la realización de este rastreo se colocó en una placa de 96 pocillos la mezcla de PCR sin ADN molde y se transfirió aproximadamente 1 μ l de los cultivos de la placa Máster Total mediante un replicador de 96 puntas (pequeñas gotas de las soluciones de los cultivos se quedan adheridas a las puntas por tensión superficial). El programa de PCR se realizó con un tiempo más largo de desnaturalización inicial (10 minutos) con el objetivo de asegurar la rotura de las células de *E. coli* hospedadoras de la genoteca. El resultado de las 96 reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en agarosa.

❖ Rastreo de la región derecha de la agrupación

Inicialmente se realizó el rastreo de la genoteca de la región derecha de la agrupación génica de tacrolimus con los oligonucleótidos fkb3 y fkb4. Tras la reacción de PCR de la placa Máster total, se obtuvieron 5 reacciones positivas correspondientes a las posiciones D1, D12, E2, F7 y G6. En la placa Máster total, cada pocillo de la placa de microtitulación se corresponde con una mezcla de 18 clones. Por ejemplo, la posición D12, sería una mezcla de los 18 clones individuales ocupando la posición D12 en sus respectivas placas individuales. Para facilitar la identificación de los clones positivos, se realizó una nueva PCR a partir de las placas Máster Parciales MP1, MP4 y MP7 (la placa MP1 contiene los 6 clones por posición de las placas individuales de la 1 a la 6, la MP4 de la 7 a la 12 y la MP7 de la 13 a la 18), pero ya únicamente de las posiciones D1, D12, E2, F7 y G6. Tras la realización de las reacciones de PCR, obtuvimos bandas positivas en la placa MP4 para D12, E2, F7 y G6. En el caso de D1 no se obtuvo ninguna banda positiva en ninguna de las placas MP.

Para llegar a las colonias individuales portadoras de los cósmidos de interés, se realizó una nueva PCR utilizando como molde los cultivos de las posiciones D12, E2, F7 y G6 de las placas individuales de la 7 a la 12, obteniendo los clones positivos 12-D12, 9-E2 y 10-F7 (denominados a partir de ahora cósmidos D, E y F); el 1^{er} número hace referencia a la placa individual, placas 12, 9 y 10, respectivamente, y la secuencia letra-número hace referencia a la posición concreta en la placa de microtitulación. Para comprobar que los cósmidos positivos contenían la región de interés se realizó la secuenciación de los extremos de los cósmidos utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7. De este modo, el cósmido D dio homología con el gen *fkbA* (empleando el cebador T3) y una deshidrogenasa (empleando el cebador T7). El cósmido E con *fkbB* (T7) y una glicosil hidrolasa (T3) y el cósmido F con *fkbB* (T3) y una endo-1,3-beta-glucanasa (T7).

En el caso del cósmido D, a pesar de que la secuencia de uno de los extremos nos daba homología con una región interna al gen *fkba*, se observó que dicho cósmido presentaba una reorganización interna ya que a partir de un determinado punto en el proceso de secuenciación nos produjo diferencia de secuencia respecto a los otros cósmidos, coincidiendo dicho punto con una diana para la enzima *Sau3A* (enzima utilizada para obtener la genoteca). La posición de los cósmidos respecto a la agrupación génica de *tacrolimus* se representa en la Figura 3.4.

❖ Rastreo de la región izquierda de la agrupación

Del mismo modo se realizó el rastreo de la genoteca para localizar la zona izquierda de la agrupación génica de *tacrolimus* (*fkbl*). El rastreo se llevó a cabo con los cebadores *fkbl9* y *fkbl10* y se detectaron 2 clones positivos 5-D1 y 1-D8 (denominados a partir de ahora cósmidos D1 y D8).

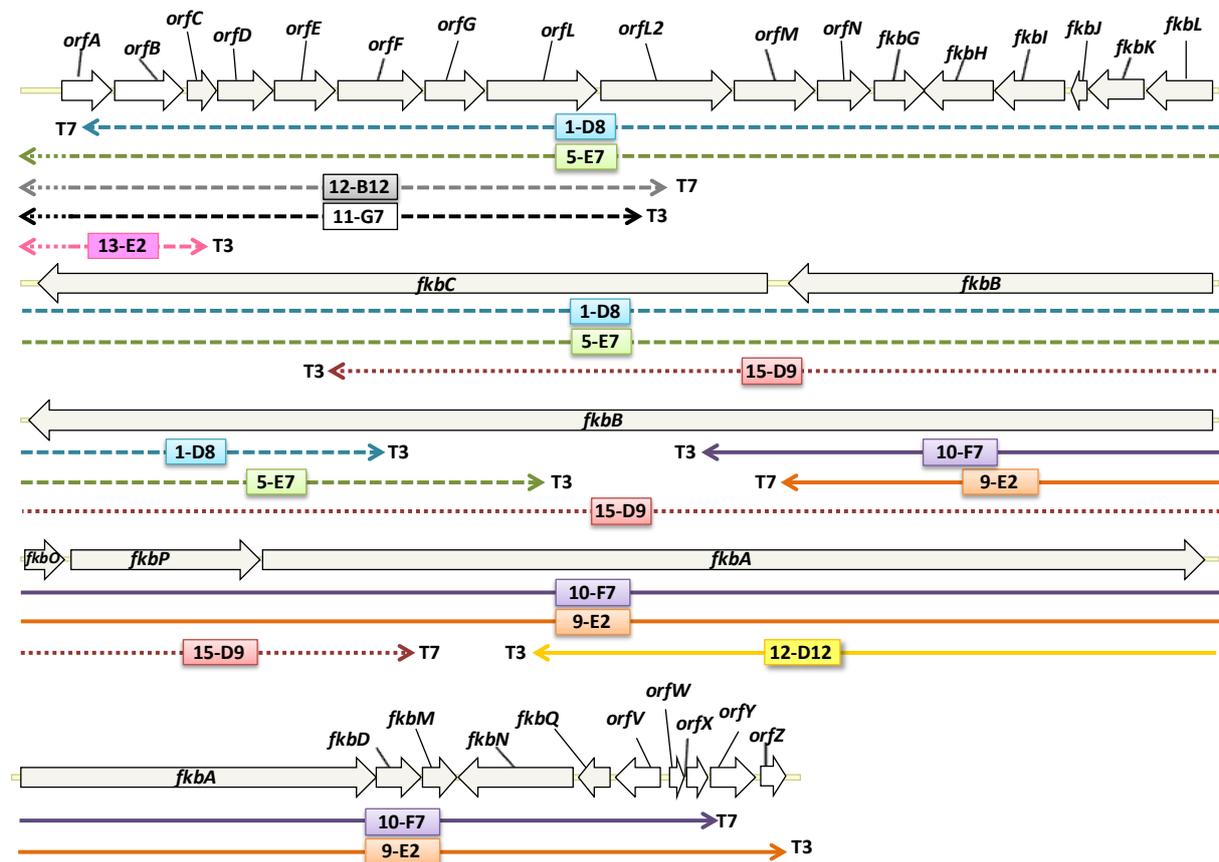


Figura 3.4. Representación esquemática de la agrupación génica de *tacrolimus* de *S. tacrolimus*. Las flechas indican la parte de la secuencia de la agrupación clonada en cada cósmido. Las flechas de trazo continuo corresponden a los cósmidos que contienen la zona derecha de la agrupación, las flechas de trazo discontinuo indican los cósmidos que contiene la zona izquierda de la agrupación y la flecha punteada corresponde al cósmido obtenido durante el rastreo de la zona central de la agrupación. El tramo final punteado al final de las flechas indica que la secuencia clonada en los cósmidos no finaliza en los límites de la agrupación, aunque al no disponerse de la secuencia completa del genoma de *S. tacrolimus* no se puede determinar su extensión. El tamaño de los genes está representado a escala y la nomenclatura se corresponde a la asignada en este trabajo.

Los extremos del cósmido D8 dieron homología con *fkB*B (T3) y una 3-oxoacil-(acil-carrier-protein) reductasa (T7). En el caso del cósmido D1 ninguno de los extremos dio homología con genes biosintéticos de FK506, a pesar de contener el gen *fkBL* y los adyacentes (comprobado mediante secuenciación), lo que puede deberse a una reorganización durante la construcción de la genoteca.

Posteriormente en el proceso de la secuenciación de la zona izquierda de la agrupación génica de tacrolimus y tras secuenciar todo el inserto del cósmido D8, se realizó un nuevo rastreo de la genoteca con el fin de continuar con la secuenciación de la agrupación génica hacia la izquierda. Se diseñaron una nueva pareja de oligonucleótidos, orfB1 y orfB2, que amplifican una banda de 973 pb correspondiente al gen *orfB*, gen identificado en el proceso de secuenciación (ver más adelante). En este caso, tras el rastreo de la genoteca por PCR se obtuvieron 5 clones positivos: 15-B12, 1-D8, 5-E7, 13-E12 y 11-G7 (denominados B, D8, E7, E12 y G7). El cósmido 1-D8 es el mismo cósmido que obtuvimos en el primer rastreo de los genes de la zona izquierda de la agrupación. Tras la secuenciación de los extremos, el cósmido B presentó homología con un citocromo p450 (extremo T3) y una policétido sintasa (extremo T7); el cósmido E7 mostró homología con una policétido sintasa (T3) y una metiltransfera (T7); el cósmido E12 presentó homología con un citocromo p450 (T3) y con una glutamina sintetasa (T7); y por último el cósmido G presentó homología con una policétido sintasa (T3) y una adenilsuccinato sintetasa (T7) (Figura 3.4). Para la secuenciación de esta zona inicialmente se utilizaron los 5 cósmidos de manera aleatoria, realizándose siempre al menos dos lecturas de cada zona usando dos moldes distintos (dos cósmidos). De esta manera nos aseguramos de que las secuencias obtenidas en el proceso de secuenciación eran correctas. Sin embargo durante el proceso de secuenciación se observó diferencia de secuencia de los cósmidos B y G respecto a los demás, por tanto se continuó la secuenciación con los cósmidos E7 y E12.

❖ **Rastreo de la región central de la agrupación**

Con los cósmidos encontrados en el primer rastreo de la genoteca no se consiguió cubrir todos los genes de la agrupación génica de tacrolimus, quedando un hueco teórico de 3271 pb interno al gen *fkB*B, por lo que fue preciso realizar un nuevo rastreo de la zona central de la agrupación.

Para localizar los cósmidos que contienen la zona central se utilizaron los oligonucleótidos *fkB*O1 y *fkB*O2-St. Se obtuvieron 13 clones positivos, 16-C8, 15-D9, 15-D10, 17-D10, 9-F7, 11-F7, 3-E9, 3-F5, 4-F5, 5-F5, 2-F9, 4-F9 y 4-G6. Se secuenciaron los extremos de 8 de los cósmidos con los oligonucleótidos universales T3 y T7, observando que únicamente el clon 15-D9 presentaba la secuencia de la zona central de la agrupación. La secuencia

obtenida con el oligonucleótido T3 presentó homología con el gen *fkbc* y la secuencia del extremo T7 mostró homología con el gen *fkba*. La baja eficiencia de resultados positivos, puesto que un único clon de 8 analizados presentaba la secuencia buscada a pesar de que todos ellos presentaban amplificación específica, puede ser debido a que la zona rastreada es una zona altamente repetida en el genoma. Los genes codificantes de las policétido sintasas presentan varios módulos con dominios repetidos, por lo que en esta zona puede darse una alta tasa de recombinación y por ello los cósmidos que contienen esta secuencia están probablemente en su mayoría reorganizados.

3.1.3. Secuenciación de los cósmidos

Para la secuenciación de los cósmidos de interés se llevaron a cabo dos estrategias. Inicialmente, se intentó subclonar los distintos fragmentos obtenidos tras la digestión de los cósmidos. Sin embargo, debido al escaso éxito obtenido con esta estrategia se procedió a la secuenciación directa utilizando los cósmidos como molde partiendo de distintos puntos de inicio de la secuenciación (Ver siguientes apartados).

- **Subclonación de fragmentos**

Como primera estrategia para la secuenciación de los fragmentos clonados en los cósmidos de interés, se procedió a la subclonación en los plásmidos pBlue-Script KS y pUC19 de los fragmentos obtenidos de las digestiones de los cósmidos.

En un primer momento se digirieron los cósmidos D, F, D1 y D8 con la enzima *DraI*, enzima que libera el inserto clonado en el cósmido Supercos I, obteniéndose 4 bandas: una correspondiente al inserto y tres correspondientes al cósmido. Se purificó la banda correspondiente al inserto y posteriormente se digirió con distintas enzimas buscando patrones de digestión que nos permitieran tener el cósmido dividido en fragmentos de un tamaño adecuado para su posterior clonación.

Inicialmente se digirieron los insertos de los cósmidos D y F con la enzima *BamHI*, obteniéndose fragmentos de entre 500 y 11000 pb (cósmido D) y de entre 400 y 10000 pb (cósmido F). Del mismo modo se digirieron los cósmidos D1 y D8 con la enzima *StuI*, obteniéndose fragmentos de entre 1500 y 10000 pb (cósmido D1) y 1500 y 13000 (cósmido D8). Dichas bandas se clonaron en los plásmidos pUC19 y pBlue-Script KS digeridos con *BamHI* y *StuI*, respectivamente. Simultáneamente se probaron distintas enzimas y combinaciones de enzimas para obtener distintos patrones de digestión. Las enzimas que se probaron para la digestión del cósmido D fueron las siguientes: *BamHI*, *EcoRI*, *Eco72I*, *KpnI*, *PstI*, *PvuII*, *NotI*, *StuI*, *SphI*, *StuI-PvuII*, *StuI-Eco72I*, *EcoRI-NotI*, *EcoRI-PstI*, *PstI-NotI*, *KpnI-NotI* y *PstI-EcoRI-NotI*. Las enzimas empleadas para la digestión de los cósmido F, D1 y D8

fueron: *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*72I, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Not*I, *Stu*I, *Sph*I, *Stu*I-*Pvu*II, *Stu*I-*Eco*72I, *Eco*RI-*Not*I, *Eco*RI-*Pst*I y *Pst*I-*Not*I.

De todos los patrones de digestión obtenidos se seleccionó para todos los cósmidos la combinación de enzimas *Pst*I-*Not*I, que proporciona un tamaño de bandas entre 400 y 14000 pb. Los fragmentos de menos tamaño se clonaron en los plásmidos pBlue-Script y pUC19 digeridos con *Pst*I y *Not*I. De este modo se consiguió la clonación de alguno de los fragmentos más pequeños, pero debido a la dificultad para clonar la mayoría de los fragmentos decidimos cambiar de estrategia secuenciando directamente los cósmidos partiendo de distintos puntos de inicio.

- **Secuenciación desde varios lps o puntos de iniciación**

Al conocer la secuencia de los extremos de los cósmidos y disponer de la secuencia de los genes de la agrupación génica de tacrolimus *fk bM* (gen de secuencia conocida situado en el extremo derecho de la agrupación) y *fk bL* (gen de secuencia conocida situado en el extremo izquierdo de la agrupación), se procedió a la secuenciación de los insertos en los cósmidos utilizando distintos puntos de inicio. Debido a que esta estrategia de secuenciación implica la utilización de un número elevado de oligonucleótidos, éstos se nombraron de un modo sencillo y ordenado. Se partió de 8 puntos de inicio para la secuenciación (Figura 3.5).

Cada oligonucleótido se nombró con la consecución de 4 números:

- * El **1^{er} número** corresponde a la cadena utilizada para el diseño de los cebadores: el 1 se corresponde con la hebra "superior" y el 2 con la hebra "inferior".

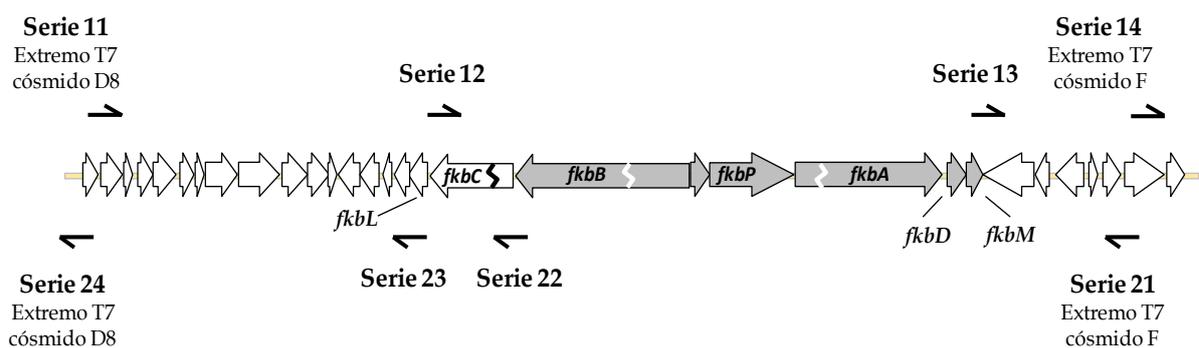


Figura 3.5. Representación esquemática donde se muestran las zonas de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus donde anillan las series de oligonucleótidos diseñados para completar la secuenciación de la agrupación. Los genes coloreados son los genes de secuencia conocida en el momento de la secuenciación, los genes en blanco son los genes obtenidos al final de la secuenciación.

- * El **2º número** se corresponde con el punto de inicio de la secuenciación.

Puntos de inicio de la hebra superior:

Punto 1: Secuencia obtenida a partir del extremo T7 del cósmido D8.

Punto 2: Secuencia obtenida a partir de la secuenciación parcial del gen *fkbl* (con oligonucleótidos fkb9-fkb10).

Punto 3: Secuencia obtenida a partir de la secuenciación parcial de los genes *fkbd* y *fkbm* (oligonucleótidos fkb3-fkb4).

Punto 4: Secuencia obtenida a partir del extremo T7 del cósmido F.

Puntos de inicio de la cadena complementaria:

Punto 1: Secuencia obtenida a partir extremo T7 del cósmido F.

Punto 2: Secuencia del extremo 3' del gen *fkbb* (con el fin de secuenciar el gen *fkbc*).

Punto 3: Secuencia obtenida a partir de la secuenciación parcial del gen *fkbl* (con oligonucleótidos, fkb9-fkb10).

Punto 4: Secuencia obtenida a partir del extremo T7 del cósmido D8.

- * El **3er y 4º número** hacen referencia a la sucesión de oligonucleótidos diseñados por posición, empezando por el 01 en adelante. Por ejemplo, el oligonucleótido fkb2105 anilla en la hebra inferior (**2**), en el extremo T7 del cósmido F (**1**) y es el 5º cebador (**05**), diseñado a partir de la secuencia obtenida con el cebador fkb2104.

En total se diseñaron un total de 76 oligonucleótidos:

Serie 11: 1101...1120	Serie 12: 1201...1206	Serie 13: 1301...1309	Serie 14: 1401...1408
Serie 21: 2101...2108	Serie 22: 2200...2206	Serie 23: 2301...2319	Serie 24: 2401...2404

De este modo se consiguió secuenciar la zona derecha (corriente abajo del gen *fkbd*) y la zona izquierda (corriente abajo del gen *fkbl*). Para la zona central, que incluye las policétido sintasas, se siguió la misma estrategia, consiguiendo únicamente una lectura de 1 kb correspondiente al final del gen *fkbc*. Esto es debido a la dificultad de diseñar oligonucleótidos específicos para secuenciar los genes que codifican las policétido sintasas, ya que dichos genes codifican proteínas modulares con dominios altamente repetidos, presentando una gran identidad de secuencia. Las secuencias en la mayoría de los casos presentaban doble pico de lectura, lo que indicaba que el anillamiento de los oligonucleótidos se producía en 2 puntos distintos del ADN.

Para asegurarnos de que la secuencia obtenida era la correcta y no se habían producido fallos de lectura en el proceso de secuenciación se llevaron a cabo varias lecturas de la misma zona con cósmidos distintos. En un punto concreto en el proceso de secuenciación de la región derecha encontramos divergencia de secuencia del cósmido D con el resto. Tras

analizar dicha secuencia se observó que dicho punto de divergencia coincidía con la secuencia de reconocimiento de la enzima *Sau3A* utilizada para la obtención de la genoteca, produciéndose la unión de 2 fragmentos *Sau3A*, por lo que dicho cósmido fue descartado para secuenciar la zona derecha de la agrupación.

3.1.4. Análisis informático de la secuencia de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tacrolimicus*

Previo a este trabajo se habían secuenciado y caracterizado tanto los genes codificantes de las PKSs (*fkbA*, *fkbB* y *fkbC*), como los genes *fkbl*, *fkbp* y *fkbo* de la cepa *Streptomyces sp.* MA6548 (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi y Shafiee, 1998).

Tras la secuenciación de la zona derecha de la agrupación génica obtuvimos 7 ORFs nuevos denominados *fkbn*, *fkbo*, *orfV*, *orfW*, *orfX*, *orfY* y *orfZ*. En la zona izquierda detectamos 17 ORFs nuevos, denominados *fkbl*, *fkbk*, *fkbl*, *fkbl* y *fkbl*. En total obtuvimos una secuencia nueva de 32271pb. A continuación se describen todos los genes, agrupados en secciones acorde a su posible función que desempeñan en la síntesis de tacrolimus (Figura 3.6).

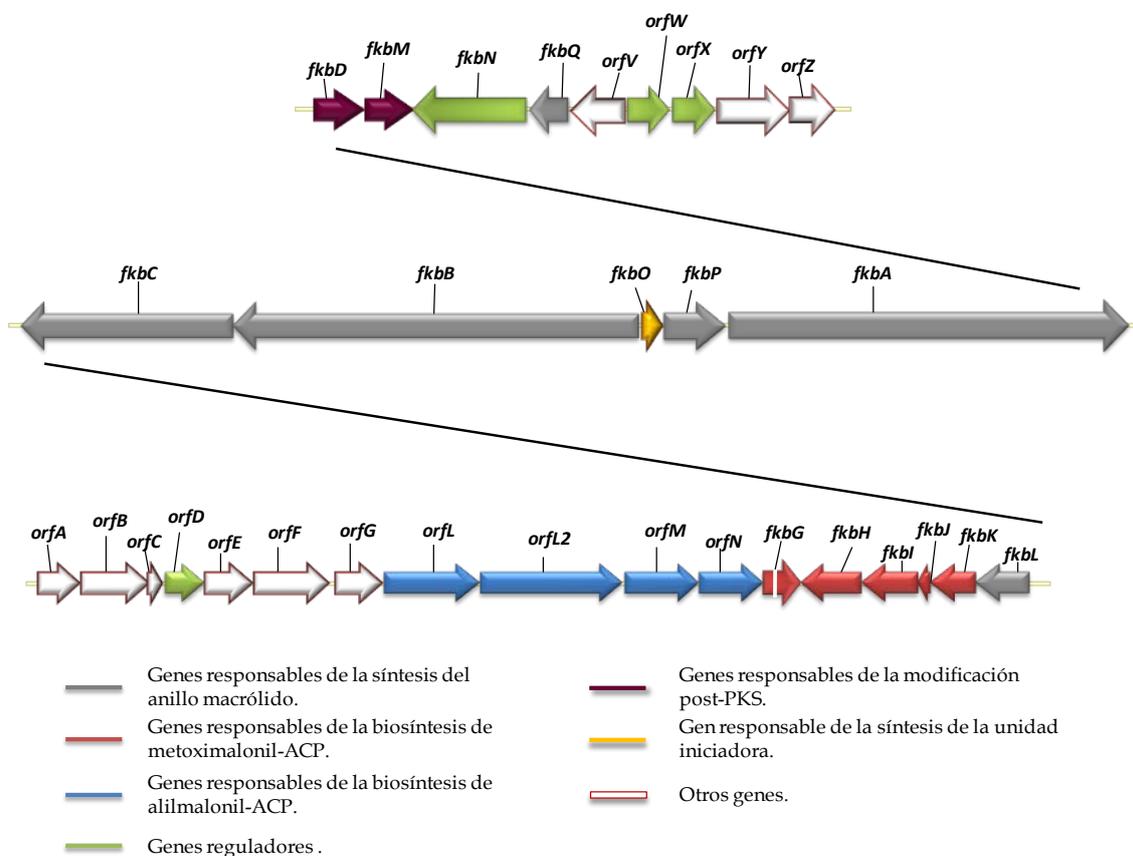


Figura 3.6. Representación esquemática de la agrupación de genes implicados en la biosíntesis de tacrolimus y de los genes adyacentes. El esquema incluye los genes presentes en las bases de datos y los secuenciados en el presente trabajo. La línea blanca en el gen *fkbo* indica que dicho gen está truncado.

3.1.4.1. Genes implicados en la síntesis del anillo macrólido de tacrolimus

La síntesis del policétido macrólido tacrolimus es llevada a cabo por una PKS modular de tipo I. La PKS de tacrolimus es un complejo enzimático codificado por tres genes (*fk bA*, *fk bB* y *fk bC*) que dan lugar a tres polipéptidos multidominio FkbA, FkbB y FkbC (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi y Shafiee, 1998). La PKS da lugar a una cadena policetídica lineal a la que posteriormente es añadido una molécula de ácido pipercolico, derivada de la lisina, por la enzima codificada por el gen *fk bL* (Motamedi y Shafiee, 1998). Finalmente la molécula en formación es activada por una péptido sintasa no ribosomal monomodular producto del gen *fk bP* y el policétido completado con el ácido pipercolico es ciclado por el complejo PKSs-NRPS (Motamedi y Shafiee, 1998).

❖ El gen *fk bB* presenta un tamaño de 22620 pares de bases, codificando una proteína de 7540 aa, con 21 dominios organizados en 5 módulos: el módulo de carga y los 4 primeros módulos de elongación (módulos 1-4) (Motamedi y Shafiee, 1998). El módulo de carga es el encargado de activar la unidad iniciadora DHCHC, un derivado de la ruta del ácido siquímico.

❖ El gen *fk bC* codifica dos módulos de la PKS (módulos 5-6) presentando un total de 11 dominios, con un tamaño de 10776 pb (3592 aa) y lleva a cabo dos ciclos de elongación (Motamedi y Shafiee, 1998). Debido a que la secuencia del gen *fk bC* no estaba depositada en las bases de datos, procedimos a su secuenciación, consiguiendo únicamente la secuencia de aproximadamente 1 kb del extremo 3', ya que como se ha indicado las secuencias codificantes de la PKS son zonas altamente repetidas y producen grandes problemas de secuenciación.

❖ Por último, el gen *fk bA* es el encargado de desarrollar los cuatro últimos ciclos de elongación, para lo que requiere 19 dominios catalíticos repartidos en 4 módulos (módulos 7-10). Presenta un tamaño de 19260 pb codificando una proteína de 6420 aa (Motamedi *et al.*, 1996).

❖ El gen *fk bL* codifica una ciclodesaminasa de 346 aa que lleva a cabo la α desaminación y ciclación de la lisina para dar ácido pipercolico que posteriormente se adiciona a la cadena policetídica ya formada (Motamedi y Shafiee, 1998). En este punto del proceso de biosíntesis de tacrolimus se centra una de las muchas estrategias que buscan aumentar significativamente la producción de tacrolimus y reducir el coste de producción. Turlo *et al.* (2012) adicionaron al medio de cultivo una concentración óptima de ácido pipercolico y nuevos compuestos precursores como ácido picolínico, ácido nicotínico y

nicotinamida, tras lo que obtuvieron incrementos en la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis* de 7, 6, 3 y 5 veces, respectivamente.

❖ El gen *fkpP* codifica una péptido sintetasa no ribosomal monomodular (NRPS), presentando un tamaño de 1505 aa. Lleva a cabo la activación del ácido pipecólico y su unión a la cadena policétida lineal (Motamedi y Shafiee, 1998).

❖ El gen *fkpQ* codifica una tioesterasa de 255 aa. Muestra mayor identidad (87 %) y similitud (92 %) con su homólogo FkbQ para la síntesis de tacrolimus de *Streptomyces kanamyceticus*. FkbQ lleva a cabo la ruptura del enlace tioester, liberándose la cadena policétida de la péptido sintasa específica de pipecolato (Motamedi y Shafiee, 1998).

3.1.4.2. Genes implicados en la síntesis de la unidad extendedora metoximalonil-ACP

Inmediatamente corriente abajo del gen *fkpL*, en el proceso de secuenciación, encontramos los genes *fkpK*, *fkpJ*, *fkpI*, *fkpH* y *fkpG*. Con dichos genes se mantuvo la nomenclatura “fkp” por su gran identidad con los homólogos ya descritos en la síntesis de FK520 en *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* y que están implicados en la síntesis de la unidad extendedora metoximalonil-CoA (Wu *et al.*, 2000).

La unidad extendedora metoximalonil-CoA es una unidad poco frecuente, aunque está presente en la estructura de distintos policétidos. Entre los metabolitos naturales en los que se introduce metoximalonato como unidad extendedora se encuentran los anticancerígenos geldanamicina, herbimicina, ansamitocina y oxazolomocina; los antifúngicos sorafeno A, galbonólido A y bafilomicina; el inhibidor de fosfatasa tautomocina; y el inmunosupresor FK520 (Figura 3.8).

Todos estos compuestos presentan el grupo de cinco genes u homólogos, *fkpK*, *fkpJ*, *fkpI*, *fkpH* y *fkpG*, en sus respectivas agrupaciones biosintéticas (Hwang *et al.*, 2013; Karki *et al.*, 2010; Wenzel *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006).

La función y disposición de los genes de síntesis de metoximalonato se mantiene constante en todas las agrupaciones. Siempre se encuentran cercanos a las PKSs, a excepción de la agrupación génica para la síntesis de galbonólido A en *S. galbus*, donde los genes de biosíntesis de la unidad extendedora metoximalonil ACP no se encuentran cerca de ninguna PKS multidominio (Karki, 2010).

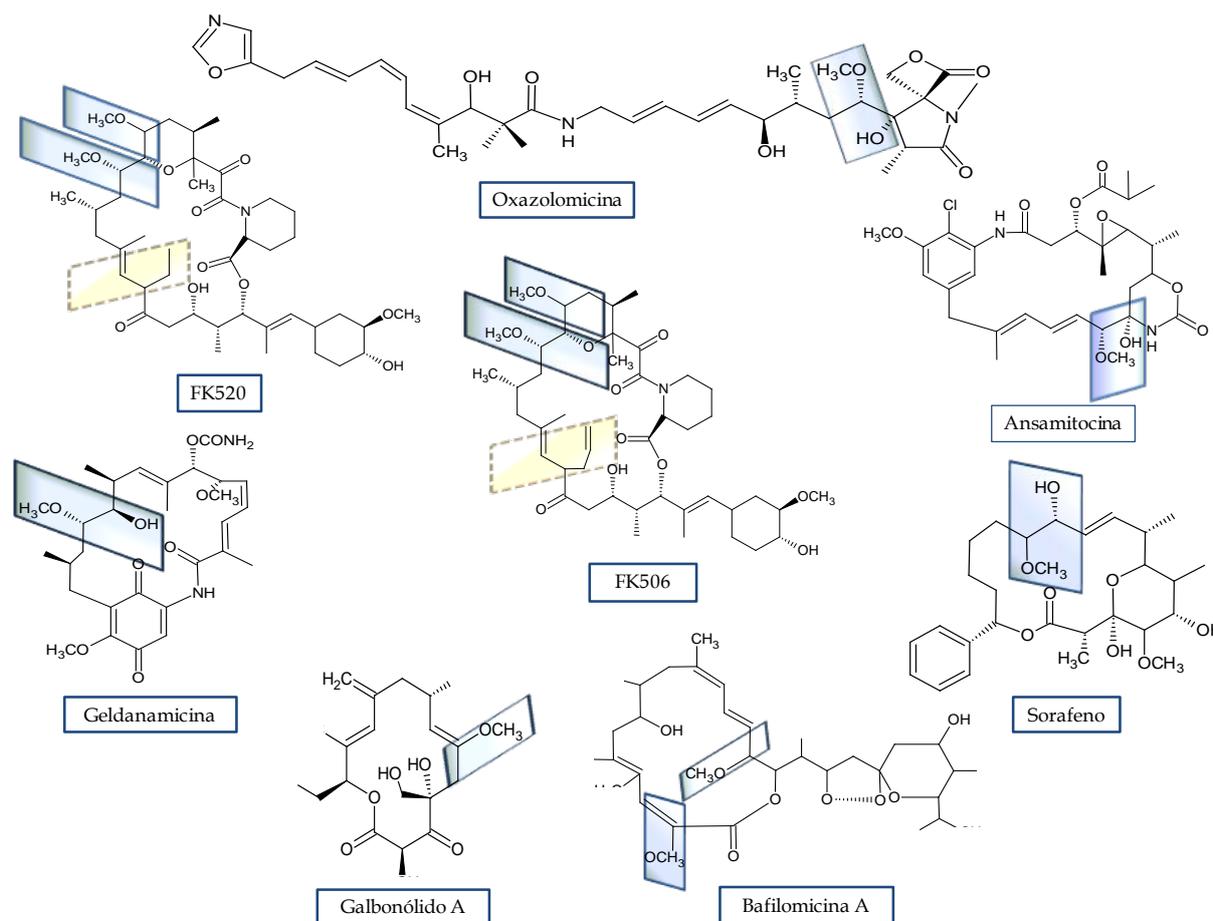


Figura 3.8. Representación gráfica de metabolitos secundarios que presentan en su estructura uno o varios grupos metoxilo procedentes de la unidad extendora metoximalonil-ACP. Los grupos metoxilo coloreados en azul son aquellos incorporados por las policétido sintasas a partir de la unidad extendora metoximalonil-CoA durante la síntesis del policétido. El resto de grupos metoxilo son incorporados al policétido mediante modificaciones post-PKS, por acción de enzimas con función metiltransferasa. La cadena lateral coloreada en beige en las moléculas inmunosupresoras FK506 y FK520 resaltan la única diferencia estructural presente entre ambos compuestos.

Destaca que los genes *fkbK*, *fkfJ*, *fkfI* y *fkfH* (o sus homólogos) mantienen la misma organización, con lo que probablemente tienen el mismo origen evolutivo. El gen *fkfG* se encuentra siempre cercano a los genes anteriores, presentando una orientación y localización que varía de una agrupación génica a otra, lo que indica una posible aparición posterior a lo largo de la evolución. En el caso de la oxazolomicina se ha integrado un nuevo gen (relacionado con la síntesis de metoximalonil-CoA) y el equivalente a *fkfG* se ha insertado entre los homólogos de *fkfJ* y *fkfK* (Figura 3.9). Debido a la proximidad de estos cinco genes (llegando incluso a solapar alguno de ellos) es más que probable que se transcriban como un único transcrito policistrónico junto con *fkfL*.

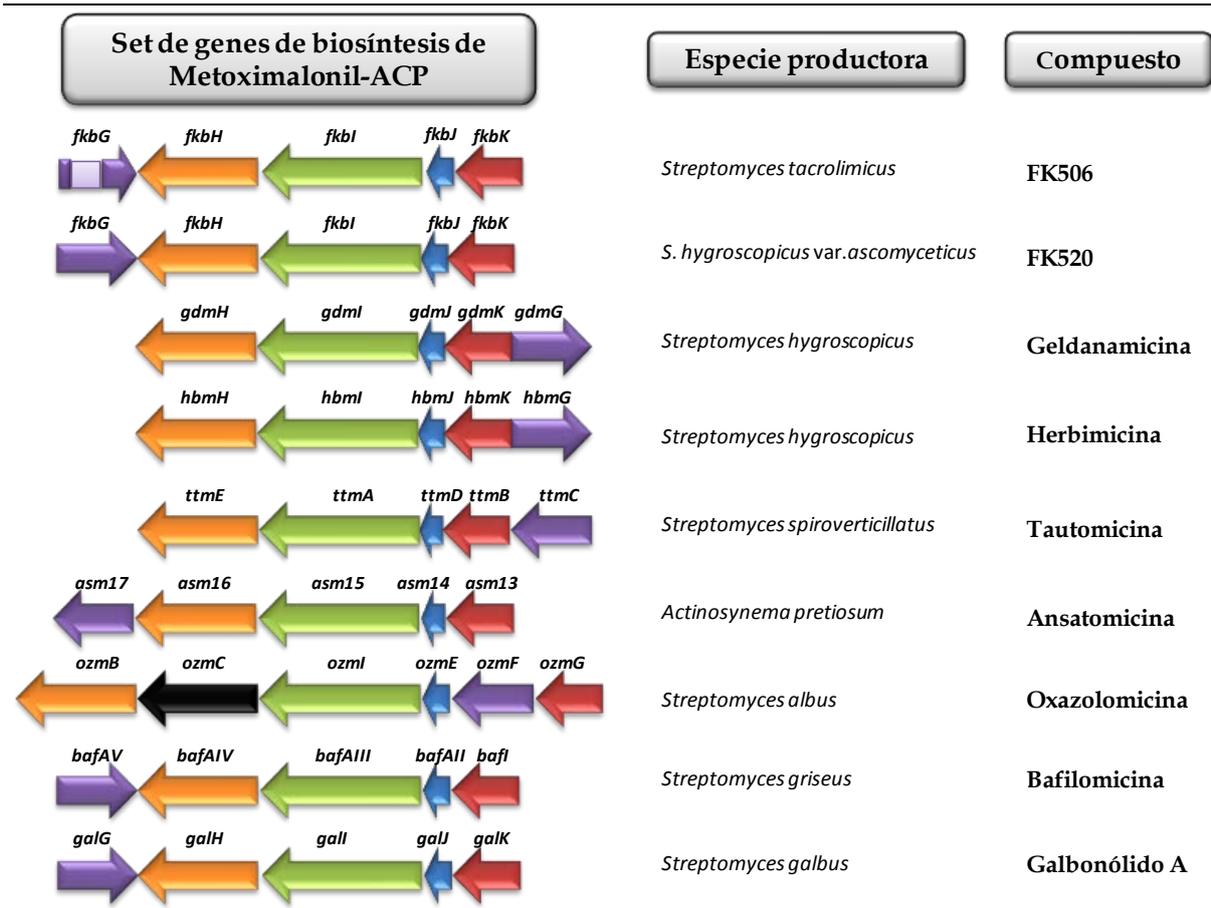


Figura 3.9. Organización de la agrupación de genes de biosíntesis de la unidad extendidora metoximalonil ACP presente en la estructura de compuestos policétidos de importante actividad biológica. Los genes homólogos se muestran en el mismo color. En el caso de *fkbG* de *S. tacrolimicus* se muestra en color morado claro el fragmento deletado.

A continuación se muestran los resultados de la secuenciación para la agrupación de genes para la síntesis de la unidad extendidora metoximalonil-ACP:

- ❖ El gen *fkbH* codifica una proteína de 362 aa. Muestra mayor identidad (91 %) y similitud (95 %) con su homólogo FkbH para la síntesis de tacrolimus de *S. kanamiceticus*. El producto del gen *fkbH* lleva a cabo el primer paso en la síntesis de la unidad extendidora metoximalonil-ACP, presentando actividad glicerol transferasa. FkbH transfiere la fracción de glicerol desde un intermediario del C3 de la glicólisis (D-1,3-bifosfoglicerato) al ACP (codificado por el gen *fkbJ*) para formar gliceril-S-ACP (Chen *et al.*, 2012; Wenzel *et al.*, 2006).
- ❖ El gen *fkbI* codifica una proteína de 366 aa, presentando mayor identidad (93 %) y similitud (94 %) con su homólogo FkbI de *S. kanamiceticus*. Presenta un dominio acil-CoA deshidrogenasa y lleva a cabo la oxidación FAD dependiente del C_β (Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2000).
- ❖ El gen *fkbJ* codifica una proteína de 86 aa. Muestra una identidad del 88 % y una similitud del 92 % con su homólogo FkbJ de *S. kanamiceticus*. Presenta un dominio ACP (transportador de grupos acilo) cercano al extremo carboxilo terminal, necesario para la

incorporación de metoximalonil a la cadena policétida. Las AT (aciltransferasas) de los módulos 7 y 8 utilizan como unidad extendedora metoximalonil-ACP en lugar de metoximalonil-CoA (Chen *et al.*, 2012; Reeves *et al.*, 2002) (Figura 3.10).

❖ El gen *fk bK* codifica una proteína de 282 aa. Muestra una identidad del 92 % y una similitud del 95 % con su homólogo FkbK de *S. kanamiticus*. Presenta actividad gliceril-ACP oxidoreductasa (Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2000).

❖ El caso más significativo es el del gen *fk bG*, estando presentes únicamente los nucleótidos que codifican los primeros 41 aa (extremo 5') y los últimos 99 aa (extremo 3') de la proteína en comparación con FkbG de *S. kanamiticus*, que contiene 222 aa. Estos dos fragmentos se encuentran separados por cinco nucleótidos, lo que supone marcos de lectura distintos. Dichos fragmentos presentan una identidad del 88 y 93 % y una similitud del 93 y 97 %, respectivamente con FkbG de *S. kanamiticus*. Los últimos 99 aa presentan un dominio conservado metiltransferasa, no estando completo dicho dominio por la ausencia de parte de la proteína, por lo que no puede ser funcional.

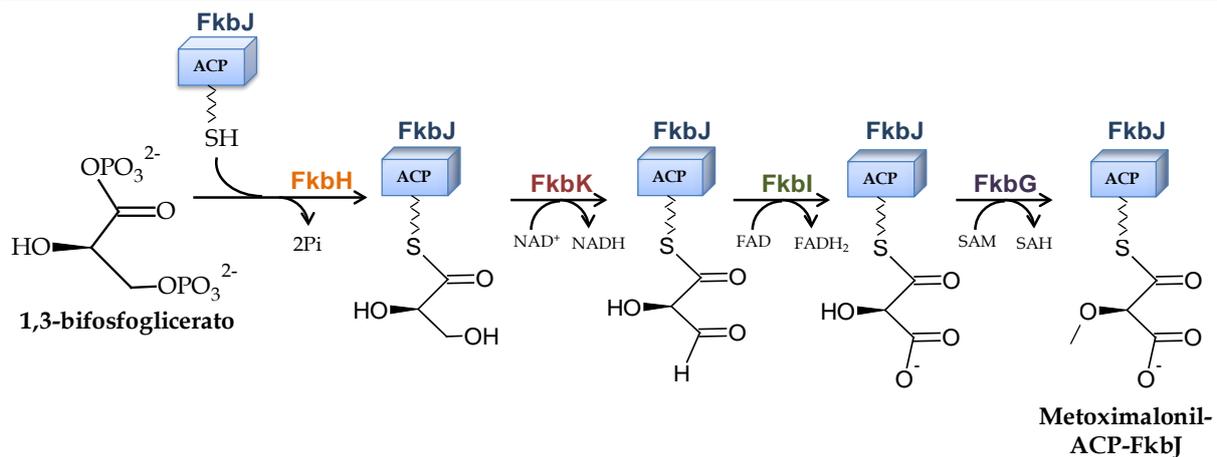


Figura 3.10. Ruta de biosíntesis de la unidad extendedora metoximalonil ACP (MM-ACP). La síntesis de MM-ACP tiene lugar a partir del intermediario glicólico 1,3-bifosfoglicerato mediante la intervención de FkbJHKIG. Fuente: Figura modificada de Barreiro y Martínez-Castro (2014).

Para comprobar que el truncamiento del gen *fk bG* no se debe a una reorganización realizamos una PCR con oligonucleótidos que flanquean la zona delecionada (*fk bG1* y *fk bG2*). La reacción de PCR se realizó a partir de ADN genómico de *S. tacrolimicus* (cepa original disponible en laboratorio y cepa pedida de nuevo a la ATCC) y a partir del cósmido D8 utilizado en el proceso de secuenciación. Si la deleción es real se obtendría una amplificación de 630 pb, mientras que en caso contrario obtendríamos una banda de 870 pb. En todos los casos obtuvimos la banda de 630 pb, lo que indica que este gen se encuentra truncado en esta cepa (Figura 3.11). Dicho resultado fue confirmado mediante secuenciación

de los productos amplificados. Posteriormente otros autores han descrito dicha delección en el gen *fkbg*, aunque sin entrar en detalle (Mo *et al.*, 2011).

El producto génico de *fkbg* lleva a cabo la metilación del C α del hidroximalonil-ACP para dar metoximalonil-ACP (Wu *et al.*, 2000). Dicha metilación es esencial para la actividad inmunosupresora, ya que los derivados no metilados de tacrolimus en C12 y C15 (13-O demetil FK506 y 15-O demetil FK506) no presentan actividad farmacológica inmunosupresora (Iwasaki *et al.*, 1995).



Figura 3.11. Análisis mediante PCR del gen *fkbg*. Carril 1, DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción PstI; carriles 2 y 4, ADN genómico de *S. tacrolimicus*; carril 3, cósmido D8.

Por lo tanto, debido a que el gen *fkbg* está truncado, y a que dicha delección no está en marco de lectura, la proteína no puede ser funcional, por lo que no sería posible la metilación de C13 y C15 necesarios para la obtención de tacrolimus. Sin embargo, dicha cepa ha sido caracterizada por distintos grupos de investigación como productora de tacrolimus (Shafiee, 1994; Singh y Behera, 2009). Una posible explicación sería que el gen *orfG*, que se encuentra 6 ORFs corriente arriba de *fkbg*, lleve a cabo la reacción de metilación, ya que al igual que *fkbg* se trata de una O-metiltransferasa.

El gen *orfG* codifica una proteína de 273 aa. Este ORF fue secuenciado en *S. tacrolimicus* y depositado en las bases de datos posteriormente a nuestro trabajo de secuenciación (Mo *et al.*, 2011). Existe una diferencia de secuencia de 1 nt entre nuestra secuencia y la secuencia depositada en las bases de datos, concretamente en el codón de inicio, siendo en nuestra lectura el codón de inicio una Valina (GTG) y en la secuencia depositada en las bases de datos una Metionina (ATG). La secuencia muestra mayor identidad (42 %) y similitud (60 %) con una O-metiltransferasa de *Streptomyces nogalater* (SnogM) implicada en la síntesis de nogalamicina (Torkkell *et al.*, 2001) y presenta un dominio metiltransferasa muy conservado.

3.1.4.3. Genes implicados en la síntesis de la unidad iniciadora

❖ El gen *fkbO* codifica una proteína de 332 aa. Inicialmente fue caracterizada como una C9 hidroxil oxidasa responsable de la oxidación postPKS del C9 del macrólido (Motamedi *et al.*, 1998), recientemente se ha demostrado que dicha oxidación está realmente catalizada por la proteína tipo citocromo P450 oxidorreductasa, FkbD (Chen *et al.* 2013)(ver apartado 3.1.4.5).

La correcta caracterización del gen *fkbO* fue realizada por Andexer *et al.* (2011) coincidiendo con el desarrollo de nuestro trabajo. Dichos autores describieron una nueva familia de enzimas con actividad corismatasa tipificadas por FkbO/RapK. Tanto el gen *fkbO* de la agrupación génica de FK506 en *S. tsukubaensis* como sus homólogos *fkbO* de la agrupación de FK520 en la cepa *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* y *rapK* de la agrupación de rapamicina en *S. hygroscopicus*, codifican una corismato hidrolasa que cataliza la hidrólisis de corismato en piruvato y ácido 4,5 Dihidroxiciclohexa-1,5-dienocarboxílico (DCDC). En un paso posterior de reducción el DCDC dará lugar a ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico (DHCHC), unidad iniciadora de la síntesis de tacrolimus, aunque se desconoce la proteína que cataliza dicha reacción (Andexer *et al.*, 2011) (Figura 3.7).

Recientemente la proteína FkbO ha sido cristalizada, lo que ha permitido caracterizar la estructura y mecanismo catalítico de esta familia de corismatasas. Los análisis estructurales de la proteína muestran tres dominios distintos: dominio N-terminal, dominio central y dominio C-terminal, siendo éste el dominio más conservado entre las distintas corismatasas. El centro activo se sitúa entre el dominio central y el dominio C-terminal (Juneja *et al.*, 2014).

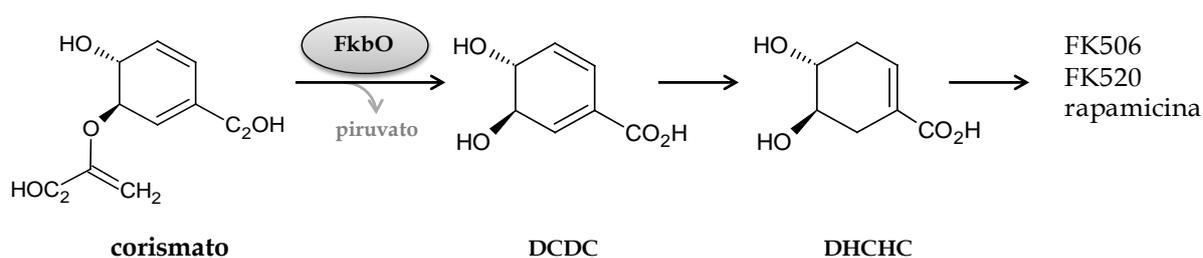


Figura 3.7. Ruta de biosíntesis de la unidad iniciadora DHCHC a partir de corismato. FkbO hidroliza el corismato en piruvato y DCDC. Posteriormente éste se convierte en DHCHC mediante una proteína desconocida hasta el momento. Fuente: Imagen modificada de Andexer *et al.* (2011).

Puesto que FkbO es esencial para la síntesis de la unidad iniciadora DHCHC, se ha propuesto el paso de corismato a DCDC como un punto clave en la síntesis de tacrolimus, pudiendo llegar a constituir un cuello de botella en la biosíntesis del inmunosupresor.

Estudios realizados en *Streptomyces* sp. GT1105 indican que la sobreexpresión de *fkbO* produce un aumento de la producción de tacrolimus del 55 al 65 % (Kim *et al.*, 2013).

Por otro lado, el gen *fkbO* es el objetivo principal para la síntesis de nuevos compuestos análogos a tacrolimus con potencial actividad inmunosupresora. Trabajos recientes muestran nuevos compuestos obtenidos mediante la delección en marco del gen *fkbO* seguido de enriquecimiento del medio de cultivo con posibles precursores que puedan ser incorporados en el módulo de carga de FkbB en lugar de la unidad iniciadora DHCHC. De este modo se han obtenido los análogos 31-demetoxitacrolimus, TC-225 y 32-dehidroxitacrolimus, posibles candidatos a nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas (Ban *et al.*, 2013a; Kim *et al.*, 2013). Del mismo modo se han obtenido análogos de rapamicina mediante delección del gen *rapK* (Kendrew *et al.*, 2013).

3.1.4.4. Genes implicados en la síntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA

Inmediatamente corriente arriba de *fkbG*, nos encontramos una agrupación de 4 genes responsables de la síntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA, denominados en nuestro trabajo *orfL*, *orfL2*, *orfM* y *orfN*, y nombrados posteriormente *allA*, *allK*, *allR* y *allD* (Goranovic *et al.*, 2010) y *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* y *tcsD* (Mo *et al.*, 2011), respectivamente.

La cadena lateral alilo en el C21 de tacrolimus es estructuralmente única entre los policétidos, además de ser esencial para ejercer su actividad biológica. Por ello, recientemente varios grupos han publicado trabajos centrados en la agrupación de los genes de biosíntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA aunque con objetivos diferentes. Por un lado, se ha buscado incrementar la producción de tacrolimus. En este sentido Chen *et al.* (2012) han logrado un aumento de la producción de un 150 % en *S. tsukubaensis* mediante la duplicación de las agrupaciones de genes que dan lugar a la formación de las unidades extendedoras metoximalonil-CoA y alilmalonil-CoA junto con la suplementación optimizada de glucosa. Por otro lado, se han buscado compuestos análogos a tacrolimus con posible actividad biológica. Varios análogos han sido obtenidos por sustitución de la cadena lateral alilo del C21 entre los cuales merece especial mención el 36-metil-FK506 (=FK506D) obtenido mediante enriquecimiento del medio con ácido 4-metilpentanoico (Lechner *et al.*, 2013) y que podría tener importantes aplicaciones industriales ya que presenta mayor actividad inmunosupresora y neuroregenerativa que tacrolimus pero con menor toxicidad (Yoon *et al.*, 2013).

A continuación se muestra los resultados de la secuenciación para la agrupación de genes implicados en la síntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA:

❖ El gen *orfL* (*tscA/allA*) codifica una proteína de 429 aa, presenta la mayor identidad (88%) y similitud (92%) con su homólogo TcsA de *S. kanamyceticus*. Dicha proteína presenta un dominio AT y un dominio ACP. TcsA carga una unidad de malonato que posteriormente será condensada con una unidad de propionil-CoA para dar lugar a ACP- β -ceto-pentanoato (Mo *et al.*, 2011) (Figura 3.12).

❖ El gen *orfL2* (*tscB/allK*) codifica una proteína de 796 aa, presentando la mayor identidad (86%) y similitud (90%) con su homólogo TcsB de *S. kanamyceticus*. Dicha proteína presenta dos dominios β -ceto-acilo sintasas (KS) inusuales, presentando mayor similitud con un sistema PKS del género *Burkholderia*, cuya función no ha sido descrita. Cabe destacar que los análisis filogenéticos muestran que los dominios codificados por *orfL* y *orfL2* (*tscA* y *tscB*) se enmarcan entre las PKS tipo I y tipo II. El dominio AT de OrfL (TcsA) presenta similitud con AT asociadas a PKS tipo I, mientras que el dominio ACP se parece al dominio ACP para la síntesis de ácidos grasos y se sitúa entre las PKS tipo I y tipo II con respecto a los dominios ACP. De igual manera el análisis del fragmento Nt del dominio KS (448 aa) de OrfL2 (TcsB), lo sitúa entre las PKS tipo I y tipo II con respecto a los dominios KS, mientras que el extremo carboxilo terminal del dominio KS (320 aa) está filogenéticamente relacionado con las PKS tipo II (Mo *et al.*, 2011). Por tanto, ésta inusual estructura de dominios sugiere un nuevo tipo de PKS, no pudiendo ser clasificadas en ninguno de los tres tipos más comunes de enzimas PKS caracterizados hasta el momento.

OrfL2 (TcsB) carga la unidad propionil-CoA y cataliza la condensación con la unidad malonato cargada en TcsA (OrfL). Para las siguientes reacciones de cetorreducción y deshidratación del grupo ceto del C β , se ha propuesto a enzimas del hospedador tipo FAS (sintasas de ácidos grasos), ya que TcsB carece de los dominios KR (cetorreductasa) y DH (deshidratasa) (Mo *et al.*, 2011).

❖ El gen *orfM* (*tcsC/allR*) codifica una proteína de 443 aa, presentando mayor identidad (93%) y similitud (97%) con su homólogo TcsC de *S. kanamyceticus*. OrfM presenta una identidad del 60 % y una similitud del 73 % con FkbS, la crotonil-CoA reductasa implicada en la síntesis de FK520. FkbS participa en la ruta de síntesis de la unidad extendedora etilmalonil-CoA, llevando a cabo una carboxilación reductora del enoil-CoA ester (Wu *et al.*, 2000). De manera semejante, TcsC cataliza una reacción carboxilativa reductora para convertir el *trans*-2 pentenoil-ACP en propilmalonil-ACP (Mo *et al.*, 2011). El trabajo realizado por Kosec *et al.* (2012) muestra que la inactivación del gen *allR* (*orfM*) provoca la pérdida completa de producción tanto de tacrolimus como de FK520 en *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Sin embargo, la producción de tacrolimus es recuperada si se añade al medio de cultivo el precursor alilmalonil-S-N-acetilcisteamina. Debido a que la producción de FK520

en fermentaciones de *S. tsukubaensis* alcanza un 20 % de la producción total, aumentando el coste del producto final debido a la necesidad de retirarlo, la inactivación del gen *orfM* permitiría eliminar los compuestos análogos a tacrolimus, conduciendo a la producción exclusiva de tacrolimus y por tanto aumentando el rendimiento de producción.

Sin embargo, los resultados de Mo *et al.* (2011) muestran que la agrupación de genes *tcsABCD* (que presentan una identidad del 100 % con sus homólogos *allAKRD*) está implicada únicamente en la síntesis de tacrolimus y no de ascomicina, de manera que la delección de cualquiera de estos genes implicaría la pérdida total de producción de tacrolimus.

❖ El siguiente paso para la síntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA, lo lleva a cabo **OrfN** (TcsD/AlID). Dicha proteína presenta un tamaño de 386 aa y muestra la mayor identidad (90 %) y similitud (94 %) con su homólogo TcsD de *S. kanamyceticus*. Presenta actividad acil-CoA deshidrogenasa y cataliza la deshidrogenación del propilmalonil-ACP para dar lugar a alilmalonil-ACP, que posteriormente será cargado en el módulo 4 de la PKS de la síntesis de tacrolimus. Alternativamente, otra posibilidad para la síntesis de alilmalonil-CoA consiste en la actuación inicial de TcsD que convierte el 2-pentenil-ACP en 2-4 pentadienil-ACP, el cual mediante una carboxilación reductora, llevada a cabo por TcsC, rinde alilmalonil-ACP (Mo *et al.*, 2011) (Figura 3.12).

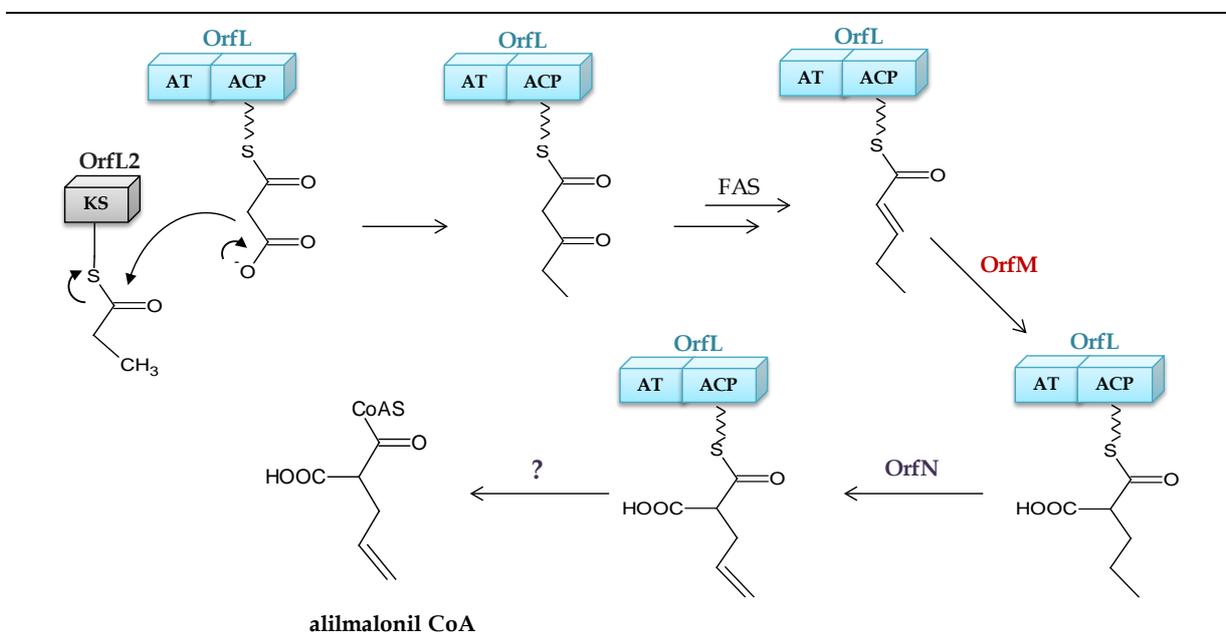


Figura 3.12. Ruta biosintética de la unidad extendedora alilmalonil-CoA. La policétido sintasa codificada por los genes *orfL* y *orfL2* y posiblemente en coordinación con la sintasa de ácidos grasos del hospedador, cataliza la síntesis de *trans*-2-penteacil ACP. Posteriormente, éste es reducido por OrfM para formar propilmalonil ACP que finalmente es convertido a alilmalonil-CoA por medio de OrfN. Fuente: Modificado de Mo *et al.* (2010).

3.1.4.5. Genes implicados en las modificaciones post-PKS: Funcionalización del policétido

Una vez formado el anillo macrolactónico tienen lugar una serie de modificaciones post-PKS que permiten su completa funcionalización. Las reacciones de maduración incluyen una oxidación en el C9 y una O-metilación en el C31 y son realizadas por FkbD y FkbM, respectivamente.

Las reacciones de oxidación y metilación se catalizan de manera paralela e independiente. Los parámetros cinéticos muestran que ambas modificaciones compiten en la ruta de maduración de tacrolimus, presentando FkbD y FkbM una baja especificidad de sustrato (Chen *et al.*, 2013).

❖ El gen *fkbD* codifica una proteína de 388 aa y presenta actividad citocromo P450 oxidoreductasa. FkbD cataliza la oxidación del C9 mediante dos reacciones sucesivas de oxidación. En un primer paso, FkbD introduce un grupo hidroxilo en C9 formándose el producto intermediario 9-hidroxi-31-O-desmetil-FK506 o 9-hidroxi-31-O-desmetil-FK506. Posteriormente este producto intermedio se vuelve a unir al centro activo de FkbD, catalizándose la oxidación del grupo hidroxilo del C9 a grupo ceto y formándose 31-O-desmetil-FK506 (Ban *et al.*, 2013b; Chen *et al.*, 2013; Motamedi *et al.*, 1998) (Figura 3.13).

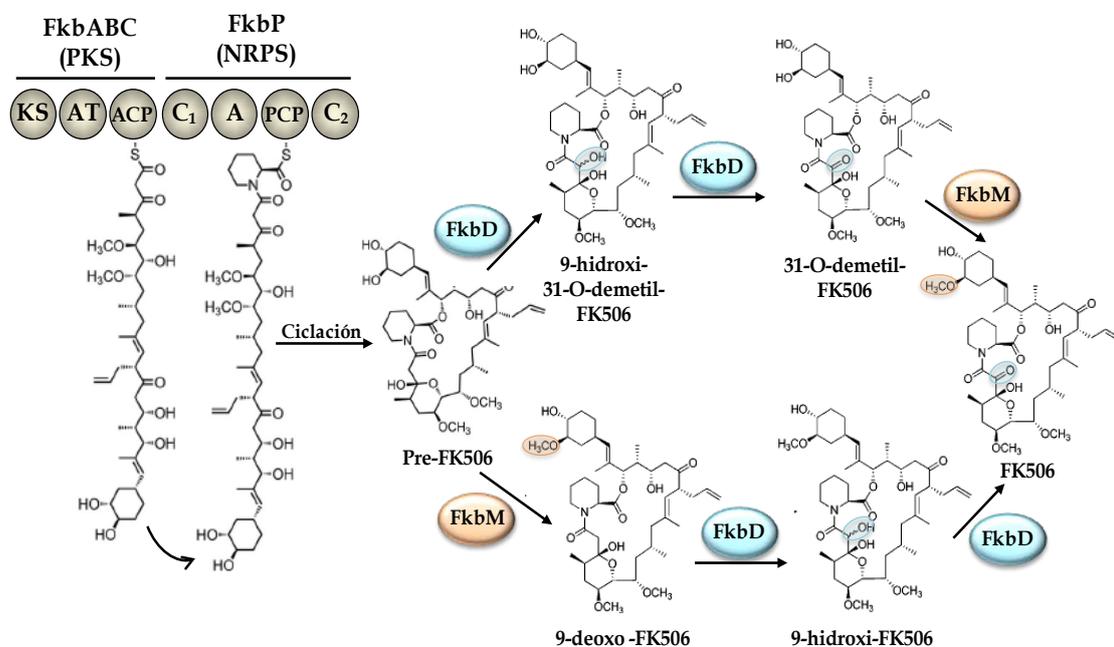


Figura 3.13. Modificaciones post-PKS que permiten la funcionalización de FK506. Las modificaciones post-PKS incluyen la oxidación del C9 y la O-metilación del C31, que son llevadas a cabo por la citocromo P450 hidroxilasa FkbD y por la metiltransferasa FkbM. Existen dos rutas paralelas que permiten la funcionalización de FK506. Fuente: Figura modificada de Ban *et al.* (2013b).

❖ De manera simultánea actúa **FkbM**, una metiltransferasa de 260 aa con actividad 31-O-desmetil-FK506 metiltransferasa dependiente de S-adenosinametonina (SAM) que cataliza la O-metilación del C31. FkbM es incapaz de metilar los carbonos C13 y C15, aunque debido a su baja especificidad de sustrato puede metilar el 31-desmetil-FK520 con la misma eficiencia que su sustrato natural (Chen *et al.*, 2013; Motamedi *et al.*, 1996; Shafiee *et al.*, 1994).

Ambas modificaciones post-PKS son esenciales para que FK506 presente sus propiedades inmunosupresoras al completo, ya que el 31-O-desmetil-FK506 presenta una reducción de unas 10 veces de las propiedades inmunosupresoras y el 9-deoxo 31-O-desmetil-FK506 presenta menor actividad que el anterior (Ban *et al.*, 2013b; Motamedi *et al.*, 1996).

3.1.4.6. Genes reguladores

Uno de los principales objetivos de la secuenciación, era la caracterización de los posibles genes reguladores de ruta para la síntesis de tacrolimus en *S.tacrolimicus*. Como resultado de la secuenciación localizamos 4 posibles reguladores de ruta denominados *fkbN*, *orfD*, *orfX* y *orfW*.

* Inmediatamente corriente abajo de *fkbM*, encontramos a *fkbN*. Dicho gen codifica una proteína de 922 aa que presenta alta similitud de secuencia con reguladores transcripcionales de la familia LAL presentes en las agrupaciones génicas de biosíntesis de policétidos, como son los inmunosupresores FK520, rapamicina y tautomycetina (Hur *et al.*, 2008; Kuscer *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2000); los antitumorales geldanamicina y herbimicina (He *et al.*, 2008; Rascher *et al.*, 2005); el antihelmíntico avermectina (Kitani *et al.*, 2009); y los antibióticos monensina y picromicina (Oliynyk *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2001).

Las comparaciones mediante BLAST muestran alta identidad y similitud con otros reguladores de la biosíntesis de inmunosupresores: 89/92% con *FkbN* de *S. kanamyceticus*, 82/89 % con *FkbN* de *S. tsukubaensis*, 75/83% con *FkbN* de la agrupación génica de FK520 de *S. hygrosopicus* var. *ascomyeticus* y 60/72% con RapH de la agrupación génica de rapamicina de *S. hygrosopicus*.

Los reguladores de la familia LuxR se caracterizan por presentar un tamaño de no más de 250 residuos. Sin embargo, el regulador MatT del regulón de la maltosa de *E. coli* presenta un tamaño de 901 aa, tipificándose la subfamilia de reguladores nombrados con el acrónimo LAL (Large ATP-binding regulators of the LuxR family) (De Schrijver y De Mot, 1999). Además del mayor tamaño, es característica la presencia de un motivo HTH de unión a ADN conservado en el extremo C-terminal y de sitios de unión a ATP en el extremo N-terminal.

La secuencia de aa de *FkbN* presenta ambos dominios altamente conservados: un motivo HTH en el extremo C terminal y motivos WalkerA y WalkerB de unión a nucleósidos

trifosfato en el extremo N-terminal (Walker *et al.*, 1982) (Figura 3.14 A). Estos motivos también se encuentran conservados en otros reguladores de biosíntesis de policétidos de distintas especies de *Streptomyces*, como son FkbN de biosíntesis de FK520, RapH (rapamicina), GdmRI y GdmRII (geldanamicina), AveR (avermectina), PikD (picromicina), TmcN (tautomocetina) y NysRI (nistatina) (Figura 3.14 B).

Aunque en el momento de comenzar este trabajo no se había secuenciado ninguna agrupación génica de tacrolimus, a día de hoy se han secuenciado las agrupaciones de *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, *S. tacrolimicus* y *S. kanamyceticus*, siendo el gen *fkbN* el único regulador común a todas ellas. Recientemente se han caracterizado los reguladores FkbN de *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo *et al.*, 2012) y de *S. tsukubaensis* (Goranovic *et al.*, 2012), actuando en ambas agrupaciones como regulador positivo de la transcripción. Debido a que uno de los objetivos de este trabajo era el estudio de los genes reguladores de ruta, este gen fue posteriormente caracterizado en la agrupación génica de *S. tacrolimicus* (ver apartado 3.3.1.1).

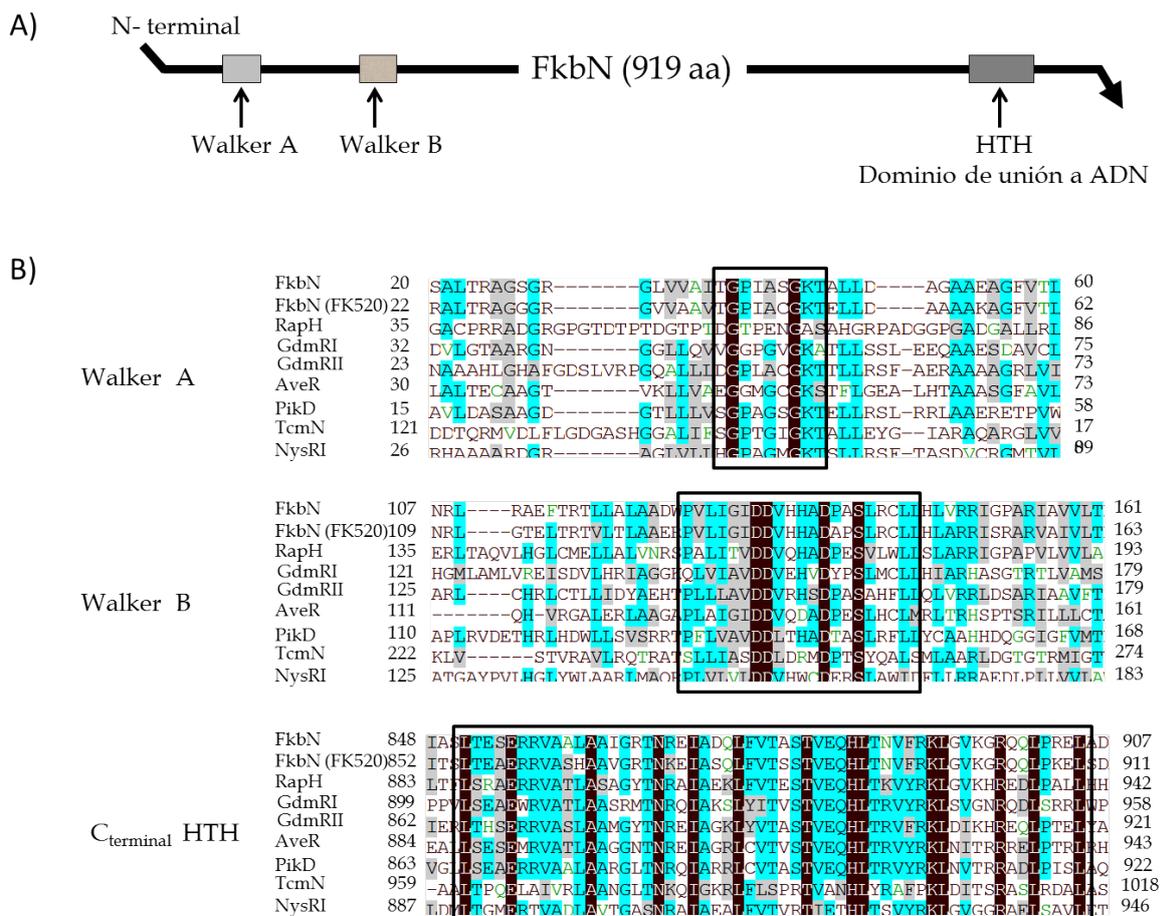


Figura 3.14. A) Esquema de los dominios presentes en la proteína FkbN. B) Alineamiento de la secuencia de aa de dichos dominios con otros reguladores tipo LAL. Los residuos idénticos están sombreados en negro, los similares están sombreados en gris y los conservados se encuentran sombreados en azul.

Corriente abajo del gen *fkfN* localizamos otros dos posibles reguladores de ruta, que denominamos *orfW* y *orfX*.

* El gen *orfW* codifica una proteína de 158 aa. Muestra alta identidad y similitud con reguladores de la familia Rrf2, siendo la más alta (61 %/72 %) con un regulador transcripcional de *Saccharopolyspora erythraea* de función desconocida.

La familia Rrf2 engloba distintos reguladores transcripcionales entre los que se encuentran el regulador de estrés inducido por NO denominado NsrR (*nitrite sensitive repressor*), caracterizado inicialmente en *Nitrosomonas europaea* (Beaumont *et al.*, 2004), el factor de transcripción que regula la agrupación hierro-azufre IscR (*iron sulphur cluster regulator*) caracterizado inicialmente en *E. coli* (Schwartz *et al.*, 2001) y el regulador de hierro RirA de *Rhizobium leguminosarum* (Todd *et al.*, 2002). NsrR interviene en la detoxificación de NO a NO₂ o NO₃, regulando al menos 30 genes incluyendo *hmp*, que codifica una flavohemoglobina detoxificadora de NO. NsrR presenta una agrupación [2Fe-2S] que se nitrosila en presencia de NO, perdiendo la proteína la capacidad de unión a ADN y permitiendo así la transcripción de los genes que regula (Filenko *et al.*, 2007; Tucker *et al.*, 2008).

Por otro lado, IscR interviene en la regulación de la transcripción de los genes de ensamblaje de la agrupación Fe-S (Fe y cisteína) en proteínas de Fe-S y regula tanto el operón principal del sistema de biosíntesis de dichas proteínas, denominado *iscRSUA-hscBA-fdx*, como otros sistemas adicionales, como la agrupación génica *sufABCDSE*, entre otros. IscR contiene una agrupación [2Fe-2S] que puede ser reversiblemente oxidado y reducido. Cuando las proteínas Isc, Hsc y los componentes de la agrupación de Fe-S alcanzan una concentración celular adecuada, el regulador IscR adquiere una agrupación Fe-S, reprimiendo la transcripción del operón *isc* y activando el operon *suf*. Por lo tanto, IscR puede actuar tanto como activador como represor de los operones que regula (Giel *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2001).

Por último, el regulador RirA (*rhizobial iron regulator*) actúa como represor de al menos 8 operones cuya transcripción está mediada por respuesta al hierro y cuyos productos génicos están involucrados en la síntesis o la captación de sideróforos, o en la captación de grupos hemo u otras fuentes de hierro (Todd *et al.*, 2002). Con concentraciones elevadas de hierro el regulador RirA se une a las secuencias operadoras IRO (*iron-responsive operator*) de los promotores de los genes que regula e impide su transcripción (Yeoman *et al.*, 2004).

Aunque no existen características comunes a todos los reguladores de la familia Rrf2 gran parte de sus miembros presentan un dominio de unión a ADN tipo HTH y 3 residuos conservados de cisteína necesarios para llevar a cabo la actividad represora. La presencia de

las cisteínas no está correlacionada con el dominio HTH de unión a ADN. En nuestro caso, vemos que OrfW presenta tanto el dominio de unión HTH como los 3 residuos de cisteína cercanos al extremo C-terminal (Figura 3.15).

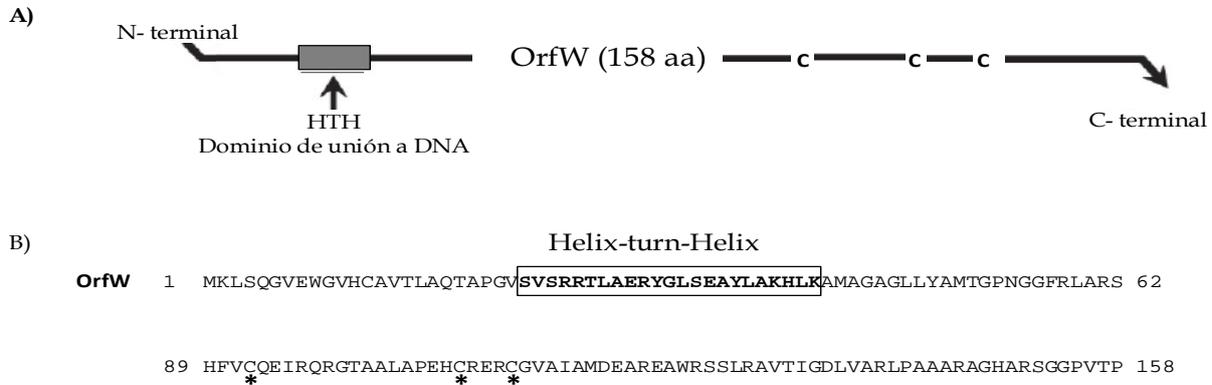


Figura 3.15. A) Esquema del dominio HTH presente en la proteína OrfW junto con los tres residuos de cisteína conservados. B) Secuencia de aa de los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína OrfW. Con un asterisco se señalan las cisteínas conservadas.

Aunque no se ha descrito que los reguladores de la familia Rrf2 actúen como reguladores específicos de la transcripción de metabolitos secundarios, debido a su proximidad a la agrupación OrfW sí podría afectar a su producción. Por ello, procedimos a su interrupción y posterior caracterización (ver apartado 3.3.1.4).

* Inmediatamente corriente abajo del gen *orfW* encontramos otro gen, al que denominamos *orfX*, codificante de una proteína de 340 aa. OrfX presenta la mayor identidad/similitud (84/89%) con un regulador transcripcional de la familia LacI/GalR de *Streptomyces* sp. SPB74. Los miembros de la familia LacI (>1000) presentan un dominio HTH de unión a ADN en el extremo amino terminal y un dominio de unión al ligando situado en el extremo carboxilo terminal, pudiendo unir gran variedad de efectores que normalmente están relacionados metabólicamente con los operones regulados (Weickert y Adhya, 1992).

Aunque la mayoría de sus miembros unen carbohidratos como la D-galactosa (GalR) y la D-fucosa (GalS), β -galactósidos (LacI y EbgR), maltosa (MalI), D-fructosa (FruR y ScrR), D-ribulosa (RbtR) o rafinosa (RafR), también pueden actuar como ligandos nucleósidos como citidina y adenosina (CytR) (Hammer-Jespersen, 1983) e hipoxantina y guanina (PurR) (Rolfes y Zankin, 1990). Debido al carácter represor de estos reguladores, la unión del ligando efector puede tanto reducir (inductor) como incrementar (co-represor) la afinidad de unión al ADN, alterando por tanto los niveles de transcripción de los genes situados corriente abajo. Excepcionalmente, algunos miembros como CcpA (proteína del control catabólico del carbono) actúan tanto como activador como represor (Schumacher *et al.*, 2007).

En cualquier caso, los miembros de esta familia de reguladores están relacionados con el transporte y catabolismo de carbohidratos, aminoácidos y nucleósidos en respuesta a señales ambientales o cambios en las condiciones metabólicas, controlando la expresión de un operón o de una serie de operones relacionados, por lo que en principio, no se esperaría que actuara como regulador específico de ruta de la síntesis de tacrolimus. Sin embargo, debido a la proximidad de este gen a los genes estructurales de la agrupación génica de tacrolimus, procedimos a su interrupción y posterior análisis.

* Por último, y situado en la zona izquierda de la agrupación génica, encontramos el gen *orfD*. El gen *orfD* codifica una proteína de 228 aa, la cual muestra la mayor identidad y similitud (48/64%) con un regulador transcripcional de la familia TetR de *Streptomyces griseus*. Los reguladores de la familia TetR contienen un dominio de unión a ADN conservado tipo HTH en el extremo N-terminal y regulan genes cuyos productos están implicados en la resistencia a drogas, enzimas implicadas en distintas rutas catabólicas, biosíntesis de antibióticos, estrés osmótico o patogenicidad. Las proteínas tipo TetR actúan como dímeros que reconocen una secuencia operadora que presenta simetría de pareja, actuando en su mayoría como represores de la transcripción. La unión de una molécula inductora al dominio no conservado de los miembros de la familia TetR produce un cambio conformacional en el dominio conservado de unión a ADN, liberándose el represor de la zona operadora del promotor que regula, permitiendo el acceso a la ARN polimerasa y produciéndose así la transcripción (Ramos *et al.*, 2005). Sin embargo, existen algunos miembros de la familia TetR que pueden actuar como activadores de la transcripción, aunque el mecanismo por el que media la activación no ha sido descrito (Alatoom *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2008; Pompeani *et al.*, 2008).

Destaca la presencia en la secuencia de *orfD* del codón para la leucina TTA (UUA). El codón para la leucina TTA es el codón más raro en el genoma de los estreptomicetos con alto contenido en CG. Se ha observado que dicho codón no está presente en los genes necesarios para el crecimiento vegetativo, mientras que sí está presente en algunos genes implicados en el metabolismo secundario y el desarrollo morfológico (Leskiw *et al.*, 1991). La mayor parte de los genes que contienen el codón TTA son específicos de especie y son adquiridos por transferencia horizontal. Algunos de los genes que contienen el codón TTA tienen función desconocida aunque se piensa que dichos genes confieren alguna ventaja ecológica. Muchos de los genes con codones TTA y función conocida se encuentran en las agrupaciones génicas de síntesis de metabolitos secundarios y de ellos más de la mitad son reguladores de ruta (Chandra y Chater, 2008; Chater y Chandra, 2008), como el propio *fkbN*.

Por la presencia de un codón TTA en el gen *orfD* y por su proximidad a los genes estructurales de la agrupación génica, consideramos dicho gen como buen candidato a regulador específico de ruta, por lo que procedimos a su posterior caracterización (ver apartado 3.3.1.2).

3.1.4.7. Otros genes

Para obtener la secuencia de la **zona derecha del cluster** secuenciamos el cósmido E completo, detectando 5 ORFs nuevos situados corriente arriba de *fkqQ* denominados *orfV*, *orfW*, *orfX*, *orfY* y *orfZ*. Los genes *orfW* y *orfX* los hemos descrito previamente como posibles reguladores de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus* por su localización cercana a la agrupación génica central.

* El gen *orfV* codifica una proteína de 503 aa, presentando la mayor identidad (58 %) y similitud (68 %) con un transportador “*major facilitator superfamily MFS_1*” de *Streptomyces fulvissimus*. Los transportadores de esta superfamilia se caracterizan por realizar el transporte de pequeños solutos (Martín y Liras, 2010; Pao *et al.*, 1998). Presenta un dominio no específico que engloba toda la proteína y es propio de un sistema efflux. Este gen no parece estar relacionado con la síntesis directa de tacrolimus, aunque podría estar dentro del cluster de biosíntesis, ya que *orfV* presenta una identidad/similitud del 38/54 % con el gen *actIII-ORF2* (SCO5083) de *S. coelicolor* (Malpartida y Hoopwood, 1992), que se encuentra dentro del cluster de la actinorrodina, que puede estar implicado en la secreción de antibióticos.

* Inmediatamente corriente abajo del gen *orfX* se encuentra el gen *orfY*, que codifica una proteína de 723 aa. Muestra la mayor identidad/similitud (84/92 %) con una proteína secretada de *Streptomyces* sp. SPB78. Presenta un dominio de unión a carbohidratos cercano al extremo amino terminal. Dicho gen tampoco parece tener una relación directa con la síntesis de tacrolimus.

* Por último, corriente abajo del gen *orfY* está el gen *orfZ*, parcialmente secuenciado ya que en este punto acaba la secuencia contenida por el cósmido E. Los primeros 339 aa de la proteína presentan mayor identidad (90 %) y similitud (93 %) con una glicosil hidrolasa de *Streptomyces* sp. SPB78.

Con este último gen dimos por finalizada la secuenciación de la zona derecha del cluster ya que no consideramos que los dos últimos genes puedan tener una función evidente en la síntesis de FK506.

En cuanto a la **zona izquierda** de la agrupación génica, detectamos 9 ORFs nuevos denominados *orfA*, *orfB*, *orfC*, *orfD*, *orfE*, *orfF*, *orfG*, *orfL*, *orfL2*, *orfM* y *orfN*.

Los genes *orfL*, *orfL2*, *orfM* y *orfN*, como ya se ha comentado anteriormente, fueron posteriormente caracterizados como los genes responsables de la síntesis de la unidad extendedora alilmalonil-CoA (Goranovic *et al.*, 2010; Mo *et al.*, 2011).

También hemos comentado anteriormente el gen *orfD*, propuesto como posible regulador de ruta de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus en *S.tacrolimicus*, y el gen *orfG*, propuesto como posible sustituto del gen *fkbG*, que codifica una metiltransferasa esencial para la síntesis de la unidad extendedora metilmalonil-CoA y que se encuentra truncado en la cepa.

* Por otro lado, el gen *orfF* codifica una proteína de 443 aa. Muestra una identidad del 36 % y una similitud de 54 % con un citocromo P450 de *Frankia sp.* EAN1pec. Presenta un dominio citocromo P450 que engloba la mayor parte de la proteína. Dicho gen podría formar parte de la agrupación, ya que los citocromos P450 pueden llevar a cabo un gran número de reacciones y son comunes en las agrupaciones de biosíntesis de metabolitos secundarios, aunque desconocemos su función.

* El gen *orfE* codifica una proteína de 277 aa. Presenta una mayor identidad (51 %) y similitud (66 %) con una hipotética proteína de *Streptomyces vitaminophilus*. No presenta ningún dominio conservado. A priori no presenta relación con la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus.

* El gen *orfC* codifica una proteína de 80 aa, presenta la mayor identidad (58 %) y similitud (72 %) con una ferredoxina de *Nocardia brasiliensis*. Produce alineamiento con un gran número de genes que codifican una ferredoxina, la mayoría con función desconocida (Tabla 3.1). Las ferredoxinas son un grupo de proteínas que median la transferencia de electrones en una gran variedad de reacciones metabólicas. Las ferredoxinas bacterianas presentan como centro redox un centro sulfoférico [4Fe-4S] que se une a la cadena polipéptídica mediante uniones covalentes Fe-S a través de 4 residuos conservados de cisteína (Otake y Ooi, 1987) (Figura 3.16 A).

OrfC presenta en su estructura 3 cisteínas conservadas en lugar de 4, al igual que ocurre con sus homólogos RapO implicado en la síntesis de rapamicina (Schwecke *et al.*, 1995), EnrQ para la síntesis de enterocina (Piel *et al.*, 2000), LnmB para la síntesis de leinamicina (Tang *et al.*, 2004) y SlnE para la síntesis de salinomicina (Jiang *et al.*, 2012) (Figura 3.16 B). La pérdida de una cisteína conservada aparece en otras ferredoxinas bacterianas, en cuyo caso la proteína se une a un centro redox de [3Fe-4S], que presenta un ión de hierro menos que el centro más común de tipo [4Fe-4S] (Beinert *et al.*, 1983; George *et al.*, 1985) (Figura 3.16 A).

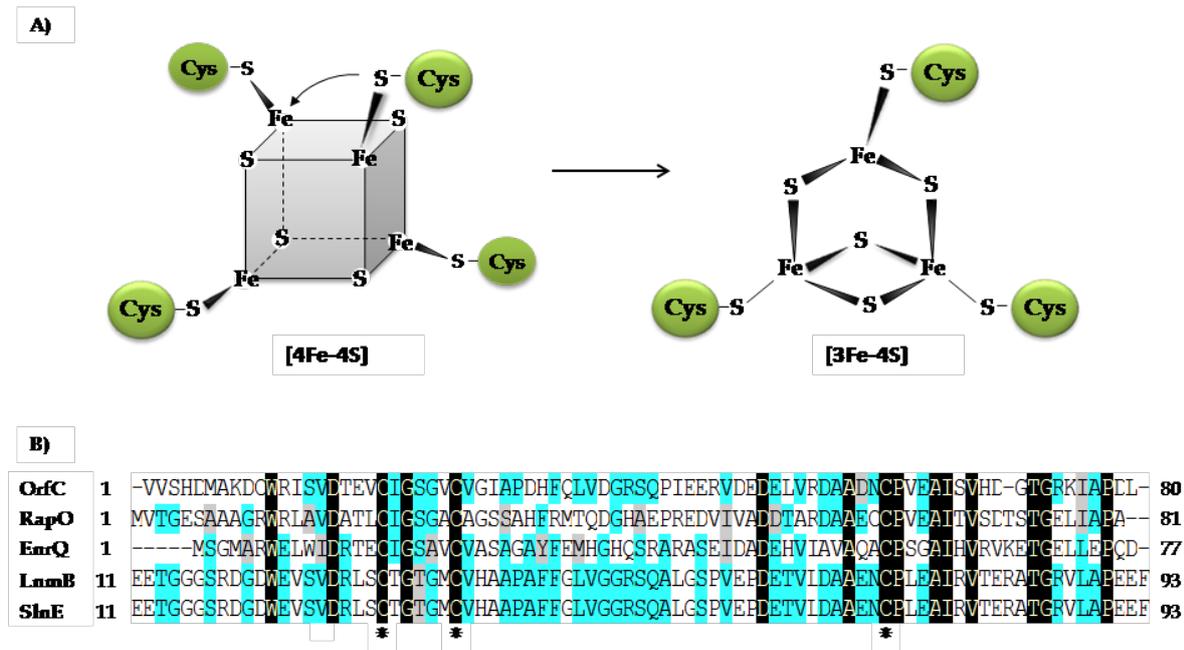


Figura 3.16. A) Estructura de los centros Fe-S de la proteína ferredoxina. La sustitución de un centro [4Fe-4S] por un centro [3Fe-4S] implica la pérdida de un átomo de Fe. La unión a la cadena polipéptica se realiza a través de 3 residuos conservados de cisteína mediante enlaces covalentes Fe-S (Fuente: Modificado de Beinert *et al.*, 1983). **B)** Alineamiento de la secuencia de aa de OrfC con otras ferredoxinas caracterizadas. Con un asterisco se indican los tres residuos de cisteína conservados que median la unión al centro [3Fe-4S]. Los residuos idénticos están sombreados en negro, los similares están sombreados en gris y los conservados se encuentran sombreados en azul.

* El gen *orfB* codifica una proteína de 401 aa. OrfB presenta alineamiento con un gran número de citocromos P450 mostrando la mayor identidad (55 %) y similitud (68 %) con un citocromo P450 codificado por el gen SACE_1426 de *S. erythraea* (Tabla 3.1). Su secuencia presenta los motivos característicos de citocromos P450, incluyendo los dominios conservados de unión al grupo hemo y a oxígeno (Poulos, 1995).

El gran número de genomas bacterianos secuenciados y depositados en los últimos años constituye una importante fuente de información. En el caso de los genes *orfC-orfB* se ha observado que dichos genes presentan la misma organización en distintas especies y cepas bacterianas (Tabla 3.1).

Los citocromos P450 frecuentemente catalizan la hidroxilación de sustratos y en el caso de los citocromos P450 bacterianos de tipo I requieren el acoplamiento con una ferredoxina que transfiere electrones al citocromo P450 desde el NAD(P)H y una ferredoxina reductasa flavin-dependiente que es reducida mediante NAD(P)H formando un operon (Munro *et al.*, 2007). Dicho operón no es encontrado usualmente en agrupaciones biosintéticas de metabolitos secundarios ya que los componentes transportadores de electrones son obtenidos frecuentemente del metabolismo celular (O'Keefe y Harder, 1991). Como excepciones se encuentran las agrupaciones de biosíntesis de: leinamicina, donde el

citocromo P450 LnmA es el responsable de la hidroxilaciones del C4 y C8; salinomicina, donde SlnF hidroxila el C20; enterocina, donde EncR hidroxila el intermediario 5-deoxienterocina, dando lugar a enterocina; y rapamicina, donde RapN es responsable de modificaciones postPKS. En todos los casos el gen codificante del citocromo P450 lleva asociado un gen codificante de ferredoxina, que se transcribe de manera acoplada llegando a solapar unos pocos nucleótidos como es el caso de *orfB-orfC* y *encR-encQ*, lo que permite a la ferredoxina reducir al citocromo P450 completando así su ciclo catalítico. El gen codificante de la ferredoxina reductasa dependiente de NADPH, segunda enzima necesaria para la reoxidación del citocromo P450, no se encuentra en ninguno de los casos en la agrupación génica y es suplido probablemente por enzimas del metabolismo primario. En el caso de la agrupación de saframicina, aunque los genes *sfmO3-sfmK* se encuentran en la agrupación no participan en la biosíntesis del metabolito antitumoral (Li *et al.*, 2009).

Los genes *orfB-orfC*, a pesar de encontrarse en las proximidades de la región izquierda de la agrupación génica de tacrolimus y aunque pudieran estar relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios no parecen participar en la biosíntesis del inmunosupresor. Además no se encuentran homólogos a estos genes en las proximidades de la agrupación de *S. tsukubaensis*.

* El gen *orfA* codifica una proteína de 246 aa. Muestra la mayor identidad (47 %) y similitud (62 %) con una 3-oxoacil-ACP reductasa de *Saccharopolyspora erythraea*. Presenta un dominio deshidrogenasa que engloba toda la proteína. En principio tampoco presenta una relación directa con la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus.

Tabla 3.1. Porcentaje de identidad/similitud entre OrfB y proteínas con función citocromo P450 y entre OrfC y proteínas con función ferredoxina.

	OrfB		OrfC		
Proteína o Función	% identidad / % similitud	Proteína/ Función	% identidad/ % similitud	Especie	Referencia o Fuente
RapN*	46/63 %	RapO	50/61 %	<i>S. rapamycinicus</i> (= <i>S. hygrosopicus</i>)	Baranasic <i>et al.</i> , 2013; Molnar <i>et al.</i> , 1996; Schwecke <i>et al.</i> , 1995
LnmA*	46/65 %	LnmB	48/65 %	<i>S. atroolivaceus</i>	Tang <i>et al.</i> , 2004
EncR*	51/65 %	EncQ	46/62 %	<i>S. maritimus</i>	Piel <i>et al.</i> , 2000
SlnF*	47/64 %	SlnE	53/ 67 %	<i>S. albus</i>	Jiang <i>et al.</i> , 2012
SfmO3*	47/64 %	Sfmk	34/57 %	<i>S. lavendulae</i>	Li <i>et al.</i> , 2009
SACE_1426*	55/68 %	SACE_1427	50/70 %	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Oliynyk <i>et al.</i> , 2007

(*)El gen codificante de la citocromo P450 se transcribe de manera acoplada con un gen codicante de una ferredoxina.

En este punto dimos por finalizada la secuenciación de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus ya que los últimos genes no presentan una relación clara con su síntesis. Además de ello, Mo *et al.* (2011) publicaron con posterioridad a nuestro trabajo la secuencia de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tacrolimicus* y en este trabajo tampoco se observan genes que a priori estén relacionados con la síntesis de tacrolimus hacia la izquierda de *orfA*. Únicamente es destacable la presencia de un gen, codificante de una PKS de función desconocida, situado 6 ORFs hacia la izquierda de *orfA* y que probablemente pertenezca a otra agrupación de metabolitos secundarios, estando los genes intermedios posiblemente relacionados con la biosíntesis de ese metabolito.

3.2. Secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488

Durante el desarrollo de este trabajo, se inició un proyecto en el laboratorio para la secuenciación completa del genoma de *S. tsukubaensis* (Barreiro *et al.*, 2012). Debido a que *S. tsukubaensis* es un productor de tacrolimus y que su agrupación génica de biosíntesis no estaba publicada, procedimos a completar la secuencia de la agrupación.

3.2.1. Organización de la genoteca de cósmidos de *S. tsukubaensis* NRRL 18488

La genoteca de cósmidos de *S. tsukubaensis* fue ordenada de la misma manera que la genoteca de *S. tacrolimicus*, permitiendo de esta manera la identificación de los cósmidos de interés de una manera rápida y eficaz (ver apartado 3.1.1) (Martínez-Castro *et al.*, 2009).

3.2.2. Rastreo de la genoteca de cósmidos de *S. tsukubaensis* NRRL 18488

El rastreo de la genoteca se realizó mediante la técnica de PCR, procediendo de igual manera que para el rastreo de la genoteca de *S. tacrolimicus* (ver apartado 3.1.2).

3.2.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos para el rastreo de la genoteca

Para asegurarnos de cubrir la agrupación génica completa de tacrolimus se realizaron 3 rastreos; zona “derecha”, “izquierda” y “central”, referidas a la representación de la agrupación génica en la Figura 3.27.

Para rastrear la zona derecha se utilizaron los oligonucleótidos denominados fkbM1 y fkbM2, que amplifican un fragmento de 722 pb del gen *fkbM*. Como consecuencia del rastreo detectamos 4 cósmidos positivos denominados 17-A6, 18-C9, 14-F11 y 13-H6. Para comprobar que los cósmidos contenían la zona de interés secuenciamos los extremos de los insertos con los oligonucleótidos universales T3 y T7. Esas secuencias se contrastaron con la secuencia disponible en ese momento del genoma, y se comprobó que los cósmidos 14F11 y 18C9 presentaban una estructura coherente con un tamaño de 41 y 39 kb, respectivamente.

En el caso de la zona central diseñamos una pareja de oligonucleótidos denominada fkbO1 y fkbO2, que amplifica un fragmento de 827 pb correspondiente al gen *fkbO*. Se realizó el rastreo por PCR detectándose 3 cósmidos positivos denominados 3-D8, 16-E9 y 10-H4, de los cuales solamente el cósmido 16-E9, de 35 kb, presentaba una secuencia coherente al analizar los extremos con los cebadores T3 y T7.

Y por último, para la región izquierda de la agrupación diseñamos los oligonucleótidos fkbL1 y fkbL2 que amplifican un fragmento de 695 pb del gen *fkbL*. El rastreo dio como

resultado 4 cósmidos positivos (5-C2, 13-G3, 11-B4, 17-B4), de los cuales el único coherente fue el 5-C2, de 40 kb.

Al igual que ocurría con la genoteca de *S. tacrolimicus*, el alto porcentaje de cósmidos no coherentes puede ser debido a que la zona de estudio incluye las PKS, que son genes con alto contenido de ADN repetido, por lo que pueden haber ocurrido reorganizaciones en la zona.

Posteriormente, en el laboratorio se llevó a cabo la secuenciación de los extremos de los cósmidos de parte de las placas de microtitulación con los clones individuales ordenados. Con los análisis de las secuencias de los extremos de los cósmidos se consiguieron 3 cósmidos nuevos denominados 4-B10, 2-G8, 18-C9, de 37, 36 y 39 kb, respectivamente. Por lo tanto, con el conjunto de los 6 cósmidos conseguimos tener clonada la secuencia de toda la agrupación génica de tacrolimus (Figura 3.17).

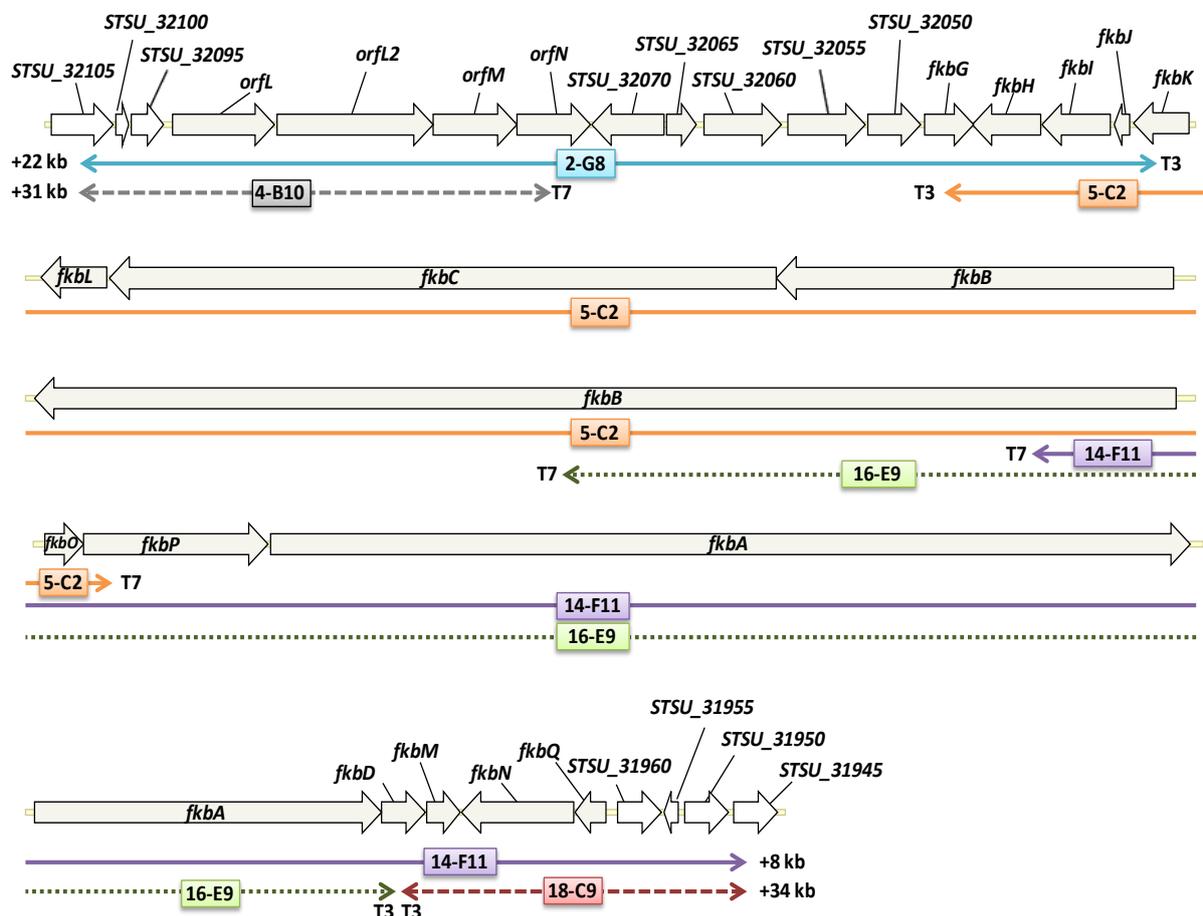


Figura 3.17. Representación esquemática de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis*. Las flechas indican la parte de la secuencia de la agrupación clonada en cada cósmido. Las flechas de trazo continuo corresponden a los cósmidos obtenidos durante el rastreo de la genoteca y las flechas discontinuas corresponden a los cósmidos identificados tras secuenciar los extremos de los cósmidos de las placas individuales de la genoteca.

3.2.3. Secuenciación del genoma de *S. tsukubaensis* NRRL 18488

Se realizó una secuenciación ultrarrápida del genoma de *S. tsukubaensis* utilizando un método de amplificación del ADN por emulsión junto con una secuenciación por síntesis *de novo* utilizando un protocolo de pirosecuenciación optimizado para soporte sólido y en una escala de volumen de picolitros (Margulies *et al.*, 2005).

El ADN genómico fue extraído por el método Kirby (Kieser *et al.*, 2000) a las 60 horas de cultivo, tiempo que se corresponde con la fase estacionaria de crecimiento, evitando de este modo que ciertas regiones del genoma estuvieran más representadas que otras como consecuencia de la replicación del cromosoma. Se llevaron a cabo dos secuenciaciones, una primera en la cual se realizaron dos carreras que proporcionaron una lectura inicial del genoma y una segunda secuenciación de mejor calidad que fue la usada para el ensamblaje final del genoma (Barreiro *et al.*, 2012).

3.2.3.1. Primera secuenciación del genoma

Para la primera secuenciación del genoma se realizó una genoteca de extremos apareados de 3 kpb, que fue leída en un secuenciador 454 GS FLX (Roche).

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas mediante el software Newbler Assembler Software (version 2.3, Roche) (Jarvie y Harkins, 2008). Tras el ensamblaje *de novo* se obtuvieron 243 scaffolds y 5876 contigs que fueron filtrados por tamaños y anotados automáticamente en la plataforma GenDB (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/comics/index.php/gendb>) separando los contigs mediante *linkers* de 12 nucleótidos (CTAGCTAGCTAG), que contienen codones de paro en los 6 marcos de lectura (Meyer *et al.*, 2003). En esta primera secuenciación se llevaron a cabo dos carreras obteniendo 158,8 y 153,4 Mpb respectivamente, lo que supone una cobertura del genoma de 40x.

Esta primera secuenciación del genoma presentaba un gran número de contigs y de huecos de secuencia (gaps), aunque nos sirvió para localizar la agrupación génica de tacrolimus, observando gran cantidad de huecos principalmente en la zona de las PKSs, zonas de ADN altamente repetido. Si la longitud del ADN repetitivo es mayor que el tamaño de las lecturas, los ensambladores no pueden unir estas regiones, ya que solapan con multitud de secuencias, por lo que para secuenciar estas zonas se utilizaron los cósmidos identificados en el rastreo de la genoteca.

3.2.3.2. Segunda secuenciación del genoma

Debido a que tras la primera secuenciación del genoma existían gran número de contigs y de huecos en la secuencias, se llevó a cabo una nueva secuenciación utilizando un nuevo kit de emPCR (PCR de emulsión) y protocolos actualizados para la serie GS FLX

Titanium. Los principales cambios consistieron en la adición de un aditivo denominado “em PCR additive” a la mezcla de emulsión de PCR. Dicho aditivo de composición desconocida, al añadirlo a la mezcla de PCR mejoró la eficiencia de la amplificación y permitió maximizar la calidad de la secuenciación.

Se secuenció únicamente $\frac{1}{4}$ de placa obteniendo 86 Mpb, que corresponde con una cobertura del genoma de 11x, que sumado a las obtenidas en las dos carreras de la primera secuenciación supondría una cobertura final del genoma de 52x. Esta última secuenciación proporcionó una mejora sustancial de los resultados pasando de 5876 contigs de la primera secuenciación a 1399 y de 243 scaffolds a únicamente 14. La nueva secuenciación fue subida y editada en la plataforma GenDB, obteniéndose dos secuencias denominadas *Mapped* y *Unmapped*. Sobre estas secuencias se llevó a cabo un editado manual, uniéndose los scaffolds, obteniendo finalmente un cromosoma lineal de 7,62 Mbp y dos plásmidos denominados pSTS1 y pSTS2, de 24,7 y 31,1 kpb, respectivamente (Barreiro *et al.*, 2012).

3.2.4. Editado manual de la secuencia de la agrupación génica de *tacrolimus*

La primera secuenciación fue editada y subida a la plataforma GenDB, y sobre esa secuencia localizamos la agrupación génica de *tacrolimus*, observando que aparecían gran cantidad de huecos de secuencia. Para poder rellenarlos diseñamos oligonucleótidos específicos utilizando como ADN molde para la secuenciación manual los cósmidos que contenían el fragmento objeto de estudio. Posteriormente, tras la edición de la segunda secuenciación se llevó a cabo un editado manual, que en nuestro caso se correspondió con una secuencia de aproximadamente 1 Mpb que contenía entre otras la agrupación génica de *tacrolimus*. Para completar la secuencia se utilizaron tanto secuencias obtenidas por secuenciación dirigida utilizando los oligonucleótidos diseñados como determinados contigs no localizados de la primera y de la segunda secuenciación.

La agrupación génica de *tacrolimus* presentó inicialmente 28 huecos, para los que se diseñaron 66 oligonucleótidos (ver anexo 6.1.II), nombrados en función de los huecos presentes en cada gen y en función de si amplificaban la cadena codificante o la complementaria. Por ejemplo, *fkbc-21Up* amplifica la cadena codificante (Up), el segundo hueco de secuencia del gen *fkbc* (2) y sería el primer cebador diseñado para secuenciar el hueco (1).

Los genes que presentaban más huecos debido a su tamaño y por presentar secuencias de ADN altamente repetido fueron las PKSs. Concretamente, el gen *fkba* presentó 7 huecos en la primera secuenciación, lo que se corresponde con un total estimado de 5378 pb, *fkbb*

presentó 8 huecos (6672 pb totales) y *fkbc* contenía 5 huecos (5010 pb). También presentaron huecos los genes *orfL* (2237 pb), *orfL2* (463+55 pb), *STSU_32055* (1075+632 pb), *fkbp* (508 pb), *fkbn* (3 pb), *STSU_31960* (17 pb) y *STSU_31955* (706 pb).

En la Tabla 3.2. se muestran los huecos de secuencia presentes en los genes de la agrupación tanto en la primera como en la segunda secuenciación y el modo en que se rellenaron finalmente los huecos.

Tabla 3.2. Genes de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* junto con los huecos de secuencia detectados en las dos secuenciaciones del genoma.

Gen (1)	Tamaño (nt) (2)	Huecos 1ª secuenciación (nt) (3)	Huecos 2ª secuenciación (nt) (3)	Relleno huecos 1º secuenciación (4)	Relleno huecos 2ª secuenciación (4)
<i>STSU_32110</i>	570	-	-		
<i>STSU_32105</i>	639	-	-		
<i>STSU_32100</i>	186	-	-		
<i>STSU_32095</i>	504	-	-		
<i>orfL</i>	1296	2237	-		
<i>orfL2</i>	2433	463 + 55	-		
<i>orfM</i>	1338	-	-		
<i>orfN</i>	1161	-	-		
<i>STSU_32070</i>	1155	-	-		
<i>STSU_32065</i>	468	-	-		
<i>STSU_32060</i>	1230	-	-		
<i>STSU_32055</i>	1188	1075	-		
<i>STSU_32050</i>	753	632	141		2023U/2023L+ C.434/C.435(2ª)
<i>fkbc</i>	669	-	-		
<i>fkbc</i>	1089	-	-		
<i>fkbc</i>	1101	-	-		
<i>fkbc</i>	261	-	-		
<i>fkbc</i>	879	-	-		
<i>fkbc</i>	1038	-	-		
<i>fkbc</i>	10797	986	383		CU11/CL11+ C.5816/C.4803(2ª)
		2699	-		
		335	-		
		31	-	CL41	
		959	-	CL11/U11+ C.4803/C.5816(1ª)	
		(5010)			
<i>fkbc</i>	22977	35	-	BL11	
		1719	-		
		32	-	BL31/BU31	
		1066	-	BL41/BU41+ C.3444/C.3780(1ª)	
			-	BL51+C.1792(1ª)	
		1314	-	BL61+	BL61/BL62+ C.436/C.437+ C.1069/C.1404 (1ª)
		1364	978	C.1404/C.1792/ C.5599(1ª)	
				BL71+C.5869(1ª)	
		1115		BL81	
		27			
		(6672)			

<i>fk bO</i>	993	-	-	
<i>fk bP</i>	4599	508	-	PL1/PU1 +C.4224(1 ^a)+ ExtremoT7 cósmido C2
<i>fk bA</i>	19314	797	-	
		741	-	
		65	-	
		1638	920	AU42/AL42+ C.1076(1 ^a)+C.438(2 ^a)
		357	-	
		1667	389	AL61+C.439/C.1421 (2 ^a)+C.5593/C.5816 (1 ^a)
		113	42	AL71/AU71+ AL72/AU72+ C.439/C.440(2 ^a)
		(5378)	(1360)	
<i>fk bD</i>	1167	-	-	
<i>fk bM</i>	783	-	-	
<i>fk bN</i>	2760	3	-	
<i>fk bQ</i>	780	-	-	
<i>STSU_31960</i>	945	17	-	
Total	83073	22047	2862	
		(28 huecos)	(6 huecos)	

- (1) Nombre del gen de acuerdo al presente trabajo y a la secuencia depositada en DDBJ/EMBL/GenBank, n° de acceso AJSZ00000000.
- (2) Tamaño de los genes.
- (3) Tamaño de los huecos de secuencia encontrados tras el análisis. Entre paréntesis se refleja la suma de los distintos huecos encontrados en un mismo gen. Los huecos a una misma altura indican que los huecos de la 1^a y la 2^a secuenciación solapa.
- (4) Modo de obtención de la secuencia. En el caso de secuenciación con oligonucleótidos se representa con una combinación de letras y números. Por ejemplo, AL71 es la secuencia obtenida con el oligonucleótido *fk bA* L71 para rellenar el hueco 7 del gen *fk bA*. En el caso de utilizar contigs no anotados se representa con el n° de contig y si corresponde a la 1^a o a la 2^a secuenciación. Por ejemplo, C.439 (2^a) indica que se utilizó el contig 439 no mapeado obtenido en la 2^a secuenciación

3.2.5. Análisis informático de la secuencia de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488

Posteriormente a la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tsukubaensis* en nuestro laboratorio, se publicó un trabajo describiendo la agrupación génica de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Goranovic *et al.*, 2010). Un año después, Mo *et al.* (2011) publicaron la secuencia de la agrupación génica de tacrolimus de 3 especies productoras de tacrolimus: *S. tacrolimicus* (objeto de estudio de nuestro trabajo), *Streptomyces* sp. KCTC 1160BP de la Colección de Cultivos Tipo Koreana (KCTC) y *S. kanamyceticus*, caracterizada como productora de tacrolimus (Mo *et al.*, 2011).

La agrupación génica de tacrolimus de las 4 especies de *Streptomyces* presenta un gran número de genes comunes, como son los genes implicados en la síntesis del anillo macrólido

(*fkbA*, *fkbB*, *fkbc*, *fkbl*, *fkbp* y *fkq*), los genes responsables de las modificaciones post-PKS (*fkbd* y *fkbm*), el gen implicado en la síntesis de la unidad iniciadora (*fkbo*), los genes responsables de la síntesis de las unidades extensora metoximalonil-ACP (*fkbk*, *fkbl*, *fkbl*, *fkbl* y *fkbg*) y alilmalonil-CoA (*orfL2*, *orfL*, *orfM* y *orfN*) y el gen regulador *fkbn* (Figura 3.18).

3.2.5.1. Genes nuevos encontrados en la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* NRRL 18488

Tras la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* llevamos a cabo un análisis informático de los genes de la agrupación, prestando mayor interés a los genes nuevos que aparecen en la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* pero que no están presentes en la agrupación de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

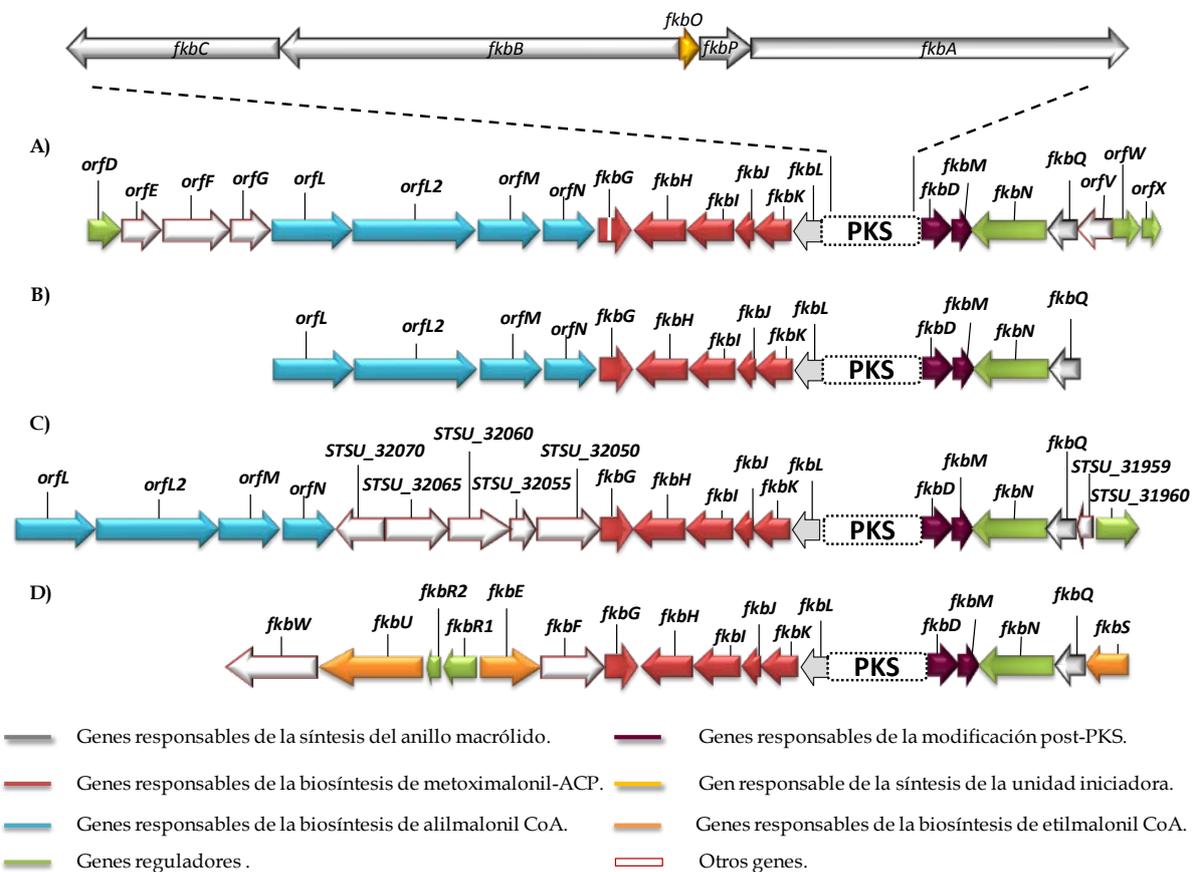


Figura 3.18. Organización génica de la agrupación de biosíntesis de FK506 Y FK520. A) Agrupación génica de biosíntesis de FK506 en *S. tacrolimicus*. La línea vertical en el gen *fkbg* indica que dicho gen se encuentra truncado y disfuncional. B) Agrupación génica de FK506 en *S. kanamyceticus* KCTC9225. C) Agrupación génica de biosíntesis de FK506 en *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP. D) Agrupación génica de biosíntesis de FK520 en *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*. En los genes responsables de la biosíntesis de la unidad extendidora alilmalonil-CoA se ha mantenido la nomenclatura de este trabajo, aunque han sido descritos en *S. tsukubaensis* y *S. kanamyceticus* con otros nombres (ver sección 3.1.4.4). Igualmente se ha mantenido la nomenclatura de los genes depositados en la secuencia de *S. tsukubaensis* para los genes nuevos presentes en las agrupaciones de *S. tsukubaensis* y *S. kanamyceticus*, altamente conservados en ambas especies (ver apartado siguiente).

La agrupación génica de *S. tsukubaensis* presenta 5 genes nuevos respecto a la agrupación de *S. tacrolimicus* localizados entre los genes de biosíntesis de las unidades extendedoras metoximalonil-ACP y alilmalonil-CoA (Figura 3.19). Estos genes son *STSU_32070*, *STSU_32065*, *STSU_32060*, *STSU_32055* y *STSU_32050*, que son los números asignados a estos ORFs en la anotación automática en la secuenciación del genoma. Posteriormente estos genes fueron denominados *allM*, *allN*, *allP*, *allO* y *allS* en *S. tsukubaensis* (Goranovic *et al.*, 2010) y *tcs1*, *tcs2*, *tcs3*, *tcs4* y *tcs5* en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo *et al.*, 2011), respectivamente. También aparecen dos nuevos genes situados a la derecha de la agrupación común a *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP que podría formar parte de la agrupación de tacrolimus.

Debido al interés de los genes nuevos que aparecen en la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* realizamos su análisis informático obteniendo los siguientes resultados:

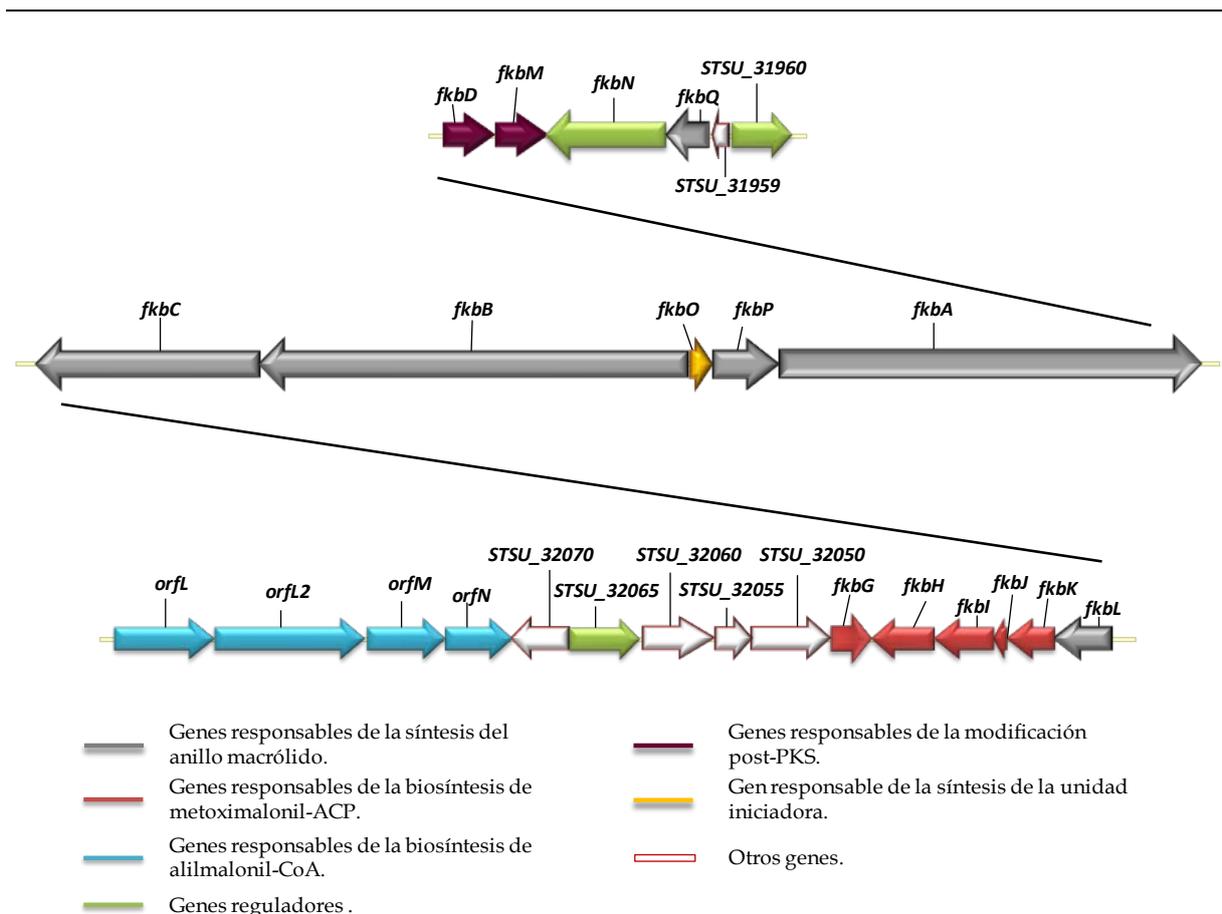


Figura 3.19. Representación esquemática de la agrupación de genes implicados en la biosíntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis*. Los genes denominados con las letras "STSU" son los genes nuevos que aparecen en la agrupación de tacrolimus de *S. tsukubaensis* y que no están presentes en la agrupación de *S. tacrolimicus*.

* El gen *STSU_32070* (*allM, tcs1*), codifica una proteína de 385 aa, presentando la mayor identidad/similitud 67/77 % con una cistationina gamma sintasa de *S. pristinaespiralis*. La cistationina gamma sintasa (CGS) es la primera enzima que actúa en la vía de la transulfuración de L-cistationina y tiene el piridoxal 5'-fosfato (PLP) como grupo prostético. Cataliza una reacción de síntesis a partir de la condensación de L-cisteína y L-homoserina (Aitken y Kirsch, 2005). Por lo tanto, el gen *STSU_32070* participa en la ruta metabólica de aminoácidos y no parece tener una relación directa con la síntesis de tacrolimus. Un derivado de la lisina, el ácido pipercolico, forma parte de la estructura de tacrolimus pero no existe relación con los aa sulfurados.

* El gen *STSU_32065* (*allN, tcs2*) codifica una proteína de 156 aa, presentando la mayor identidad/similitud (54/66 %) con un regulador transcripcional de la familia AscN de *S. violaceusniger*. Esta familia de reguladores es exclusiva de procariontas y presenta un tamaño pequeño, en torno a 15 kDa. Presentan un dominio de unión a ADN de tipo HTH en el extremo N-terminal y un dominio de unión al efector en el extremo C-terminal y generalmente ejercen la regulación mediante unión a moléculas efectoras aminoacídicas. Esta familia está tipificada por el regulador AsnC de *E.coli* (Brinkman *et al.*, 2003). AsnC actúa como activador de la transcripción del gen *asnA*, que codifica una asparragina sintetasa, y como regulador negativo a nivel post-transcripcional del gen *gidA* (glucose inhibited division protein A), gen de división inhibido por glucosa y que ejerce su autorregulación (Kölling *et al.*, 1985; 1988). Dos trabajos recientes muestran que el gen *STSU_32065* no está implicado en la regulación de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, ya que su inactivación mediante delección en marco no afecta a la producción de tacrolimus en los mutantes (Goranovic *et al.*, 2012, Mo *et al.*, 2012).

* El gen *STSU_32060* (*allP, tcs3*) codifica una proteína de 410 aa con la mayor identidad/similitud (61/75 %) con un citocromo P450 de *S. peuceetius*. Los citocromo P450 (CYP) constituyen una superfamilia de genes ampliamente distribuidos, estando presentes desde bacterias, arqueas y virus hasta plantas superiores y animales. Son un grupo de hemoproteínas que participan en la degradación de xenobióticos, compuestos endógenos y metabolitos secundarios mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, entre otras (González y Korzekwa, 1995). Debido a la versatilidad funcional de los CYP, el gen *STSU_32060* podría formar parte de la agrupación génica de tacrolimus, aunque es difícil predecir la función que podría desempeñar.

* El gen *STSU_32055* (*allO, tcs4*) codifica una proteína de 396 aa, que muestra la mayor identidad/similitud (42/56 %) con una oxidorreductasa de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis*. Presenta un dominio acil-CoA deshidrogenasa en el extremo C terminal.

* Y por último el gen *STSU_32050* (*allS*, *tcs5*) codifica una proteína de 251 aa mostrando la mayor identidad/similitud (54/64 %) con una 3-oxoacil ACP reductasa de *Patulibacter* sp. I11.

Los genes *STSU_32070*, *STSU_32065*, *STSU_32060*, *STSU_32055* y *STSU_32050* inicialmente fueron relacionados con la formación de la unidad extendedora alilmalonil-CoA, de donde reciben los nombres *allM*, *allN*, *allP*, *allO* y *allS* (Goranovic *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios posteriores parecen indicar que esta agrupación de genes no tiene ningún papel en la producción de tacrolimus (Mo *et al.*, 2011; 2012). Si tenemos en cuenta que recientemente se ha caracterizado la agrupación génica de tacrolimus en *S. kanamyceticus* (Mo *et al.*, 2011) y que dicha agrupación tampoco contiene el set de genes mencionado anteriormente, todo parece indicar que dichos genes no son esenciales ni tienen una relación directa en la producción de tacrolimus.

Además de los genes mencionados anteriormente, en *S. tsukubaensis* aparecen dos nuevos genes situados a la derecha de la agrupación:

* El gen *STSU_31959*, denominado posteriormente *tcs6* (Mo *et al.*, 2011) codifica una proteína de 69 aa y muestra una mayor identidad (46 %) y similitud (51 %) con una hipotética proteína de *Flavobacterium* sp. URHB0058. A priori no presenta relación con la síntesis de tacrolimus.

* El gen *STSU_31960*, denominado posteriormente *tcs7* (Mo *et al.*, 2011) y *fkfR* (Goranovic *et al.*, 2012) codifica una proteína de 315 aa y muestra alta similitud de secuencia con miembros de la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs), siendo la mayor identidad/similitud (77/85 %) la presentada con un regulador transcripcional de *S. clavuligerus* ATCC27064, productor de cafamicina y ácido clavulánico. Los LTTRs caracterizados regulan un amplio número de unidades transcripcionales en respuesta a una gran variedad de señales ambientales. En *E. coli* regulan la utilización de la fuente de nitrógeno, la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos y la respuesta al estrés oxidativo y la detoxificación celular (Schell, 1993). Los miembros de esta familia presentan un dominio de unión a ADN tipo HTH en el extremo C-terminal y suelen actuar como activadores de la transcripción (Henikoff *et al.*, 1988). El gen *STSU_31960* (*fkfR*) ha sido caracterizado recientemente como regulador positivo de la síntesis de tacrolimus, ya que la producción de tacrolimus se reduce un 20% en el mutante Δ *fkfR* frente a la cepa silvestre (Goranovic *et al.*, 2012). Sin embargo, la inactivación del gen *tcs7* (idéntico a *fkfR*) en la agrupación génica de tacrolimus en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP produce un incremento de 1,9 veces en los niveles de producción de tacrolimus con respecto a la cepa silvestre, lo que le convierte en un regulador negativo de la biosíntesis de tacrolimus (Mo *et al.*, 2012).

3.2.6. Comparativa de las agrupaciones génicas de tacrolimus entre especies productoras del inmunosupresor

Tras la secuenciación de las agrupaciones génicas de tacrolimus en *S. tacrolimicus* y *S. tsukubaensis* y puesto que durante el desarrollo de este trabajo se depositaron las agrupaciones génicas de tacrolimus de otras dos especies productoras, *S. kanamyceticus* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo *et al.*, 2011), llevamos a cabo un análisis comparativo de los genes de las 4 agrupaciones de biosíntesis de tacrolimus entre sí y con los genes homólogos de la agrupación génica de FK520, compuesto relacionado estructuralmente con tacrolimus y cuya agrupación comparte los mismos genes biosintéticos (Figura 3.18).

3.2.6.1. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de biosíntesis de tacrolimus entre *S. tsukubaensis* y las distintas especies productoras de tacrolimus y FK520

Al realizar el análisis informático de los genes de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* y compararlos frente a sus genes homólogos para la producción de tacrolimus con el resto de especies productoras de tacrolimus publicadas hasta el momento, se observa que todos los genes de *S. tsukubaensis* estudiados presentan una identidad del 100 % con la especie *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP. Sin embargo, y a pesar de la total identidad de los genes de biosíntesis de tacrolimus entre las dos cepas, éstas presentan diferencias significativas en cuanto al comportamiento del gen regulador *fkfR* (*tcs7*), lo que puede ser explicado por estar sometidos a una diferente regulación por otros reguladores o factores sigma (Goranovic *et al.*, 2012, Mo *et al.*, 2012).

También existen diferencias significativas en las rutas del metabolismo primario, como es el caso de la biosíntesis de la unidad extendidora alilmalonil-CoA, ya que los homólogos *allR* y *tcsC*, codificantes de una crotonil-CoA carboxilasa/reductasa, presentan diferencias de especificidad de sustrato. En *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, TcsC está implicada exclusivamente en la síntesis de alilmalonil CoA mientras que AllR de *S. tsukubaensis* participa en la biosíntesis de las unidades extendedoras alilmalonil-CoA y etilmalonil-CoA y por lo tanto interviene tanto en la producción de tacrolimus como de FK520 (Mo *et al.*, 2011; Kosec *et al.*, 2012).

En cuanto a la comparativa de los genes de biosíntesis de tacrolimus de *S. tsukubaensis* con el resto de productores de tacrolimus, se observa una identidad superior al 80% en la mayoría de los casos, siendo dicha identidad similar a la que presenta con sus genes homólogos para la síntesis de FK520, estando los genes de biosíntesis de tacrolimus y FK520 altamente conservados en identidad y organización. Destaca la presencia de 5 genes en la

agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (STSU_32070, STSU_32065, STSU_32060, STSU_32055 y STSU_32050) que se encuentran entre las agrupaciones de genes de síntesis de las unidades extendedoras alilmalonil-CoA y metoximalonil-CoA pero que no están presentes en las otras dos especies (*S. tacrolimicus* y *S. kanamyceticus*), lo que parece indicar que el grupo de cinco genes se insertó en la agrupación génica de tacrolimus en *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP a lo largo de la evolución, no estando dichos genes relacionados con la producción de tacrolimus según lo publicado en trabajos recientes (Goranovic *et al.*, 2012, Mo *et al.*, 2012). En cuanto a los genes reguladores, el gen *fkfN*, altamente conservado (identidad $\geq 80\%$), es el único gen que está presente en todas las agrupaciones (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Función de las proteínas implicadas en la síntesis de tacrolimus y porcentaje de identidad/similitud entre las distintas proteínas comunes a las agrupaciones génicas de tacrolimus entre *S. tsukubaensis* y *S. tacrolimicus*, *S. kanamyceticus* y *S. hygroscopicus* var *ascomyceticus*, productor del análogo estructural FK520.

Proteína	<i>S. tsukubaensis</i> vs <i>S. tacrolimicus</i>	<i>S. tsukubaensis</i> vs <i>S. kanamyceticus</i>	<i>S. tsukubaensis</i> vs <i>S.</i> <i>hygroscopicus</i> var. <i>ascomyceticus</i> (FK520)	Función proteína
	(%identidad/%similitud)	(%identidad/%similitud)	(%identidad/%similitud)	
FkbA	84/89 %	86/90 %	83/88 %	PKS: módulos 7-10
FkbB	82/87 %	84/89 %	79/86 %	PKS: módulos 1-4
FkbC	78/84 %	82/87 %	78/84 %	PKS: módulos 5-6
FkbL	82/89 %	90/95 %	87/93 %	lisina ciclodesaminasa
FkbK	86/90 %	88/90 %	84/89 %	acil-CoA deshidrogenasa
FkbJ	79/88 %	84/89 %	73/85 %	transportador de grupos acilo
FkbI	86/90 %	87/92 %	85/91 %	acil CoA deshidrogenasa
FkbH	87/91 %	84 %	80/86 %	gliceriltransferasa
FkbG	85/87+87/91 % (41 + 99 aa) (1)	89/93 %	82/86 %	O-metil transferasa
STSU_32050	-	-	-	3 oxoacil ACP reductasa
STSU_32055	-	-	-	acetoacetyl-CoA reductasa
STSU_32060	-	-	-	citocromo P450
STSU_32065	-	-	-	regulador familia AsnC
STSU_32070	-	-	-	cistationina gamma síntasas
OrfN	86/93 %	87/93 %	-	acil-CoA deshidrogenasa
OrfM	88/94 %	91/94 %	-	crotonil-CoA reductasa
OrfL2	77/84 %	79/84 %	-	PKS: 2 dominios β - ceto acil sintasa

OrfL	78/86 %	80/87 %	-	PKS:AT+ACP
FkbO	86/90 %	86/91 %	81/86 %	Corismato oxidasa
FkbP	83/87 %	83/87 %	80/85 %	FK506 péptido sintetasa
FkbD	88/91 %	89/93 %	89/93 %	C9 hidroxilasa
FkbM	85/92 %	83/91 %	83/89 %	31-O-metiltransferasa
FkbN	82/89 %	82/ 90%	78/84 %	regulador familia LAL
FkbQ	85/92 %	84/91 %	84/89 %	tioesterasa II
STSU_31959	-	-	-	Hipotética protein
STSU_31960	-	-	-	regulador familia LysR

(1) Se indican los porcentajes de identidad/similitud de los dos fragmentos presentes, al tratarse de un gen truncado

3.2.6.2. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de biosíntesis de tacrolimus entre *S. tacrolimicus* y las secuencias de proteínas de distintas especies productoras de tacrolimus y FK520

Las proteínas de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* presentan una mayor similitud con sus homólogos para la síntesis de tacrolimus de *S. kanamyceticus*, siendo en todos los casos cercana o superior al 90 %. Los respectivos homólogos para la síntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis* y FK520 en *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* presentan una similitud de secuencia cercana o superior al 80%. Por tanto, los genes de biosíntesis de tacrolimus y FK520 están bastante conservados entre las distintas especies productoras caracterizadas hasta el momento (Tabla 3.4).

Debido a la alta similitud de secuencia entre los genes de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* y *S. kanamyceticus* y puesto que el grupo de Mo *et al.*, (2011) depositó la secuencia tanto de la agrupación génica de tacrolimus como la de los genes adyacentes, procedimos a hacer un análisis informático del entorno con el fin de encontrar algún gen coincidente. Dicho análisis mostró varios genes reguladores en las inmediaciones de la agrupación. En la zona izquierda de la agrupación de *S. kanamyceticus* destaca la presencia de un gen que codifica un regulador de la familia TetR, presentando una identidad del 20 % con el regulador OrfD de *S. tacrolimicus* y un gen que codifica un regulador de la familia LysR, el cual presenta una identidad de 17 % con el gen regulador FkbR/Tsc7 de *S. tsukubaensis*. En la zona derecha se encuentra igualmente un gen que codifica un regulador de tipo TetR, presentando una identidad del 18 % con OrfD de *S. tacrolimicus*. Debido a la no coincidencia de genes o la baja identidad entre los genes presentes en las inmediaciones de la

agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* con el resto de especies productoras podemos concluir que no hay nuevos genes comunes a las distintas agrupaciones.

Tabla 3.4. Función de las proteínas implicadas en la síntesis de tacrolimus y porcentaje de identidad/similitud entre las distintas proteínas comunes a las agrupaciones génicas de tacrolimus entre *S. tacrolimicus* y *S. tsukubaensis*, *S. kanamyceticus* y *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus*, productor del análogo estructural FK520.

Proteína	<i>S. tacrolimicus</i> vs <i>S. tsukubaensis</i>	<i>S. tacrolimicus</i> vs <i>S.</i> <i>kanamyceticus</i>	<i>S. tacrolimicus</i> vs <i>S. hygrosopicus</i> var. <i>ascomyceticus</i> (FK520)	Función proteína
	(%identidad/%similitud)	(%identidad/%similitud)	(%identidad/%similitud)	
FkbA	84/89 %	93/94 %	83/85 %	PKS: módulos 7-10
FkbB	82/87 %	93/95 %	81/86 %	PKS: módulos 1-4
FkbC	78/84 %	95/97 %	83/89 %	PKS: módulos 5-6
FkbL	82/89 %	87/93 %	84/90 %	lisina ciclodessaminasa
FkbK	86/90 %	92/95 %	87/92 %	acil-CoA deshidrogenasa
FkbJ	79/88 %	88/92 %	75/83 %	Transportador de grupos acilo
FkbI	86/90 %	93/95 %	91/94 %	acil-CoA deshidrogenasa
FkbH	87/91 %	91/95 %	84/89 %	Gliceril transferasa
FkbG	85/87+87/91 % (41 + 99 aa) (1)	88/93+93/97 % (41 + 99 aa) (1)	88/90+90/95 % (41 + 99 aa) (1)	O-metil transferasa
OrfN	86/93 %	90/94 %	-	acil-CoA deshidrogenasa
OrfM	88/94 %	93/97 %	-	crotonil-CoA reductasa
OrfL2	77/84 %	86/90 %	-	PKS: 2 dominios β - ceto acil sintasa
OrfL	78/86 %	88/92 %	-	PKS:AT+ACP
FkbO	86/90 %	96/98 %	84/90 %	Corismato oxidasa
FkbP	83/87 %	95/96 %	84/88 %	FK506 péptido sintetasa
FkbD	88/91 %	88/92 %	89/94 %	C9 hidroxilasa
FkbM	85/92 %	90/94 %	83/81 %	31-O-metiltransferasa
FkbN	82/89 %	89/92 %	75/83 %	regulador familia LAL
FkbQ	85/92 %	88/95 %	85/90 %	tioesterasa II

(1) Se indican los porcentajes de identidad/similitud de los dos fragmentos presentes, al tratarse de un gen truncado.

3.3. Optimización de la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*

Como paso previo al análisis funcional de los genes reguladores de ruta y debido a la baja producción de tacrolimus por *S. tacrolimicus* (lo que dificulta medir su producción en la cepa silvestre) fue necesario optimizar un método de extracción que nos proporcione una mayor concentración de tacrolimus para su posterior cuantificación.

3.3.1. Optimización del método de extracción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

Inicialmente, la extracción de tacrolimus se hizo a partir de 1 ml de sobrenadante de caldo de cultivo utilizando como solventes metanol o acetato de etilo grado HPLC. A continuación, se tomaban 100 μ l del sobrenadante de la extracción y se cuantificaba la producción mediante bioensayo (ver apartado 2.16.2) utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* TB23, que es sensible a tacrolimus (Arndt *et al.*, 1999; Breuder *et al.*, 1994). Debido a que con este método no se observaban halos de inhibición en los bioensayos, era necesario modificar las condiciones de la extracción, por lo que probamos a extraer tacrolimus de una mayor cantidad de caldo de cultivo. Partiendo de 5 ml se realizaron dos extracciones consecutivas con acetato de etilo. Se juntaron ambas extracciones y se llevaron a evaporación completa en un rotavapor. Posteriormente se resuspendió la muestra en 100 μ l de metanol:agua mQ (1:1, v:v) y se cuantificó mediante bioensayo. En este caso sí se obtuvieron pequeños halos de inhibición, lo que indica que la no observación previa podía ser debida a que *S. tacrolimicus* produce tan solo pequeñas cantidades de tacrolimus, indetectables si se parte de poco volumen de caldo de cultivo para hacer la extracción. A pesar de todo, era necesario desarrollar un método de extracción donde conseguir una concentración de producto final más alta, por lo que se procedió a la optimización del proceso de extracción de tacrolimus a partir de cultivo en medio sólido para *S. tacrolimicus*.

* Cultivo en medio sólido

El cultivo en superficie en medio sólido se fundamenta en el crecimiento del microorganismo objeto de estudio sobre una matriz sólida en ausencia de agua libre. De este modo se simulan las condiciones de crecimiento del hábitat natural de los microorganismos de una manera más próxima frente a las fermentaciones sumergidas, lo cual es aplicable al género *Streptomyces*, ya que aunque han colonizado hábitats como el agua dulce y marina (Weyland, 1969; Cross, 1981) su hábitat natural es el suelo (Flaig y Kutzner, 1960). La extracción de compuestos a partir de cultivos en medio sólido ofrece grandes ventajas como son la obtención de una mayor productividad durante la fermentación, una mayor

estabilidad del producto final, menor represión catabólica, mayor concentración del producto final y un menor grado de contaminaciones, sobre todo de bacterias y levaduras, debido a la baja actividad de agua (Singhania *et al.*, 2009; Holker *et al.*, 2004). Este último punto, además del de la obtención de una mayor concentración de producto final, fue uno de los aspectos por los que optamos por la utilización de cultivo en medio sólido, ya que el crecimiento de *S. tacrolimicus* en medio líquido presentaba grandes problemas de contaminación.

3.3.2. Optimización de la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* mediante su cultivo en medio sólido.

Para iniciar los cultivos en medio sólido se partió de un preinóculo crecido en 50 ml de medio BASAm (ver apartado 2.2.2.) en matraces indentados de 500 ml, el cual había sido inoculado a su vez con una suspensión de 100 μ l de esporas a una concentración final de 10^7 UFC/ml. El cultivo se incubó durante 48 horas a 28 °C y 220 rpm.

En un principio se conservó el preinóculo en viales con glicerol 20% con el objeto de estandarizar al máximo el inóculo utilizado para todas las fermentaciones. Sin embargo, posteriormente se observó que el glicerol, y fundamentalmente la congelación, afectaba a la producción de tacrolimus, por lo que finalmente se decidió partir de un preinóculo fresco crecido en BASAm, a 28°C y 220 rpm durante 36 horas para iniciar las fermentaciones en medio sólido.

Los cultivos se realizaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 30 ml de medio FKAm sembrado con 1 ml de preinóculo por placa. Las placas se incubaron en una estufa a 28°C durante 10 días, realizando la extracción de tacrolimus cada 24 h a partir de las 72 h, ya que antes no se observa suficiente crecimiento. La mayor concentración de tacrolimus se observó al séptimo día (datos no mostrados), tiempo seleccionado para hacer las extracciones en estudios posteriores. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, sembrando 24 placas por condición, utilizando 8 placas para cada extracción (3 extracciones).

Durante los ensayos de cultivo en medio FKAm observamos igualmente que la producción de tacrolimus era dependiente del tipo de almidón utilizado en su preparación. Se realizaron pruebas con almidón de las casas comerciales Scharlau y Difco (BD), observando mayor producción al utilizar el almidón de Difco. Además, éste presentaba mayor solubilidad, por lo que finalmente fue el almidón de elección para las fermentaciones.

Al mismo tiempo que se realizaba la optimización del medio de producción, era necesario optimizar el método de extracción. En primer lugar era necesario determinar

dónde se acumulaba el tacrolimus. Para ello se colocó un disco de celofán fino sobre el medio sólido, el cual permite el crecimiento de *S. tacrolimicus* sobre éste al dejar pasar tanto las hifas como los nutrientes a través de él. Para determinar si el tacrolimus se liberaba al medio o si por el contrario se acumulaba intracelularmente, se recogió por un lado el micelio aéreo y por otro el micelio sustrato con el medio, se realizó la extracción con acetato de etilo y se determinó la producción mediante bioensayo. Observamos halo mayormente en la extracción realizada a partir del micelio aéreo, lo que indica que el tacrolimus se acumula principalmente a nivel intracelular o unido a las células y apenas se libera al medio. Por lo tanto, se decidió fijar como parte del protocolo el colocar un disco de celofán sobre el agar para facilitar la extracción.

El protocolo finalmente utilizado para la determinación de la producción fue el siguiente:

Tras 7 días de crecimiento en medio sólido FKAm se recogió el micelio aéreo crecido sobre el disco de celofán y se realizaron dos extracciones con acetato de etilo, juntando ambas extracciones. Posteriormente se procedió a la concentración de la muestra en un rotavapor (Büchi® R-20). Una vez evaporado el disolvente, la muestra se resuspendió en 150 µl de metanol: agua mQ (1:1, v:v), y se utilizó tanto para la realización del bioensayo como para la cuantificación de tacrolimus mediante HPLC (Salehi-Najafabadi *et al.*, 2011). El micelio precipitado y ya libre de sobrenadante se llevó a una estufa a 80 °C para su secado y posterior cuantificación de peso seco tras 48 h de secado. Inicialmente se realizaron varias pruebas para determinar a qué tiempo el micelio estaba completamente libre del solvente utilizado para la extracción, escogiéndose las 48 h por ser el tiempo a partir del cual el peso seco del micelio se mantenía constante. El protocolo se resume en la Figura 3.20.

3.3.3. Análisis de la producción de tacrolimus mediante Bioensayo

El análisis de la producción de tacrolimus se realizó mediante la técnica de bioensayo utilizando como organismo sensible a tacrolimus la cepa *Saccharomyces cerevisiae* TB23 (Arndt *et al.*, 1999; Breuder *et al.*, 1994).

Tras la observación de que el gen *fkbG*, teóricamente esencial para la producción de tacrolimus, se encontraba truncado en *S. tacrolimicus*, haciendo que la proteína no fuera funcional (ver apartado 3.1.4.3), surgieron dudas sobre la producción real de tacrolimus por dicha especie. Debido a que el bioensayo se realiza habitualmente con una mezcla total de todos los metabolitos producidos por *S. tacrolimicus* extraídos con acetato de etilo, no se podía determinar si el halo observado se debía al tacrolimus o a algún otro compuesto antifúngico presente en la mezcla de extracción. Por ello, y para determinar los compuestos

responsables del halo de inhibición, se analizó mediante HPLC preparativo una muestra concentrada extraída con acetato de etilo, recogiendo en viales las fracciones eluidas en cada minuto de la carrera de HPLC (Figura 3.21 A). Posteriormente se evaporaron las fracciones de elución y se resuspendieron en 100 μ l de metanol: agua mQ (1:1, v:v).

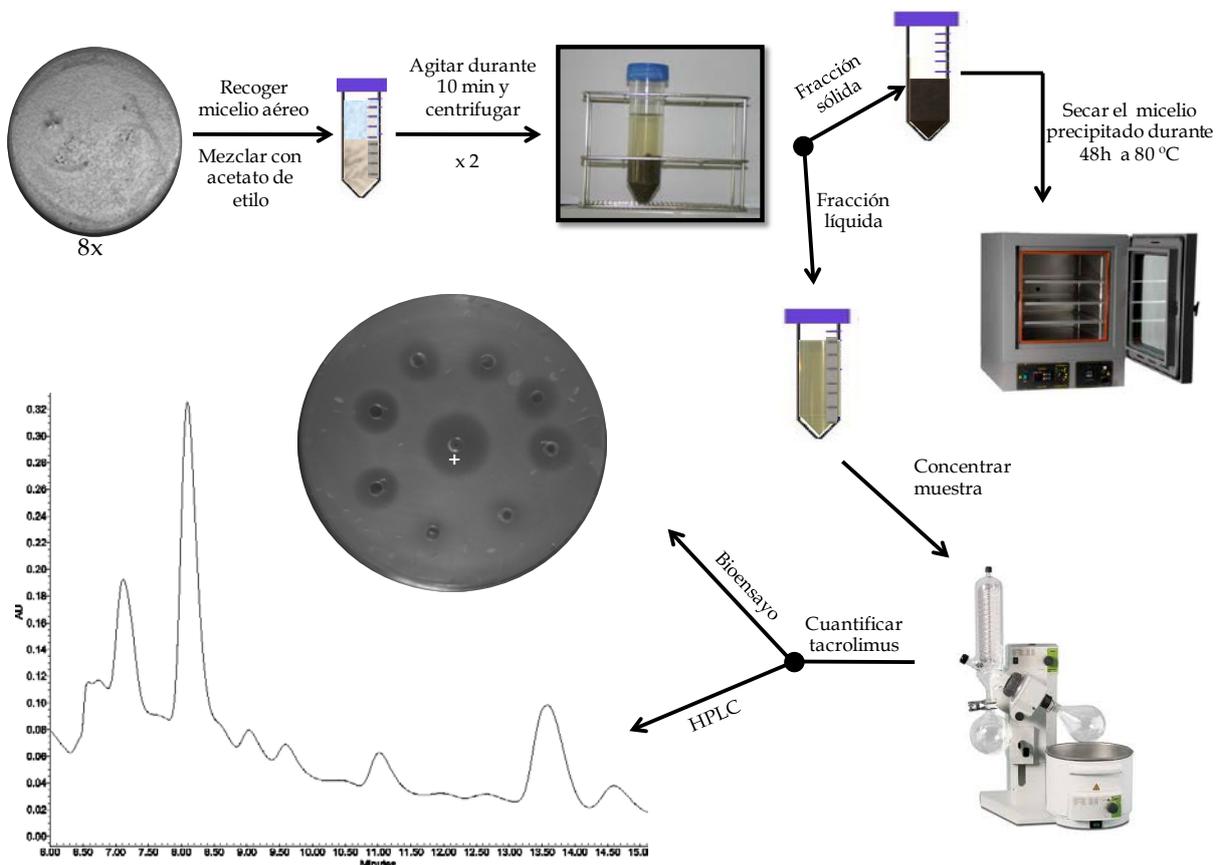


Figura 3.20. Método optimizado para la determinación de la producción de tacrolimus en medio sólido en *S. tacrolimicus*. La extracción de tacrolimus se realizó a partir del micelio aéreo crecido sobre un disco de celofán y obtenido a partir de 8 placas de medio FKAm. Se realizaron dos extracciones con acetato de etilo y se juntaron. La fracción sólida restante se llevó a desecación durante 48 h a 80 °C para la cuantificación del peso seco. La fracción líquida se llevó a sequedad y se resuspendió en 150 μ l de metanol: agua mQ (1:1, v:v). La muestra concentrada se utilizó tanto para la realización del bioensayo como para la cuantificación de tacrolimus mediante HPLC.

Dichas fracciones concentradas fueron empleadas para la realización del bioensayo con la cepa sensible a tacrolimus *S. cerevisiae* TB23. Los resultados obtenidos permitieron establecer una correlación del pico del cromatograma obtenido en el minuto 13.5 (y que a su vez es coincidente con el pico del cromatograma correspondiente al tacrolimus puro utilizado como control), con los halos de inhibición del bioensayo correspondientes a los minutos 13 y 14 (Figura 3.21 B).

Para comprobar que el efecto inhibitorio se debía a tacrolimus y no a otros compuestos antifúngicos se utilizaron las mismas muestras fraccionadas para realizar un nuevo

bioensayo utilizando esta vez como microorganismo sensor *Candida utilis* (no sensible a tacrolimus). El bioensayo mostró que las fracciones de elución correspondientes al pico del cromatograma de tacrolimus (minutos 13 y 14) no producían halos de inhibición en dichos tiempos en el bioensayo con *Candida utilis* (Figura 3.21 C). Con todo ello se comprobó la producción de tacrolimus por *S. tacrolimicus* y su correlación con el pico del cromatograma que eluye en torno a los 13.5 minutos.

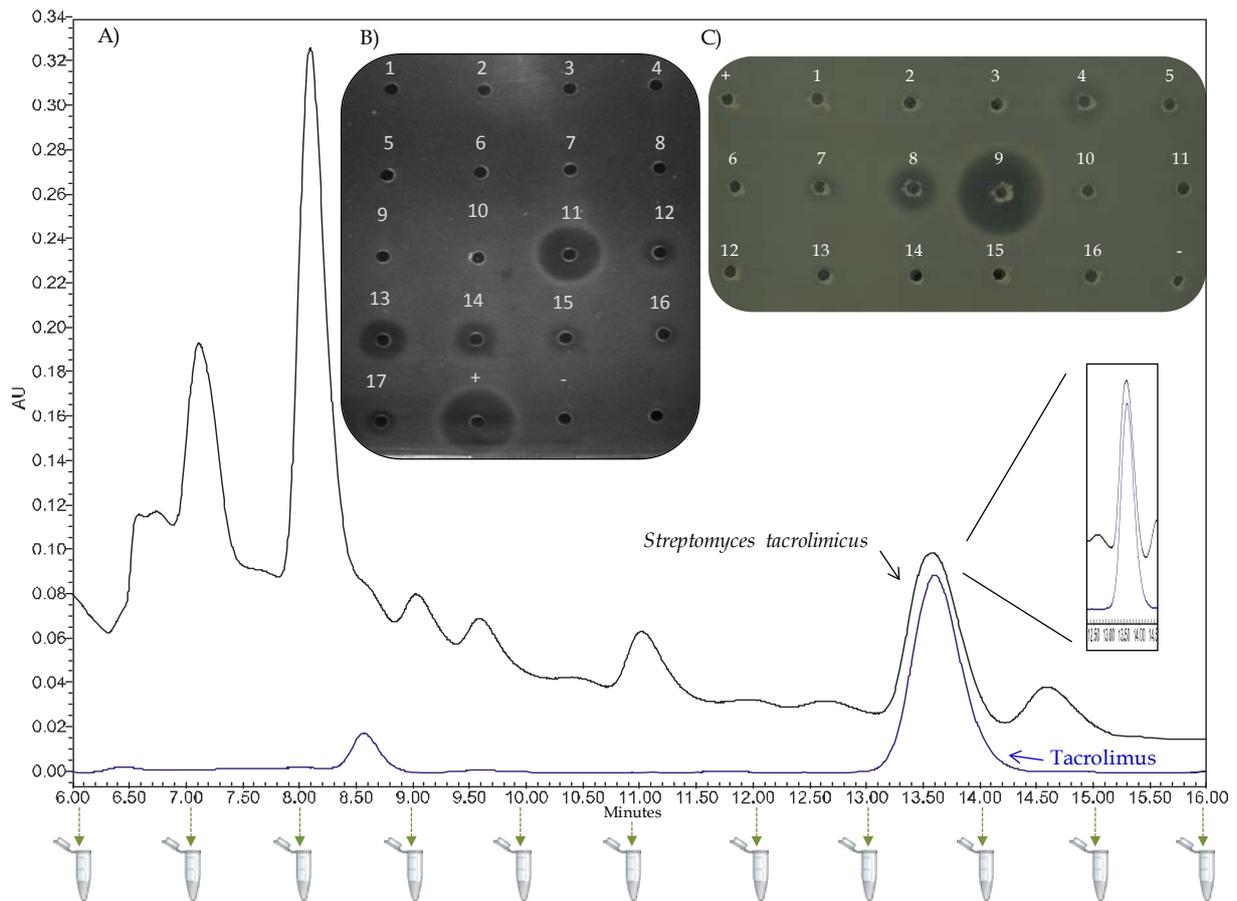


Figura 3.21. Análisis del producto de la fermentación mediante bioensayo y HPLC. A) Cromatograma de la extracción con acetato de etilo de la fermentación en medio sólido de *S. tacrolimicus* (línea negra) y del patrón puro de tacrolimus (línea azul). B) Placa de bioensayo utilizando la cepa *S. cerevisiae* TB23, como microorganismo sensor. C) Placa de bioensayo utilizando *Candida utilis* como microorganismo sensor. Cada pocillo se corresponde con las fracciones eluidas en cada minuto de la carrera de HPLC. El halo del pocillo “+” corresponde a tacrolimus puro (5 µg/ml) utilizado como control positivo. Como control negativo, pocillo “-”, se utilizó metanol grado HPLC.

3.3.4. Análisis cuantitativo de la producción de tacrolimus mediante HPLC

El método de HPLC utilizado para la determinación de tacrolimus fue el descrito en materiales y métodos (ver apartado 2.16.2). Para asegurarnos de que el pico del minuto 13.5 se corresponde con tacrolimus, se llevó a cabo un dopaje (“doping”) con 5 µl de una concentración de 100 µg/ml de tacrolimus puro (Figura 3.22). En todos los casos testados, el

pico correspondiente a tacrolimus aumentó en la muestra dopada con respecto a la muestra no dopada, lo que confirma la producción de concentraciones bajas de tacrolimus por *S. tacrolimicus*. Además de estos resultados, durante la realización de este trabajo se publicó un artículo que hace referencia a un aumento de producción de tacrolimus en *Streptomyces* sp. ATCC55098 (*S. tacrolimicus*) mediante la modificación de la fuente de carbono y nitrógeno que se adicionan al medio de cultivo (Singh y Behera, 2009). Todos estos hechos ayudan a demostrar que *S. tacrolimicus* es un productor de tacrolimus como fue descrito por Dumont *et al.* en 1991, a pesar de la no observación inicial de tacrolimus en bioensayos y cromatogramas realizados a partir de caldos de fermentación y de que el gen *fkbG*, esencial para la síntesis de tacrolimus, está truncado, no siendo funcional en *S. tacrolimicus*.

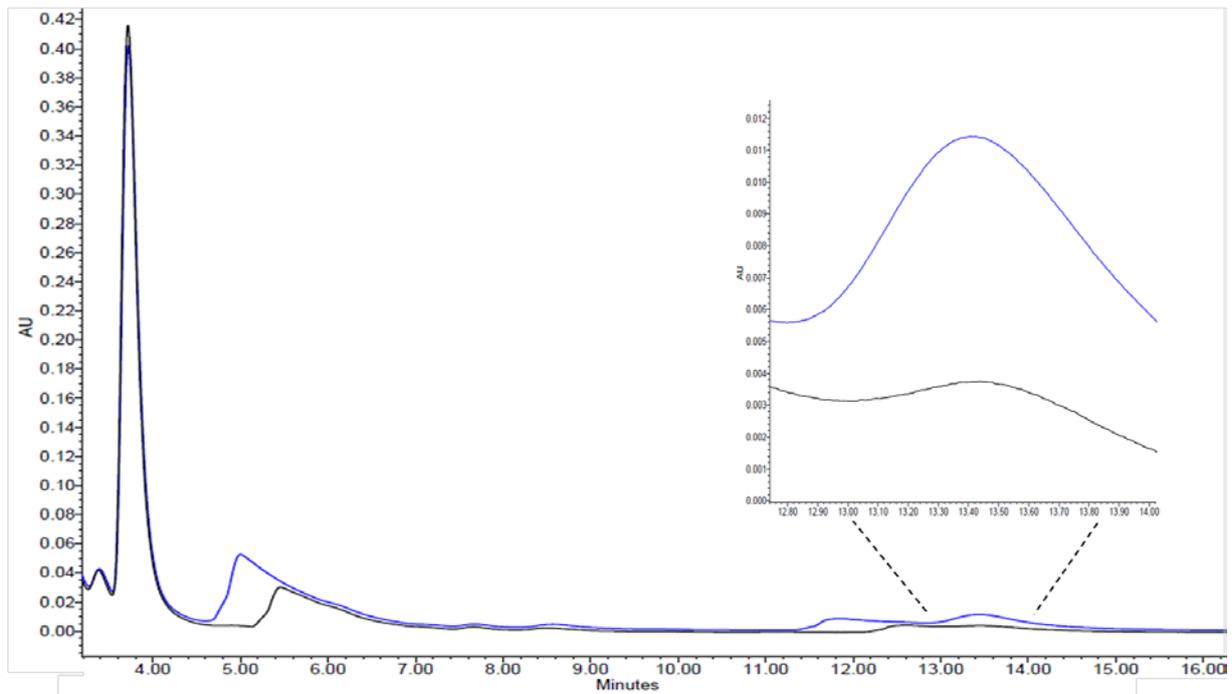


Figura 3.22. Cromatograma de la extracción con acetato de etilo de la fermentación en medio sólido. La línea negra se corresponde con la muestra de cepa silvestre y La línea azul se corresponde con la muestra de la cepa silvestre dopada con 5 μ l de una concentración de 100 μ g/ml de tacrolimus puro.

3.4. Análisis funcional de los posibles genes reguladores de ruta de tacrolimus en *S. tacrolimicus*

3.4.1. Interrupción de los posibles genes reguladores de ruta

Tras la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus detectamos 4 posibles reguladores ya descritos, tres de ellos situados en la “zona derecha” de la agrupación (*fkbn*, *orfX* y *orfW*) y un único posible regulador localizado en la “zona izquierda” (*orfD*). Para analizar el posible efecto regulador de dichos genes sobre la producción de tacrolimus procedimos a su interrupción mediante la tecnología REDIRECT® (ver apartado 2.13).

3.4.1.1. Análisis funcional de *fkbn* en *S. tacrolimicus*

Puesto que *fkbn* está conservado en la agrupación biosintética de tacrolimus de *S. tacrolimicus*, *S. tsukubaensis* y en la agrupación génica de FK520 de *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus*, procedimos a su inactivación génica para estudiar el efecto regulador de FkbN en la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

3.4.1.1.1. Inactivación del gen regulador *fkbn*

Para la interrupción del gen *fkbn* se empleó la técnica REDIRECT® (Gust *et al.*, 2002). Dicha técnica consiste en la sustitución en el genoma del gen objeto de estudio por un gen de resistencia a antibióticos, en nuestro caso el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV*.

La inactivación génica se llevó a cabo reemplazando el gen *fkbn* por un fragmento de 1384 pb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos denominados *fkbn*-Up/*fkbn*-Down, de manera que el producto final de amplificación incluye 39 nucleótidos corriente arriba del gen que se va a inactivar, el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* con el origen de transferencia *oriT* y 39 nucleótidos corriente abajo del gen.

Por otro lado se introdujo el cósmido E que contiene el gen *fkbn* en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 mediante transformación. El plásmido pIJ790 porta el operón λ RED que presenta los genes *gam*, *exo* y *beta*, los cuales favorecen la tasa de recombinación e inhiben el sistema de exonucleasas RecBCD del hospedador. De esta manera conseguimos transformar un fragmento lineal con una alta tasa de recombinación.

Una vez obtenidas las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/E, éstas fueron electroporadas con 100, 250 y 500 ng de los productos de PCR obtenidos a partir del plásmido pIJ773, con los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.13.5). Tras la electroporación los dobles recombinantes fueron seleccionados por su resistencia a apramicina. Las colonias resistentes presentaron el cósmido E pero con el gen *fkbn* sustituido por el casete de apramicina. Para comprobar que el gen había sido sustituido correctamente analizamos

varias de las colonias obtenidas mediante PCR utilizando los cebadores externos al gen *FkbNRD1/FkbNRD2* (Anexo 6.1.IV). En el caso del cósmido E silvestre el patrón de PCR esperado era una banda de 3216 pb mientras que con el cósmido E recombinante ($\Delta fkbN$) se obtendría una banda de 1832 pb (Figura 3.23).

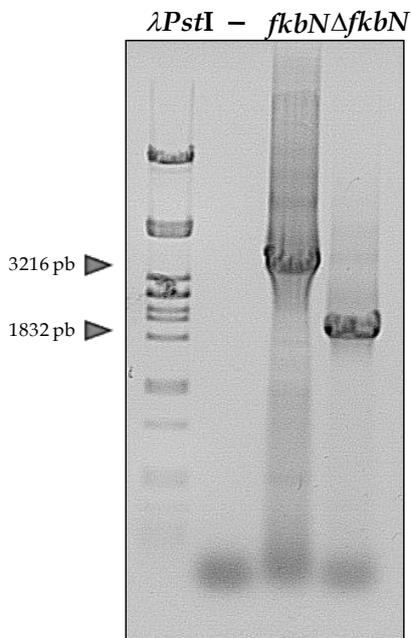


Figura 3.23. Comprobación mediante PCR de la inactivación del gen *fkbN* en el cósmido E usando los cebadores *FkbNRD1/FkbNRD2*. El carril 1 contiene ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *PstI*. El carril 2 corresponde al control negativo (reacción de PCR con agua mQ en lugar de ADN). En los carriles 3 y 4 las reacciones de PCR contienen ADN del cósmido E silvestre y del cósmido E recombinante (cósmido E: $\Delta fkbN$), respectivamente.

Puesto que *S. tacrolimicus* posee un potente sistema de restricción, éste debe ser superado mediante el pase del ADN a través de una cepa de *E. coli dam⁻ dcm⁻* (MacNeil *et al.*, 1992). Por ello, el cósmido E: $\Delta fkbN$ se introdujo en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación. Esta cepa porta un vector conjugativo no movilizable, pUZ8002, que contiene las funciones de transferencia necesarias para que se produzca el paso de material genético de una célula a otra. El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido.

A continuación, se introdujo la construcción en *S. tacrolimicus* mediante conjugación con algunas modificaciones respecto al protocolo estándar para *S. coelicolor* (ver apartado 2.13.6). Por un lado, la cantidad inicial de esporas de *S. tacrolimicus* empleada fue 1×10^8 , utilizándose posteriormente concentraciones de 2×10^8 y 1×10^9 . Por otro lado, la DO_{600} a la que se recogieron las células de *E. coli* fue 0,4, probándose también DO_{600} de 0,5 y 0,6, en 1 ml final. La mezcla de bacterias para la conjugación, se sembró en placas de MS suplementadas con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10mM. Tras 16-20 horas de incubación a 28 °C se añadió una cobertera con ácido nalidíxico y apramicina para impedir el crecimiento de *E. coli* y para la selección de las células de *Streptomyces* recombinantes, respectivamente.

Los exconjugantes obtenidos se analizaron por resistencia a antibióticos en medio TBA. Así, los clones que crecieron en apramicina (Apr^R) pero no lo hicieron en

kanamicina+apramicina ($\text{Kn}^S + \text{Apr}^R$) indicaron una doble recombinación y por tanto la sustitución del gen *fkbn* por el casete de resistencia a apramicina en el genoma de *S. tacrolimicus*. Mientras que el crecimiento en presencia de ambos antibióticos indicó la integración del cósmido E: Δ *fkbn* recombinante en el cromosoma de *S. tacrolimicus* mediante una recombinación simple, siendo el ADN perteneciente al SuperCos1 el que aporta la resistencia a kanamicina.

Tras analizar 473 exconjugantes se obtuvieron ocho posibles dobles recombinantes que fueron comprobados por PCR utilizando de nuevo los cebadores FkbNRD1/FkbNRD2. Así, la PCR con oligonucleótidos externos debe amplificar una banda de 1832 nt en el doble recombinante (*S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*) respecto a una banda de 3216 nt correspondiente a la cepa silvestre (Figura 3.24A).

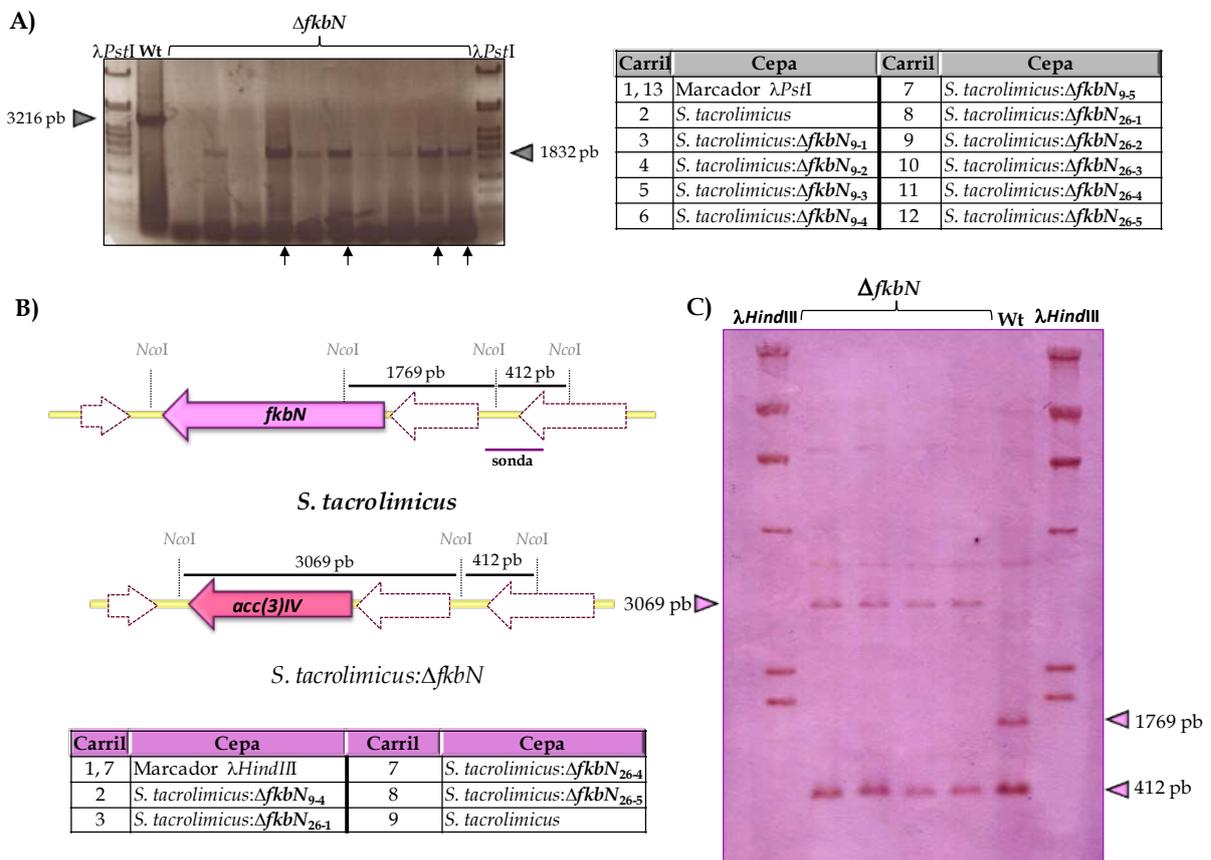


Figura 3.24. Comprobación de la interrupción del gen *fkbn* en el cromosoma de *S. tacrolimicus*. A) Análisis mediante PCR usando los cebadores FkbNRD1/FkbNRD2. De los 8 clones positivos, 4 fueron seleccionados para posterior análisis mediante *Southern*. B) Mapa del cromosoma de *S. tacrolimicus* y del mutante *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*. Se indica la sonda usada en la hibridación. C) Hibridación de *Southern* del ADN de los 4 exconjugantes de *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn* seleccionados y la cepa silvestre *S. tacrolimicus* tras su digestión con *Nco*I, utilizando como sonda un fragmento de 482 pb. Las bandas obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en B.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación tipo *Southern* seleccionando 4 de los clones, denominados *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN*₉₋₄, *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN*₂₆₋₁, *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN*₂₆₋₄ y *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN*₂₆₋₅. El ADN de la cepa parental *S. tacrolimicus* y el de los cuatro clones recombinantes se digirió con la enzima *Nco*I. Como sonda se utilizó un fragmento de 482 pb correspondiente al gen *orfV* y a la región intergénica entre *orfQ* y *orfV* obtenida por PCR con los cebadores *fbk1308* y *fbk2108*. Tras la hibridación, la presencia de dos bandas de 1769 pb y 412 pb permitió diferenciar la cepa parental de los dobles recombinantes, que presentaron una banda de 3069 pb y la misma banda de 412 pb (Figura 3.24 B y C).

3.4.1.1.2. Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante *Streptomyces tacrolimicus*: Δ *fbkN*

Con el fin de estudiar el efecto de la inactivación del gen *fbkN* se determinó la producción de tacrolimus con la cepa mutante *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN*. Se cultivaron los 4 exconjugantes obtenidos (*N*₂₆₋₁, *N*₂₆₋₄, *N*₂₆₋₅ y *N*₉₋₄) observando que se comportaban de manera uniforme con respecto a la producción de tacrolimus, por lo que los datos de producción del mutante se obtuvieron calculando la media de la producción de las 4 cepas.

Los cultivos de las cepas mutantes y silvestre se desarrollaron en medio sólido FKAm y la extracción de tacrolimus se realizó a los 7 días de cultivo, tiempo de máxima producción de tacrolimus (ver apartado 3.3.3.2). La producción se cuantificó mediante HPLC y los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.25. No se observaron diferencias en el crecimiento entre ambos tipos de cepas, sugiriendo que el gen *fbkN* no está implicado en el metabolismo primario o la diferenciación celular. Sin embargo, la producción de tacrolimus de los mutantes *S. tacrolimicus*: Δ *fbkN* fue un 74 % menor que la de cepa silvestre, lo que indica que, aunque *fbkN* no es absolutamente esencial, sí actúa como un regulador positivo en la biosíntesis de tacrolimus (Figura 3.25).

Estos resultados concuerdan con los presentados recientemente por Goranovic *et al.* (2012) y Mo *et al.* (2012), quienes describen el gen *fbkN* como un regulador positivo de la transcripción de tacrolimus en *S. tsukubaensis* y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, respectivamente, aunque en ambos casos la inactivación génica conduce a la eliminación completa de la producción de tacrolimus. Sin embargo, y a pesar de no detectarse producción de tacrolimus en el mutante *S. tsukubaensis*: Δ *fbkN*, sí que existe transcripción de los genes de la agrupación de tacrolimus analizados mediante RT-PCR (Goranovic *et al.*, 2012). En el caso de *S. tacrolimicus* la inactivación génica del regulador *fbkN* no parece

producir una disminución tan drástica de la transcripción de los genes biosintéticos y por tanto se siguen detectando pequeñas cantidades de tacrolimus.

3.4.1.1.3. Introducción del gen *fkbN* en multicopia en *S. tacrolimicus* y *S.tacrolimicus:ΔfkbN*

Una vez comprobado el efecto que causa la inactivación del gen *fkbN* sobre la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* se procedió a la introducción del gen en multicopia en el mutante *S.tacrolimicus:ΔfkbN* para validar los resultados obtenidos tras su delección.

En primer lugar diseñamos los oligonucleótidos denominados FkbN SE1 y FkbN SE2 (ver Anexo 6.1.IV), que amplifican un fragmento de 3044 pb conteniendo el gen *fkbN* junto con su promotor. En el extremo 5' de cada oligonucleótido se añadió la secuencia de corte de la enzima *SpeI* para facilitar su clonaje en el plásmido pAMB1. El plásmido pAMB1 es un vector replicativo tanto en *E. coli* como en *Streptomyces* y posee genes de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*), tioestreptona (*tsr*) y ampicilina(*amp*) .

Realizamos la PCR con la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England BioLabs), siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos (apartado 2.10) y utilizando como molde el cósmido E. La banda obtenida fue purificada y clonada en el sitio único de corte *SmaI* del plásmido pBluescript en la cepa *E.coli* DH5α. La correcta amplificación fue comprobada mediante secuenciación. El gen *fkbN* con su promotor fue liberado con la enzima de restricción *SpeI* y posteriormente fue clonado en el sitio único de corte *SpeI* del plásmido pAMB1 obteniéndose el plásmido pAMB1-*fkbN*. Dicha construcción fue introducida mediante transformación en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. Posteriormente, el plásmido pAMB1-*fkbN* fue transferido mediante conjugación a las células de *S. tacrolimicus* y *S. tacrolimicus:ΔfkbN* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.13.6. Los transformantes fueron seleccionados mediante resistencia a apramicina y tioestreptona. Del mismo modo fue introducido el vector pAMB1 en la cepa parental *S. tacrolimicus* para su posterior uso como control.

3.4.1.1.4. Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante *S. tacrolimicus:ΔfkbN* y la cepa silvestre tras la introducción del gen *fkbN* en multicopia

En un primer momento estudiamos el efecto de la introducción del plásmido replicativo pAMB1 sobre la producción de tacrolimus en la cepa parental para asegurarnos de que los resultados obtenidos eran debidos exclusivamente a la presencia del gen *fkbN* en multicopia y no a la del plásmido pAMB1 por sí mismo. Como resultado de la introducción del

plásmido pAMB1 se observa una disminución de la producción de tacrolimus en torno al 17 %, por lo que asumimos que la introducción del plásmido afecta ligeramente de forma negativa a la producción del metabolito secundario tacrolimus pero no lo suficiente como para descartar su uso en los experimentos de sobreexpresión (Figura 3.25).

Al comparar la producción de la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1 con la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1-*fkbn* se observa un aumento en la producción de tacrolimus del 83% (Figura 3.25). Estos datos concuerdan con los mostrados por Goranovic *et al.* (2012), quienes muestran que la sobreexpresión del gen *fkbn* produce un aumento significativo del título de tacrolimus de 2.1 veces con respecto a la cepa parental *S. tsukubaensis*.

Por otro lado, y para comprobar si el gen *fkbn* es el responsable directo de la disminución de la producción de tacrolimus en el mutante, analizamos el efecto de la introducción en multicopia del gen *fkbn* en el mutante *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*. Al comparar la producción de tacrolimus entre la cepa *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*/pAMB1-*fkbn* con su cepa control *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn* se observa un aumento de la producción de tacrolimus de 8,5 ng/mg de peso seco. Si comparamos estos valores con los obtenidos por la cepa silvestre, se observa una restauración de los niveles de producción de tacrolimus que se habían visto afectados por la inactivación del gen *fkbn*. Por todo ello, se valida el papel como regulador positivo de la transcripción de tacrolimus que el gen *fkbn* ejerce en *S. tacrolimicus* (Figura 3.25).

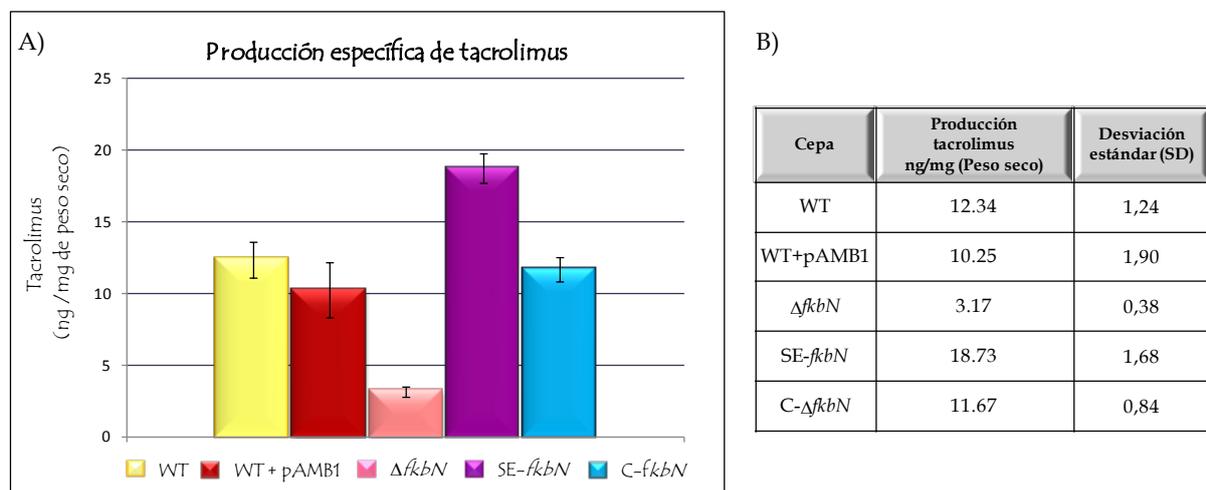


Figura 3.25. Resultados de la producción específica de tacrolimus de las distintas cepas analizadas. A) Gráfico que muestra los resultados de los cultivos realizados en medio sólido. Cada valor se obtiene a partir de extracciones realizadas a partir del micelio crecido en 8 placas. Los experimentos fueron realizados por triplicado. B) Tabla que muestra los valores de la producción específica de tacrolimus y la desviación estándar. WT, *S. tacrolimicus*; WT+ pAMB1, *S. tacrolimicus*/pAMB1; Δ *fkbn*, *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*; SE-*fkbn*, *S. tacrolimicus*/pAMB1-*fkbn*; C- Δ *fkbn*, *S. tacrolimicus*: Δ *fkbn*/pAMB1-*fkbn*.

3.4.1.2. Análisis funcional de *orfD* en *S. tacrolimicus*

3.4.1.2.1. Análisis funcional del gen *orfD*

Por la presencia de un codón TTA y por su proximidad a los genes estructurales de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus, consideramos al gen *orfD* como un posible regulador específico de ruta, por lo que procedimos a su caracterización.

3.4.1.2.2. Inactivación del gen *orfD*

Utilizando el método REDIRECT[®] (apartado 2.13) se logró la inactivación del gen *orfD* en el cósmido D8 en *E. coli*, como paso previo a su interrupción en el cromosoma de *S. tacrolimicus*. La interrupción génica se llevó a cabo reemplazando el gen *orfD* por el casete de apramicina obtenido a partir del plásmido pIJ773 mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos denominados *orfD*-Up/*orfD*-Down (ver anexo 6.1.IV). Tras varios intentos se consiguió el reemplazamiento del gen *orfD* presente en el cósmido D8 por el casete de apramicina. Se comprobó mediante PCR el éxito de la sustitución utilizando los oligonucleótidos OrfD RD1/ Orf RD2.

La construcción realizada en *E. coli* se introdujo en *Streptomyces* mediante conjugación a partir de la cepa ET12567/pUZ8002 según el método descrito en el apartado 2.13.6. Tras realizar varias conjugaciones analizamos un total de 536 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina. En una segunda selección, se hicieron réplicas de cada colonia en placas de TSA con apramicina y en placas de TSA con kanamicina y apramicina, seleccionando los clones que crecieron en apramicina (Apr^R) pero no lo hicieron en kanamicina+apramicina (Kn^S). Los exconjugantes positivos fueron comprobados mediante PCR utilizando dos parejas de cebadores, una pareja externa al gen *orfD* denominada OrfD RD1/ OrfD RD2 y otra pareja formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina (*acc*(3)IV REV) y otro externo al gen *orfD* (OrfD RD2). Así, si se ha producido la sustitución de forma correcta, la PCR con los oligonucleótidos externos en los dobles recombinantes amplificará una banda de 1921 pb, mientras que con los simples recombinantes se amplificará la banda de 1921 pb correspondiente al gen interrumpido (procedente del cósmido D8: Δ *orfD*) y otra banda de 1232 pb correspondiente al gen silvestre. Usando la segunda combinación de oligonucleótidos se espera obtener una banda de 1051 pb en la cepa *S. tacrolimicus*: Δ *orfD*, mientras que en la cepa silvestre no debe existir amplificación. En la Figura 3.26 (A y B), se muestran los resultados de los dos clones que presentaron el patrón esperado.

Para realizar la hibridación de *Southern* se digirió el ADN total de la cepa parental y de los dos clones de *S. tacrolimicus*: Δ *orfD* con la enzima *Nco*I y se hibridó con una sonda de 811

pb, conteniendo el gen *orfB*, obtenida por PCR con los oligonucleótidos Southern D1/Southern D2. Los dobles recombinantes presentaban una banda de 3467 pb mientras que la cepa parental presenta una banda de 2767 pb (Figura 3.26 C y D).

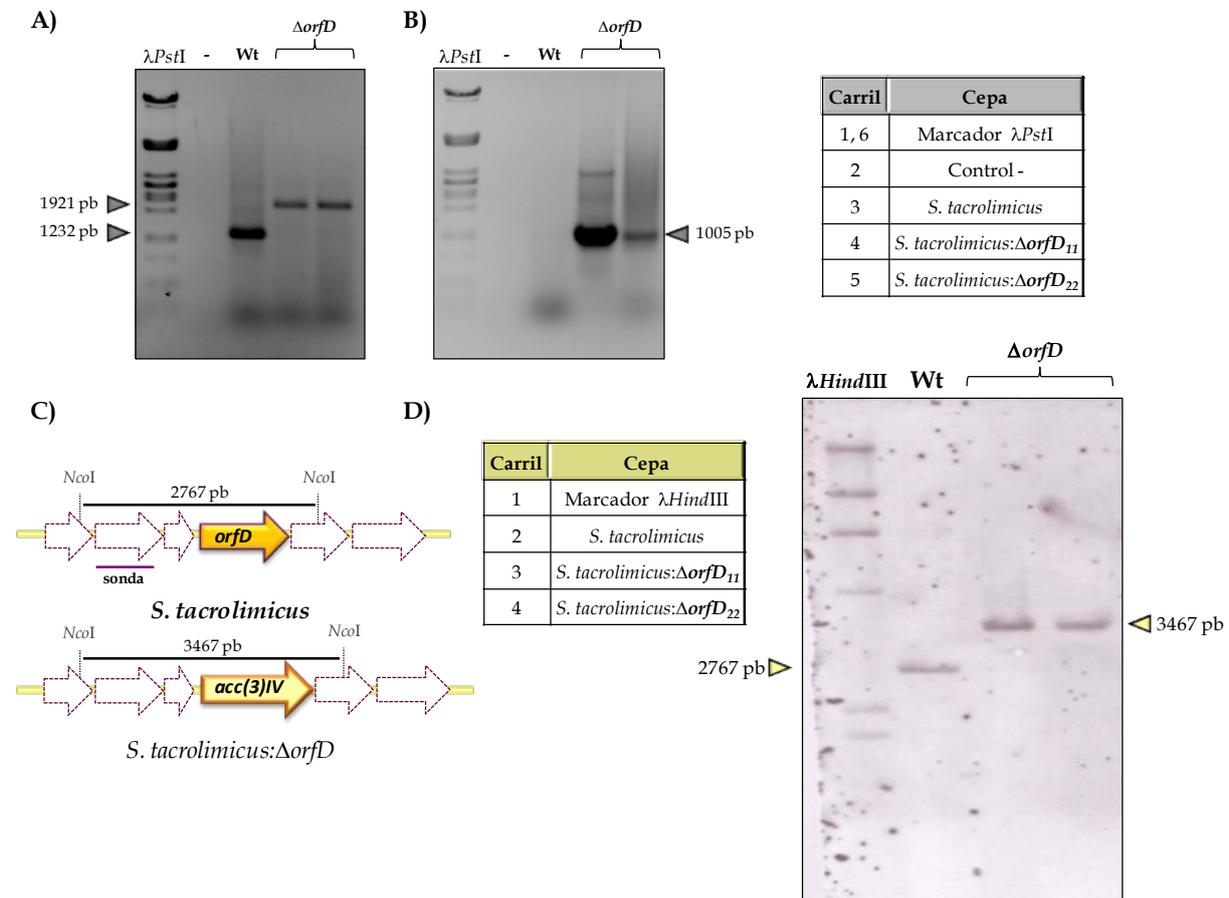


Figura 3.26. Comprobación de la interrupción del gen *orfD* en el cromosoma de *S. tacrolimicus*. Análisis mediante PCR usando los cebadores OrfDR D1/OrfR D2 (A) y con los cebadores *acc(3)IV* REV y OrfR D2 (B). (C) Mapa del cromosoma de *S. tacrolimicus* y del mutante *S. tacrolimicus*: Δ *orfD*. D) Hibridación de Southern del ADN de la cepa silvestre y de los 2 exconjugantes analizados de *S. tacrolimicus*: Δ *orfD* digeridos con *NcoI*. Las bandas obtenidas corresponden a los patrones de restricción indicados en C.

3.4.1.2.3. Análisis de la inactivación del gen *orfD*

Tras la inactivación del gen *orfD* procedimos a estudiar su papel como regulador en la síntesis de tacrolimus. No se observaron cambios morfológicos de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que el gen *orfD* no está implicado en el metabolismo primario. Sin embargo, al comparar la producción de tacrolimus entre las dos cepas se observa que la inactivación génica conlleva un aumento de la producción de tacrolimus de un 89 % (Figura 3.27), por lo que se puede concluir que el gen *orfD* actúa como un regulador negativo de la síntesis de tacrolimus.

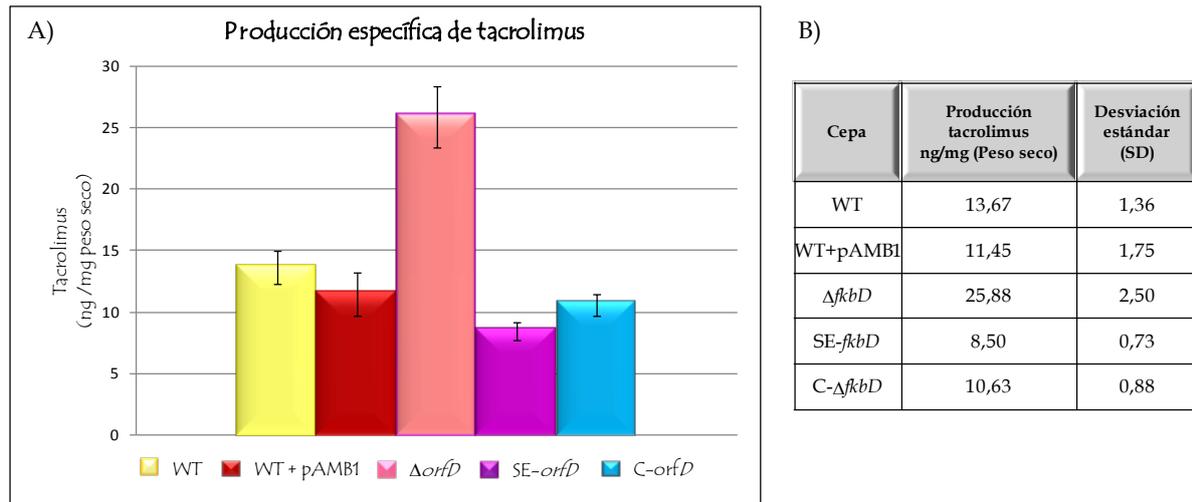


Figura 3.27. Resultados de la producción específica de tacrolimus en las distintas cepas analizadas. A) Gráfico de resultados de las fermentaciones realizadas en medio sólido. B) Tabla de valores de la producción específica de tacrolimus y la desviación estándar. WT, *S. tacrolimicus*; $\Delta fkbD$, *S. tacrolimicus*: $\Delta fkbD$; WT+ pAMB1, *S. tacrolimicus*/pAMB1; SE-*fkbD*, *S. tacrolimicus*/pAMB1-*fkbD*; C- $\Delta fkbD$, *S. tacrolimicus*: $\Delta fkbD$ /pAMB1-*fkbD*.

3.4.1.2.4. Introducción del gen *orfD* en multicopia en la cepa *S. tacrolimicus* y *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$

Debido a que la inactivación del gen *orfD* tiene un claro efecto en la producción de tacrolimus estudiamos el efecto de la introducción de varias copias del gen tanto en la cepa silvestre como en el mutante *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$.

La estrategia seguida para la sobreexpresión de *orfD* fue la misma que para *fkbN*. En este caso se empleó la pareja de oligonucleótidos FkbD SE1/FkbD SE2, que amplifica un fragmento de 862 pb, utilizando como ADN molde el cósmido D8. En el extremo 5' de cada oligonucleótido se añadió la secuencia de corte de la enzima *SpeI* para facilitar el clonaje del gen *orfD* en el plásmido pAMB1.

El producto de PCR se clonó en el sitio *SmaI* de pBluescript obteniéndose el vector pBS-*orfD*, de 3823 pb. Los transformantes fueron analizados por patrones de digestión y mediante secuenciación con los oligonucleótidos universales F y R. Posteriormente el vector pBS-*orfD* fue digerido con la enzima *SpeI* liberándose el fragmento correspondiente al gen *orfD*, que finalmente fue clonado en el sitio de corte *SpeI* del plásmido pAMB1, obteniéndose la construcción pAMB1-*orfD*, de 10.590 pb. Dicha construcción fue introducida mediante conjugación en las cepas *S. tacrolimicus* y *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$ desde la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002.

3.4.1.2.5. Análisis de la producción de tacrolimus en el mutante *S. tacrolimicus*: Δ *orfD* y la cepa silvestre tras la introducción del gen *orfD* en multicopia

Para confirmar que el gen *orfD* era el único responsable del aumento de la producción de tacrolimus tras la inactivación génica, procedimos a la complementación de la cepa *tacrolimicus*: Δ *orfD* mediante la introducción del gen *orfD*, junto con su región promotora, clonado en el plásmido pAMB1. Tras la comparación de la producción de tacrolimus entre la cepa *S. tacrolimicus*/ Δ *orfD* y la cepa *S. tacrolimicus*: Δ *orfD*/pAMB1-*orfD* se observa una disminución de la producción de tacrolimus del 59 %. Si comparamos estos valores con los obtenidos por la cepa silvestre, se observa una restauración de los niveles de producción de tacrolimus que se habían visto afectados por la inactivación del gen *orfD*.

Del mismo modo estudiamos el efecto de la sobreexpresión del gen *orfD* en la cepa parental, observándose una disminución de la producción del 26% en la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1-*orfD* frente a la cepa control *S. tacrolimicus*/pAMB1 (Figura 3.27). Por todo ello, se valida el papel del gen *orfD* como un regulador negativo de la transcripción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

3.4.1.3. Análisis funcional de *orfX* en *S. tacrolimicus*

3.4.1.3.1. Análisis funcional del gen *orfX*

Debido a la proximidad del gen *orfX* a los genes estructurales de la agrupación génica de tacrolimus, procedimos a su interrupción para estudiar el posible efecto regulador de dicho gen en la producción de tacrolimus.

3.4.1.3.2. Inactivación del gen *orfX*

La inactivación génica se llevó a cabo utilizando la técnica REDIRECT[®], reemplazando el gen *orfX* por un fragmento de 1384 pb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se utilizaron los cebadores *orfX*-Up/*orfX*-Down y el cósmido E. Se verificó el reemplazamiento mediante PCR utilizando los oligonucleótidos fkb2101/fkb1421, previamente empleados en la secuenciación de la agrupación génica (Anexo 6.1.I). En las colonias donde produjo doble recombinación se obtuvo una banda de amplificación de 2709 pb, frente a la banda de 2356 pb obtenida con la cepa silvestre (Figura 3.28).

El cósmido con el gen *orfX* delecionado se introdujo en *S. tacrolimicus* mediante conjugación (ver apartado 2.13.6). Como resultado de la conjugación se obtuvieron 327 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina, lo cual indicaba que se había incorporado el gen *aac(3)IV*. En una segunda selección, se hicieron réplicas en medio TSA con apramicina y en TSA con apramicina y kanamicina de cada

colonia obtenida. Tras el análisis mediante PCR utilizando los oligonucleótidos fkb2101/fkb1421 de más de 200 colonias que mostraban el fenotipo Apr^R Kn^S no obtuvimos ningún doble recombinante. Por tanto se volvieron a realizar nuevas rondas de conjugación utilizando diferentes concentraciones de células. Inicialmente se ensayó una mezcla de 10⁸ esporas resuspendidas en 0,5 ml de 2xTY con 0,5 ml de una suspensión de *E. coli* (DO₆₀₀ de 0,4). Posteriormente se utilizaron concentraciones de esporas de 2x10⁸ y 10⁹, así como células de *E. coli* provenientes de cultivos a una DO₆₀₀ de 0,4, 0,5 y 0,6, en 1 ml final. Tras llevar a cabo las diferentes conjugaciones se analizaron más de 1600 colonias por su resistencia a los distintos antibióticos. Los clones fueron sembrados en medio TSA con apramicina y posteriormente en medio con apramicina y kanamicina. De las 270 clones Apr^R Kn^S analizados posteriormente mediante PCR ninguno presentó la banda de amplificación correspondiente al gen interrumpido.

Debido a que la tasa de doble recombinación era nula, probamos a forzar la doble recombinación mediante pases de las colonias recombinantes simples tanto en medio TSB como en medio TSA suplementado con apramicina. Finalmente y tras realizar 103 pases no se obtuvo ningún doble recombinante. Igualmente se realizó de nuevo en *E. coli* la construcción del cósmido E con el gen *orfX* interrumpido para su posterior interrupción en el cromosoma de *S. tacrolimicus*.

En este segundo intento, y tras analizar más de 400 exconjugantes, tampoco se obtuvo ningún clon positivo. Debido a la imposibilidad de obtener un mutante con el gen *orfX* deletado y puesto que este gen no estaba presente en el resto de agrupaciones génicas de otras especies productoras de tacrolimus desistimos de continuar con su inactivación génica.

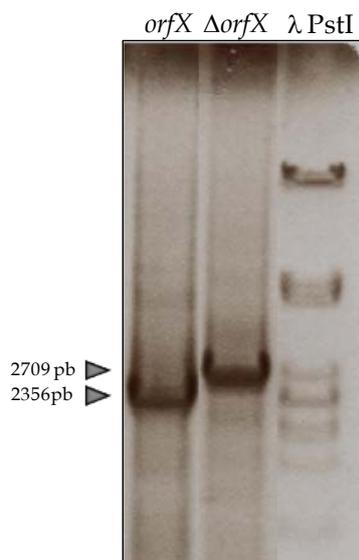


Figura 3.28. Análisis mediante PCR para comprobar la inactivación del gen *orfX*. Carril 1, PCR a partir del cósmido E silvestre; Carril 2, cósmido E recombinante (cósmido E: $\Delta orfX$); Carril 3, ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I.

3.4.1.3.3. Introducción del gen *orfX* en multicopia en la cepa *S. tacrolimicus*

A pesar de no lograr la inactivación del gen *orfX* en *S. tacrolimicus* procedimos a su sobreexpresión en la cepa silvestre para estudiar el efecto de la introducción de varias copias del gen sobre la producción de tacrolimus.

Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos denominados FkbX SE1/FkbX SE2 que amplifican un fragmento de 1249 pb utilizando como ADN molde el cósmido E. El producto de PCR se clonó en el sitio *SmaI* de pBluescript obteniendo el vector pBS-*orfX*. Tras comprobar que la secuencia del fragmento clonado se correspondía con el gen *orfX*, se digirió el vector pBS-*orfX* con la enzima *SpeI*, liberándose el fragmento correspondiente al gen *orfX* que finalmente fue clonado en el sitio de corte único *SpeI* del plásmido pAMB1.

Por último la construcción pAMB1-SE*orfX* fue transferida mediante conjugación a la cepa parental desde *E. coli* ET12567/pUZ8002. La presencia en el vector de los marcadores de resistencia Apr^R y Tsr^R nos permitió diferenciar fácilmente aquellas colonias que poseían la construcción.

3.4.1.3.4. Análisis de la producción de tacrolimus en la cepa silvestre tras la introducción del gen *orfX* en multicopia

Tras comparar la producción de la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1-*orfX* con su cepa control *S. tacrolimicus*/pAMB1 se observó una disminución de la producción del 7,3%, no siendo este dato significativo. Por lo tanto, y con los datos disponibles, podemos concluir que el gen *orfX* no tiene un papel regulador significativo sobre la producción de tacrolimus (Figura 3.29).

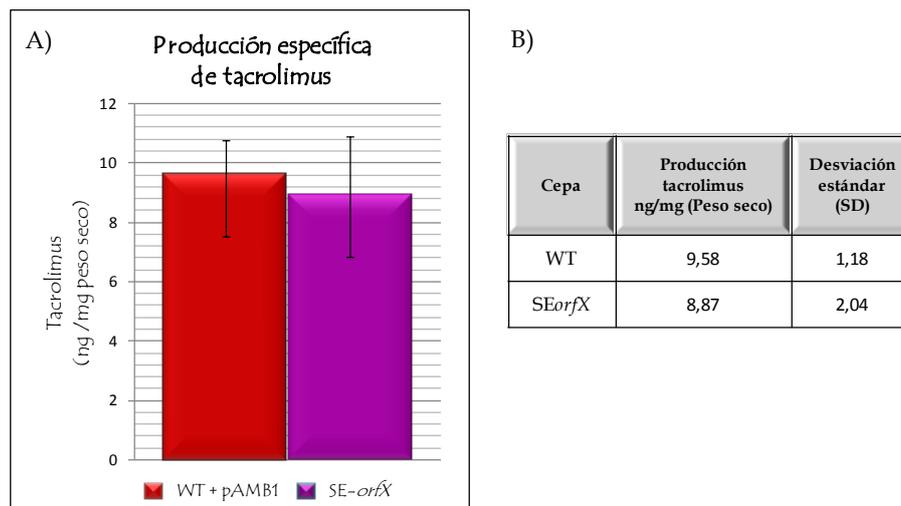


Figura 3.29. Resultados de la producción específica de tacrolimus en la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1 y *S. tacrolimicus*/pAMB1-*orfX*. A) Gráfico que muestra los resultados de las fermentaciones realizadas en medio sólido. B) Valores de la producción específica de tacrolimus y la desviación estándar en las cepas estudiadas.

3.4.1.4. Análisis funcional de *orfW* en *S. tacrolimicus*

3.4.1.4.1. Análisis funcional del gen *orfW*

Debido a la proximidad del gen *orfW* a la agrupación génica de tacrolimus, procedimos a la inactivación génica para estudiar el posible efecto regulador de dicho gen sobre la producción de tacrolimus.

3.4.1.4.2. Inactivación del gen *orfW*

La inactivación génica se llevó a cabo mediante la técnica de REDIRECT® realizando el reemplazamiento en el cósmido E. El reemplazamiento se verificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos fkb2104/fkb1309, usados previamente para la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus (Anexo 6.1.I). En las colonias donde se produjo doble recombinación obtuvimos una banda de amplificación de 2917 pb frente a la banda de 2018 pb obtenida con la cepa silvestre (Figura 3.30).

Tras obtener varios clones positivos, se introdujo el cósmido E: Δ *orfW* en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación. El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido.

A continuación, el cósmido recombinante se transfirió a las células de *S. tacrolimicus* mediante conjugación (ver apartado 2.13.6). Como resultado de la conjugación se obtuvieron 457 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina. En una segunda selección, con cada colonia obtenida se hicieron réplicas en placas de medio TSA con apramicina y en placas de medio TSA con apramicina y kanamicina. Del mismo modo que ocurrió con el gen *orfX*, no obtuvimos ningún doble recombinante, por lo que procedimos tanto a realizar nuevas conjugaciones para obtener un doble recombinante de manera directa, como a hacer pases en medio líquido y sólido a partir de los recombinantes simples con el fin de forzar la doble recombinación.

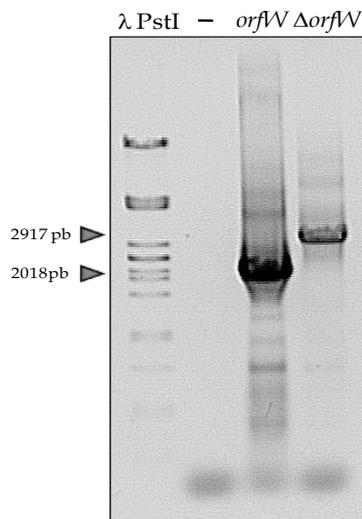


Figura 3.30. Análisis mediante PCR para comprobar la inactivación del gen *orfW*. Carril 1, ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I; carril 2, control negativo (reacción de PCR con agua mQ en lugar de ADN); carril 3, ADN del cósmido E silvestre; carril 4, ADN del cósmido E recombinante (cósmido E: Δ *orfW*).

Tras analizar más de 1000 exconjugantes y realizar más de 52 pases, no fue posible obtener un doble recombinante con el gen inactivado.

Uno de los posibles motivos por el cual no fuimos capaces de obtener dobles recombinantes puede ser debido a la posición de los genes *orfW* y *orfX* en el cósmido E. Dichos genes se encuentran situados cercanos a uno de los extremos del cósmido, estando el gen *orfW* y el gen *orfX* a 4900 pb y 3800 pb del extremo T3 del cósmido E, respectivamente. Aunque en principio las casi 5 y 4 Kb son suficientes para que en ellas se produzcan una recombinación, puede que haya sido un factor determinante para no tener éxito en la inactivación de dichos genes. Los otros dos cósmidos obtenidos en el rastreo en la zona derecha de la agrupación génica de tacrolimus, denominados cósmido D y F, no pudieron ser utilizados para la interrupción génica, ya que uno estaba reorganizado (cósmido D) y el otro no contenía la secuencia de dichos genes (cósmido F). Puesto que estos posibles genes reguladores no estaban presentes en el resto de agrupaciones de tacrolimus, dimos por finalizado el intento de inactivación.

3.4.1.4.3. Introducción del gen *orfW* en multicopia en la cepa *S. tacrolimicus*

Aunque no tuvimos éxito en la inactivación del gen *orfW* en *S. tacrolimicus*, procedimos a su amplificación en la cepa silvestre para estudiar el efecto de la introducción de varias copias del gen sobre la producción de tacrolimus.

Utilizando como molde el cósmido E, realizamos una PCR con la pareja de oligonucleótidos FkbW SE1/FkbW SE2 (Anexo 6.1.IV), obteniendo un fragmento de 727 pb que se clonó en el sitio *SmaI* de pBluescript obteniéndose el vector pBS-*orfW* en la cepa *E. coli* DH5 α . Analizamos los clones obtenidos mediante patrones de digestión, y los clones positivos fueron confirmados mediante secuenciación.

El gen *orfW* fue liberado mediante digestión con *SpeI* y posteriormente clonado en el sitio único de corte *SpeI* del plásmido replicativo pAMB1. El plásmido pAMB-*orfW* fue introducido en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación y posteriormente transferido mediante conjugación a *S. tacrolimicus*. Los exconjugantes fueron seleccionados por marcadores de resistencia, siendo los exconjugantes positivos Apr^R Tsr^R.

3.4.1.4.4. Análisis de la producción de tacrolimus en la cepa silvestre tras la introducción del gen *orfW* en multicopia

Tras comparar la producción de la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1-*orfW* con su cepa control *S. tacrolimicus*/pAMB1 se observó un ligero aumento de la producción del 10%, no siendo este dato significativo si tenemos en cuenta los datos de desviación estándar (Figura 3.31).

Al no disponer de los datos de producción de la cepa mutante *S. tacrolimicus*: $\Delta orfW$ no podemos determinar el efecto regulador del gen *orfW* sobre la producción de tacrolimus. Sin embargo, los resultados de producción de la cepa sobreexpresada *S. tacrolimicus/pAMB1-orfW* parece indicar el gen *orfW* tampoco tiene un papel regulador sobre la producción de tacrolimus.

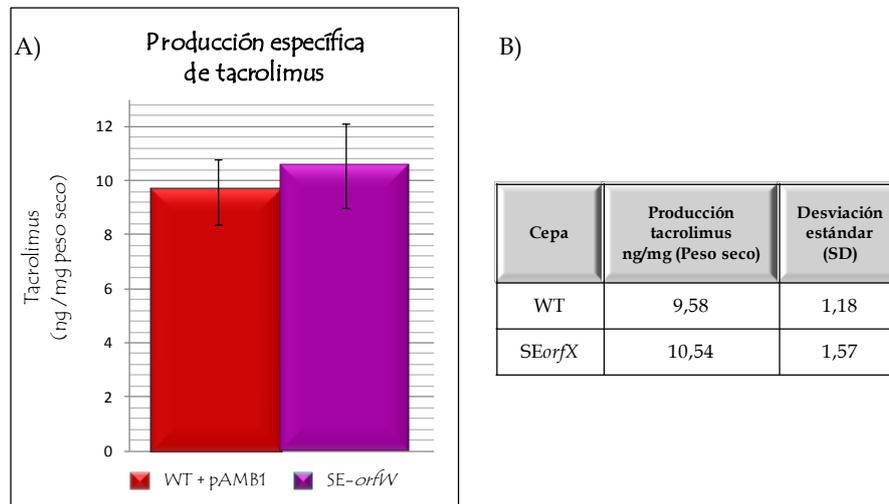


Figura 3.31. Resultados de la producción específica de tacrolimus en la cepa *S. tacrolimicus/pAMB1* y *S. tacrolimicus/pAMB1-orfW*. A) Gráfico que muestra los resultados de las fermentaciones realizadas en medio sólido. B) Valores de producción específica de tacrolimus y desviación estándar en las cepas estudiadas.

3.4.2. Expresión heteróloga del gen *fkbg* de la agrupación génica de tacrolimus de *S.tsukubaensis* en *S.tacrolimicus*

Tras la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *S.tacrolimicus*, observamos que el gen *fkbg*, que codifica una metiltransferasa esencial para la síntesis de la unidad extendora metoximalonil-ACP, se encontraba truncado, presentando únicamente los nucleótidos que codifican los primeros 41 aa (extremo 5') y los últimos 99 aa (extremo 3') de la proteína en comparación con su homólogo *fkbg* en *S. tsukubaensis*, de 222 aa. Entre los dos fragmentos existen 5 nucleótidos, interrumpiéndose el marco de lectura y por tanto siendo imposible la traducción de la proteína.

De este modo, y siendo esencial la proteína FkbG para la síntesis de tacrolimus propusimos que la metiltransferasa codificada por el gen *orfG*, secuenciado por primera vez en este trabajo, podría suplir la función de FkbG. Sin embargo, y debido a que inicialmente no observamos producción de tacrolimus en los caldos de cultivo de *S.tacrolimicus*, pensamos que la falta de producción podría ser debida a la no funcionalidad del gen *fkbg*. Para comprobarlo clonamos el gen homólogo *fkbg* de la agrupación génica de *S.tsukubaensis*, que presenta una identidad del 86%, en el plásmido replicativo pAMB1.

Para proceder con el experimento diseñamos la pareja de oligonucleótidos fkbG-SE1/fkbG-SE2 que amplifica un fragmento de 927 pb, incluyendo el gen *fkbG* y su promotor. Realizamos el clonaje en el sitio único *Sma*I del plásmido pBluescript en *E.coli* DH5 α y el inserto fue liberado con la enzima *Spe*I y posteriormente clonado en el sitio único *Spe*I del plásmido pAMB1. Del mismo modo que para la sobreexpresión de los genes reguladores, el plásmido pAMB1-SEfkbG fue introducido en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. Posteriormente el plásmido pAMB1-SEfkbG fue transferido a *S. tacrolimicus* mediante conjugación. Los exconjugantes fueron seleccionados por marcadores de resistencia, siendo los exconjugantes positivos Apr^R Tsr^R.

3.4.2.1. Análisis de la producción de tacrolimus tras la expresión heteróloga del gen *fkbG* de *S. tsukubaensis* en *S. tacrolimicus*

Fueron obtenidos 5 clones de la cepa *S. tacrolimicus*:pAMB1-fkbG, a partir de los cuales se procedió a determinar la producción de tacrolimus en medio sólido a los 7 días de cultivo.

Al comparar la producción mediante bioensayo se pudieron observar halos de inhibición sensiblemente más grandes con los extractos obtenidos a partir de los distintos clones de la cepa sobreexpresada que con el extracto obtenido a partir de la cepa silvestre (Figura 3.32 B). *S. tacrolimicus*:pAMB1-fkbG₁₁ fue la cepa de elección para posteriores análisis cuantitativos mediante HPLC por el mayor diámetro del halo de inhibición presentado en el bioensayo (Figura 3.32 A). Dicha cepa, presentó un incremento de la producción de tacrolimus del 28 % frente a la cepa silvestre, lo que confirma los resultados observados mediante bioensayos (Figura 3.33).

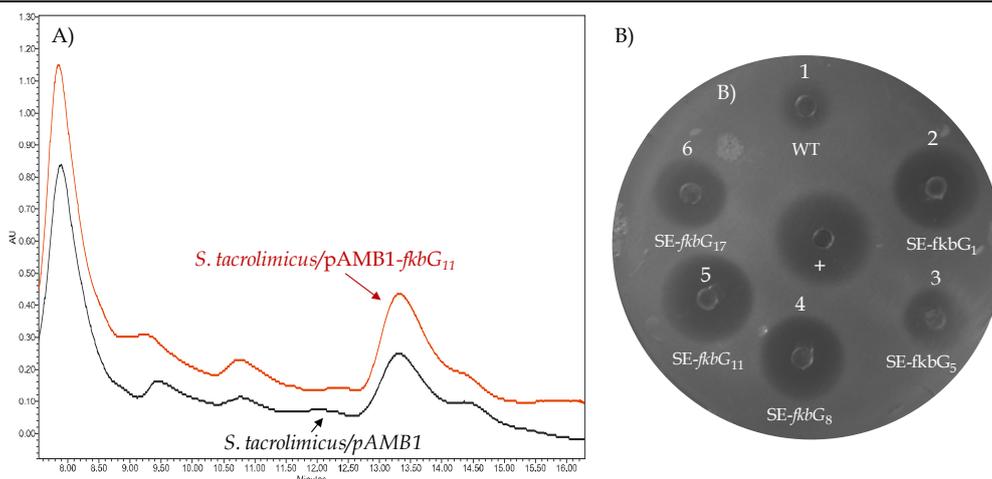


Figura 3.32. Análisis mediante bioensayo y HPLC del producto de la extracción de los cultivos en medio sólido. A) Cromatograma de los extractos obtenidos a partir los cultivos en medio sólido de las cepas *S. tacrolimicus*/pAMB1 (línea negra) y *S. tacrolimicus*/pAMB1-fkbG (línea roja). B) Placa de bioensayo utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* TB23 como microorganismo sensor. El halo del pocillo 1 corresponde a la muestra procedente de la extracción del cultivo de la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1. Los pocillos 2 a 6 corresponden a los cultivos de distintos clones de la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1-fkbG. El pocillo central corresponde a tacrolimus puro (5 μ g/ml) utilizado como control positivo.

Nuestros resultados implican que la introducción en multicopia del gen *fkfG* de *S. tsukubaensis* tiene un efecto positivo en la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus*. Estos datos son coherentes con los presentados en el trabajo de Chen *et al.* (2012), donde muestran que la duplicación de la agrupación de genes *fkfGHIJK* para la síntesis de la unidad extendedora metoximalonil-ACP en *S. tsukubaensis* produce un aumento de la producción del 30% con respecto a la cepa silvestre, si bien en este trabajo introducen una copia de toda la agrupación de genes *fkfGHIJK* y en nuestro caso únicamente el gen *fkfG*. Nuestros resultados confirman que el hecho de que se encuentre truncada la metiltransferasa, responsable de la reacción de metilación previa a la síntesis de la unidad extendedora metoximalonil-ACP, es un factor limitante para la síntesis de dicha unidad extendedora y en última instancia para la de tacrolimus. Sin embargo, la detección de producción en *S. tacrolimicus* supone que la actividad de dicho gen es reemplazado por otro, siendo uno de los principales candidatos el gen *orfG*.

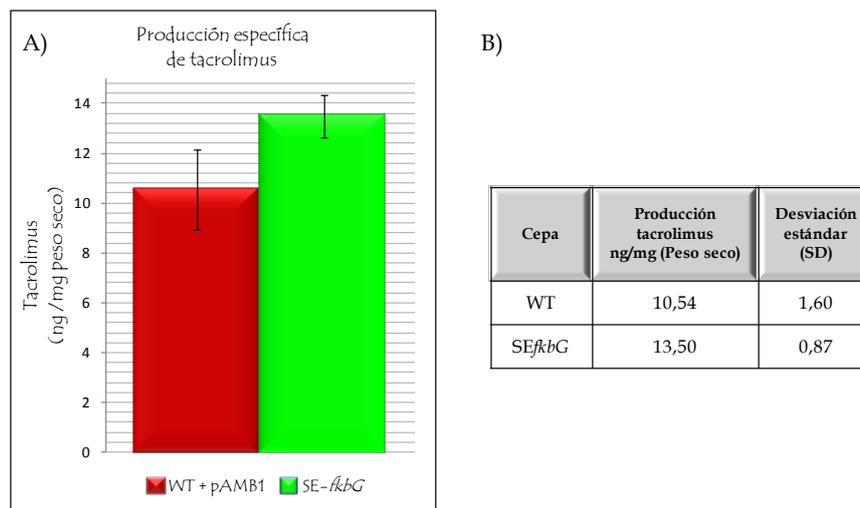


Figura 3.33. Resultados de la producción específica de tacrolimus en la cepa *S. tacrolimicus*/pAMB1 y *S. tacrolimicus*/pAMB1-fkfG. A) Gráfico que muestra los resultados de las fermentaciones realizadas en medio sólido. B) Valores de producción específica de tacrolimus y desviación estándar en las cepas estudiadas.

3.4.3. Análisis transcripcional de la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* mediante qRT-PCR

Una vez obtenidos los resultados de producción de tacrolimus en medio sólido tanto de la cepa silvestre como de los mutantes *S. tacrolimicus*: Δ *fkfN* y *S. tacrolimicus*: Δ *orfD*, procedimos a su validación mediante análisis transcripcional.

Debido a la baja producción de tacrolimus detectada en las fermentaciones de *S. tacrolimicus*, del orden de 13 ng/mg en la cepa silvestre, era necesario utilizar una técnica de análisis transcripcional que permitiera detectar pequeñas diferencias de expresión entre la

cepa silvestre y los mutantes, por lo que la qRT-PCR (del inglés “quantitative Real Time PCR”) fue el método de elección.

La qRT-PCR presenta alta sensibilidad y especificidad, buena reproducibilidad y un amplio rango de cuantificación, además es el método más sensible y fiable en casos de transcritos poco abundantes o con ARN parcialmente degradado (Nikitina *et al.*, 2003).

Para poder comparar los resultados a partir de las fermentaciones en medio sólido con los resultados obtenidos de las qRT-PCR era necesario llevar a cabo la extracción de ARN a partir de micelio crecido en medio sólido. Para ello fue necesario optimizar en primer lugar el protocolo de extracción de ARN de *S. tacrolimicus* a partir de medio sólido.

3.4.3.1. Optimización del protocolo de extracción de ARN de *S. tacrolimicus* a partir de medio sólido

El grado de integridad del ARN es esencial para obtener datos de expresión génica significativos, siendo necesario ARN de alta calidad, libre de ADN y no degradado para obtener resultados fiables (Becker *et al.*, 2010; Fleige y Pfaffl, 2006).

En un primer momento se empleó una adaptación de un método descrito para *Streptomyces* por Tunca *et al.*, 2007. Sin embargo, y debido a que obteníamos ARN completamente degradado, procedimos a hacer cambios, inicialmente en el protocolo de extracción y posteriormente en la muestra de partida.

En cuanto al protocolo fueron testadas diferentes concentraciones de lisozima (0, 0,15 y 0.3 mg/ml) para favorecer la ruptura de la pared celular tras agitación con vórtex, así como añadir bolas de vidrio para facilitar la disgregación mecánica del micelio. Con estas modificaciones se obtuvieron buenas concentraciones de ARN, aunque éste se encontraba degradado, por lo que parecía que el problema no estaba en la ruptura del micelio.

Por ello se fijó la concentración de lisozima en 0,15 mg/ml y se analizaron distintos tiempos de cultivo, recogiendo muestras a las 24 h (antes no se observa suficiente crecimiento en las placas de *S. tacrolimicus*), 48 y 72 h. En todos los casos se obtuvo ARN degradado, aunque con mejores índices de integridad a las 48 h que en el resto de los tiempos.

Finalmente se observó que el problema no estaba tanto en el protocolo de extracción o en los tiempos de recogida del micelio, sino que el problema radicaba en el material de partida utilizado para la extracción. En un principio las placas eran sembradas a partir de un vial de micelio conservado en glicerol al 20 % a -80 °C, asegurando que todas las extracciones se realizaban a partir del mismo inóculo de partida. Sin embargo, a pesar de que el crecimiento en placa era normal, la integridad del ARN se veía fuertemente afectada por el

glicerol y la congelación. Por ello, se decidió partir de un preinóculo fresco inoculado con esporas de *S. tacrolimicus* para cada siembra. En este caso se obtuvieron muestras con una buena integridad de ARN (*RNA Integrity number* "RIN") (Figura 3.34).

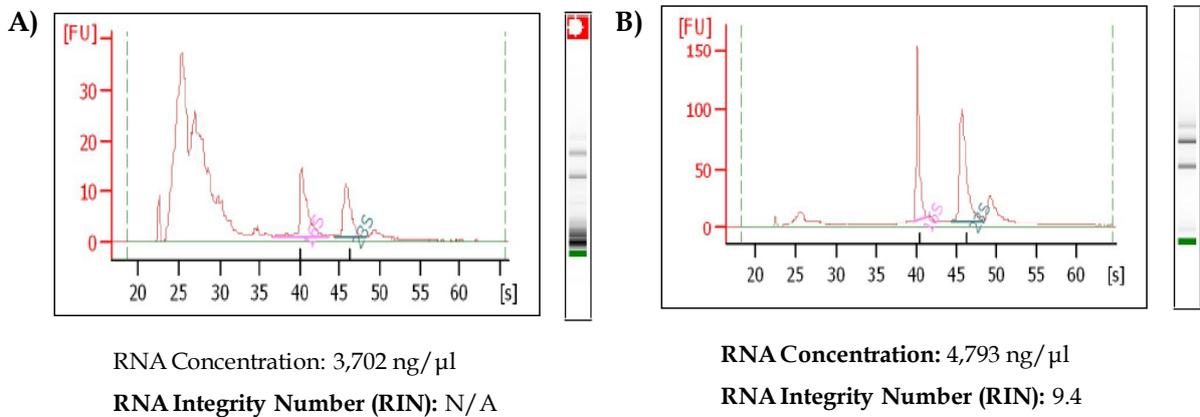


Figura 3.34. Resultado del proceso de optimización del protocolo de extracción del ARN sobre el número RIN de las muestras obtenidas. A) Electroforetograma de muestra con gran degradación de ARN (RIN no disponible) antes de optimizar el protocolo. **B)** Electroforetograma de muestra con una alta integridad de ARN (RIN 9.4) obtenida tras la optimización del protocolo de extracción de ARN a partir de fermentaciones en medio sólido.

Las condiciones finales elegidas para la extracción de ARN fueron las 48 h de cultivo en el medio de producción FKAm, estando el grado de integridad para todas las muestras especificado por el número RIN, entre 8,5 y 9,4 (sobre un máximo de 10). En cuanto a la pureza del ARN, en todos los casos la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) estuvo en el rango 1.9-2.1, confirmando de este modo que no estaba contaminado con proteínas. La relación A_{260}/A_{230} estaba cercana a 2, lo que indica que las muestras no estaban contaminadas con solventes orgánicos utilizados durante la extracción, como fenol, que pueden interferir en el experimento (Gallagher y Desjardins, 2006). Para asegurarnos de que el ARN no presentaba contaminación con ADN se analizaron las muestras en un gel de agarosa.

3.4.3.2. Diseño de oligonucleótidos para las qRT-PCR

Tras realizar un análisis informático de la agrupación génica de tacrolimus se decidió estudiar la expresión de los genes *orfD*, *orfL*, *orfG*, *fkbG*, *fkbL*, *fkbB*, *fkbO*, *fkbQ* y *fkbN* por ser los primeros genes de todos los posibles transcritos de la agrupación, utilizando el gen *hrdB* como referencia.

Diseñamos una pareja de oligonucleótidos para cada gen (Tabla 3.5 y anexo 6.1.VI) teniendo en cuenta el tamaño, la especificidad, la complementariedad, la T_m y la presencia de residuos G/C en el extremo 3' de los cebadores. En cuanto al tamaño, los cebadores tenían un tamaño de 17 a 25 nt, y el fragmento a amplificar estaba comprendido entre 90 a 200 pb.

Los oligonucleótidos fueron altamente específicos, no presentando complementariedad tanto intra-oligonucleótido como entre la pareja de cebadores. Se buscaron parejas de oligonucleótidos con una diferencia de T_m no superior a 4 y que en cuyo extremo 3' presentaran al menos 3 residuos de G o C para favorecer que dicho extremo hibride correctamente (Sharrocks y Shaw, 1992).

Tabla 3.5. Relación de cebadores empleados para la realización de los experimentos de qRT-PCR.

Gen	Cebadores PCR empleados	Tamaño amplicon (pb)	Eficiencia reacción (%)	T ^a óptima anillamiento (°C)
<i>hrdB</i>	hrdB U/ hrdB U	109	94.37	62
<i>fkbO</i>	fkbO QRT-U2/ fkbO QRT-D2	150	90.20	64
<i>fkbQ</i>	fkbQ QRT-U2/ fkbQ QRT-D2	96	93.12	66
<i>fkbN</i>	fkbN QRT-U1/ fkbN QRT-D1	92	88.15	64
<i>orfD</i>	orfD QRT-U1/ orfD QRT-D1	139	90.60	60
<i>orfL</i>	orfL QRT-U1/ orfL QRT-D1	186	97.19	62
<i>fkbG</i>	fkbG QRT-U1/ fkbG QRT-D1	100	97.05	62
<i>orfG</i>	orfG QRT-U1/ orfG QRT-D1	103	89.16	66

Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando dos programas informáticos (Primer 3 y Primer Select) asegurándonos así de que cumplieran las características mencionadas anteriormente. A pesar de ello, 3 de las parejas no funcionaron correctamente, la pareja *fkbO* QRT-U1/*fkbO* QRT-D1 formaba hibridaciones inespecíficas, la pareja *fkbQ* QRT-U1/*fkbQ* QRT-D1 presentaba problemas de dímeros y la pareja *fkbb* QRT-U1/*fkbb* QRT-D1 también produjo hibridaciones inespecíficas. En el caso del gen *fkbb*, codificante de una PKS, tras intentar 3 parejas distintas de cebadores decidimos no analizarlo por la imposibilidad de obtener hibridaciones específicas, ya que la alta repetición de secuencia de las PKS dificultó enormemente el diseño de oligonucleótidos específicos. En el caso de los otros dos genes finalmente se consiguieron parejas de cebadores que anillaban de manera específica (Figura 3.35).

Una vez obtenidos los oligonucleótidos específicos para cada gen objeto de estudio y determinada la temperatura a la cual los oligonucleótidos anillaban de manera específica, se analizó la eficiencia de cada reacción para dicha temperatura. El valor de la eficiencia de la reacción de PCR se obtuvo a partir de la curva standard realizada a partir de diluciones seriadas de ADNt (Pfaffl, 2001). Para obtener resultados precisos y reproducibles son aconsejables eficiencias cercanas o por encima del 90%. Una eficiencia del 100% indica que todas las moléculas (moldes) se duplican después de cada ciclo durante la fase exponencial. En la tabla 3.5 se muestran las eficiencias de la reacción de PCR para cada gen, siendo todas ellas cercanas o superiores al 90%.

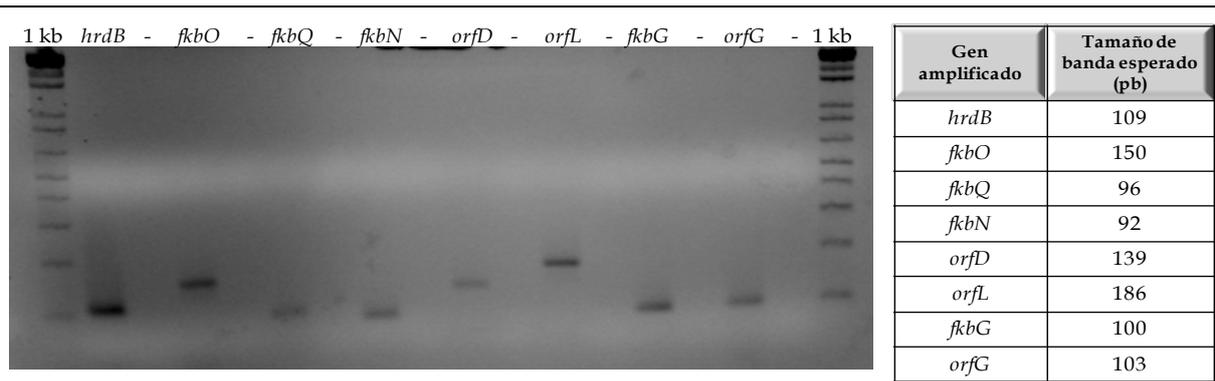


Figura 3.35. Comprobación mediante PCR de la especificidad de los cebadores diseñados para cada gen.

3.4.3.3. Retrotranscripción y reacción de PCR a tiempo real

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando la retrotranscriptasa Super Script™ III (apartado 2.15.1). La amplificación y cuantificación del ADNc mediante PCR a tiempo real se realizó usando SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystems), en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). El SYBR Green es un fluoróforo de unión específica al surco menor de la doble hélice de ADN y detecta cuantitativamente el amplicón mediante la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Si tenemos un único producto de PCR, el SYBR Green es especialmente útil ya que produce fondo inespecífico únicamente a ciclos muy tardíos.

El nivel de expresión de los genes fue medido mediante cuantificación relativa. La cuantificación relativa determina los cambios en los niveles de ARNm en estado estacionario de un gen en múltiples muestras y expresado en relación a los niveles de un control interno de ARN. En nuestro caso comparamos los niveles de expresión de varios genes de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* frente a los de los mutantes *S.tacrolimicus:ΔfkbN*, y *S.tacrolimicus:ΔorfD* y utilizando como referencia el gen constitutivo *hrdB*, que codifica el principal factor sigma de la ARN polimerasa. Para cada gen se realizaron 2 replicas biológicas y 3 replicas técnicas, realizando los experimentos por triplicado. Los cálculos fueron obtenidos a partir del modelo matemático de cuantificación relativa con corrección de la eficiencia desarrollado por Pfaffl (2001). En la ecuación de Pfaffl, la relación de la expresión relativa (R) del gen diana (objeto de estudio) es calculado en base a la eficiencia (E) y la desviación del Ct de una muestra desconocida (en nuestro caso el mutante) frente al control (cepa silvestre) y expresado en comparación con el gen de referencia, en nuestro caso *hrdB* (Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta C_{\text{t}}^{\text{diana}}(\text{control-mutante})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{\text{t}}^{\text{ref}}(\text{control-mutante})}}$$

3.4.3.4. Análisis transcripcional de los genes de biosíntesis de tacrolimus en la cepa *S.tacrolimicus:ΔfkbN* mediante qRT-PCR

Los resultados de producción de tacrolimus mostraron que la inactivación del gen regulador *fkbN* afecta negativamente a la producción de tacrolimus. Para validar los efectos de la delección del gen, llevamos a cabo un análisis comparativo de la expresión de los genes de la agrupación génica de tacrolimus en la cepa mutante *S.tacrolimicus:ΔfkbN* frente a la cepa silvestre, con el fin de dilucidar qué genes se encuentran bajo la regulación de *fkbN* ya sea de manera directa o bien mediada por factores intermedios.

Los resultados del análisis transcripcional mediante qRT-PCR del mutante *S.tacrolimicus:ΔfkbN* indican que todos los genes analizados se transcriben tanto en el mutante como en la cepa silvestre, produciéndose un descenso más pronunciado de la transcripción en los genes *fkbG* (descenso de 4.48 veces), *orfG* (7.14 veces) y *orfD* (5.33 veces) (Figura 3.36). Para los genes *orfL*, *fkbO* y *fkbQ* se obtuvieron disminuciones de expresión de 2,83, 1,62 y 2,29 veces, respectivamente (Figura 3.36). Por lo tanto, estos datos validan los resultados obtenidos tras los experimentos de producción por lo que se puede concluir que el gen *fkbN* actúa como un regulador positivo de la transcripción.

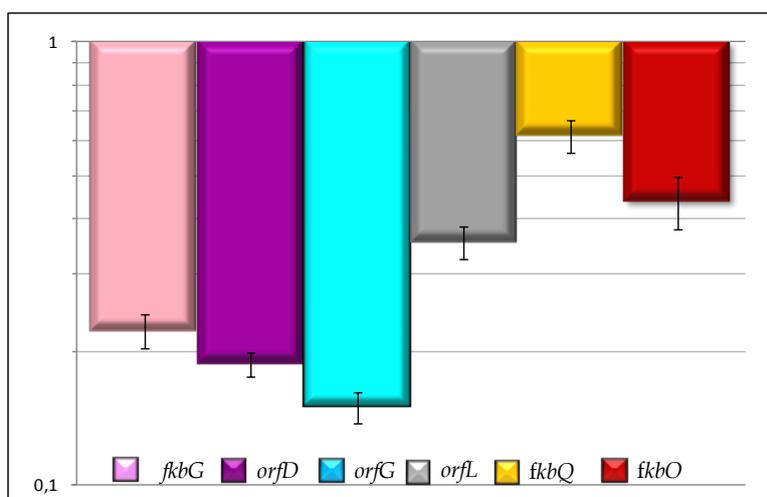


Figura 3.36. Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de los genes de la agrupación de tacrolimus en *S. tacrolimicus: ΔfkbN*. Representación, a escala logarítmica, de los niveles de expresión relativa en *S. tacrolimicus:ΔfkbN* en relación a la de *S. tacrolimicus*, a la que se le asigna un valor relativo de 1. Las barras de error señalan la desviación estándar.

3.4.3.5. Análisis transcripcional de los genes de biosíntesis de tacrolimus en la cepa *S.tacrolimicus:ΔorfD* mediante qRT-PCR

Los análisis de HPLC de los extractos obtenidos a partir de la cepa mutante *S.tacrolimicus:ΔorfD* mostraron un aumento significativo de la producción de tacrolimus frente a la cepa silvestre, lo que indica que el gen *orfD* actúa como un regulador negativo de

la transcripción. Para validar estos resultados se llevó a cabo un análisis transcripcional cuantificando las diferencias de expresión entre la cepa mutante *S.tacrolimicus:ΔorfD* y la cepa silvestre. Los resultados de qRT-PCR mostraron que los niveles de expresión de todos los genes estudiados, a excepción de *fkbn*, eran mayores en el mutante *S. tacrolimicus:ΔorfD* que en la cepa parental.

Las metiltransferasas codificadas por los genes *fkbg* y *orfG* se expresaron 4,83 y 9,06 veces más que en la cepa parental. Los genes *orfL*, *fkq* y *fkbo* mostraron un nivel de expresión de 1,7, 2,18 y 2,5 veces más que en la cepa silvestre, respectivamente. El caso más significativo fue el del gen *fkbn*, para el que se obtuvo un valor relativo de 0,0017 (Figura 3.37), lo que equivale a una disminución de la expresión de 574 veces. Por tanto, el gen *orfD* regula positivamente al regulador *fkbn* y viceversa, aunque se desconoce el sistema por el que se ejerce la regulación (ver modelo propuesto en la Discusión).

De estos resultados también podemos concluir que el gen *orfG*, que codifica una metiltransferasa, forma parte de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus*, ya que se encuentra directa o indirectamente sometido a la regulación de los reguladores *fkbn* y *orfD*. Esto corrobora la hipótesis de que *orfG* suplente el papel de la metiltransferasa troncada y no funcional codificada por el gen *fkbg* y que es esencial para la síntesis de la unidad extendidora metoximalonil-ACP.

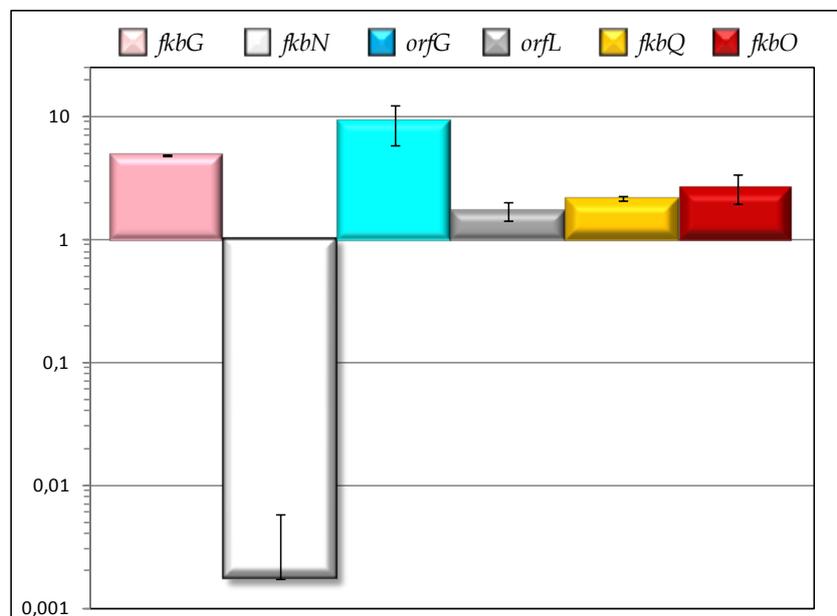


Figura 3.37. Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de los genes de la agrupación de tacrolimus en *S. tacrolimicus: ΔorfD*. Representación, a escala logarítmica, de los niveles de expresión relativa en *S. tacrolimicus:ΔorfD* en relación a la de *S. tacrolimicus*, a la que se le asigna un valor relativo de 1. Las barras de error señalan la desviación estándar.

Tras la comparación de la producción de tacrolimus entre las cepas mutantes *S.tacrolimicus:ΔfkbN* y *S.tacrolimicus:ΔorfD* y la cepa parental y la validación de los resultados con los análisis de expresión de los genes de la agrupación génica mediante qRT-PCR, podemos afirmar que la biosíntesis de tacrolimus está regulada positivamente por FkbN y negativamente por OrfD en *S. tacrolimicus*.

En el caso de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tsukubaensis* la regulación es ejercida por el regulador positivo FkbN, homólogo de FkbN de la agrupación de *S. tacrolimicus* y el regulador negativo de la familia LysR denominado FkbR (Goranovic *et al.*, 2012). Sin embargo, existe una discrepancia en la bibliografía sobre el papel regulador que ejerce dicha proteína, ya que el grupo de Goranovic *et al.* (2012) identifican a FkbR como un regulador positivo de la transcripción, mientras que su homólogo Tsc7 (e idéntico en la secuencia de aa) actúa como regulador negativo de la transcripción en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo *et al.*, 2012).

3.5. Discusión general

El descubrimiento de tacrolimus por Kino *et al.* en 1987 a partir de un cultivo de *S. tsukubaensis* supuso un hito en la búsqueda de fármacos inmunosupresores post-trasplante ya que, además de mejorar la viabilidad de los órganos trasplantados, permitió realizar trasplantes de otros órganos, como el intestino, no trasplantable hasta su aparición. Sin embargo, ya desde su aprobación por la FDA en 1994, las industrias farmacéuticas han tenido que enfrentarse a un elevado coste de producción debido a la baja productividad de las cepas microbianas industriales y al coste añadido que supone la eliminación de compuestos análogos como FK520 y FK506D, co-producidos durante el proceso de fermentación de las distintas cepas productoras de tacrolimus (Dumont *et al.*, 1992; Goto *et al.*, 1984; Hatanaka *et al.*, 1989). Por ello y especialmente desde la liberación de la patente en 2009, ostentada hasta entonces por Fujisawa Healthcare Co. (posteriormente Astellas Pharma), se han publicado un gran número de trabajos centrados en la optimización del título de producción de tacrolimus utilizando diversas estrategias que van desde la búsqueda de nuevas cepas productoras, obtención de cepas superproductoras mediante mutagénesis al azar con luz UV y nitrosoguanidina, mediante técnicas de ingeniería genética (interrupción o sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis o regulación de tacrolimus) o mediante técnicas de ingeniería metabólica (enriquecimiento del medio de cultivo con moléculas precursoras), entre otras. El empleo de una o varias de estas estrategias ha permitido incrementar la producción de tacrolimus desde títulos iniciales de menos de 10 mg/L en cultivos de *S. tsukubaensis* a títulos finales de 972 mg/L en cultivos de la cepa *Streptomyces* sp. TST10 obtenida mediante adaptación progresiva de la cepa a mayores concentraciones de tacrolimus (desde 600 a 1600 mg/L) en el medio de cultivo (Jung *et al.*, 2009).

En nuestro caso, el análisis de la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* requirió un paso previo de optimización del proceso de producción, ya que la extracción de tacrolimus a partir de las fermentaciones sumergidas no permitía detectar halos de inhibición en los análisis de bioensayo debido a la baja tasa de producción de tacrolimus por la cepa *S. tacrolimicus*. Por ello procedimos a optimizar la producción a partir del cultivo en medio sólido, lo cual nos permitió obtener una mayor productividad, una mayor concentración del producto final y un menor grado de contaminaciones. De este modo obtuvimos halos significativos en los bioensayos y conseguimos cuantificar la producción de tacrolimus que se estableció en una producción media de 13 ng/mg de peso seco para la cepa silvestre.

Una de las herramientas básicas para sobreproducir metabolitos secundarios pasa por el conocimiento de la secuencia completa de las agrupaciones génicas de biosíntesis. En el caso de tacrolimus los primeros depósitos de secuencia, correspondiente a la región central de la agrupación de tacrolimus de las cepas *S. tacrolimicus* y *Streptomyces* sp. MA6548, fueron realizados por un grupo de investigadores de los laboratorios Merck a finales de los 90 (Motamedi *et al.*, 1996; 1997; Motamedi y Shafiee, 1998). En nuestro trabajo se obtuvo la secuencia de las regiones flanqueantes de la zona central de la agrupación de tacrolimus de *S. tacrolimicus* y la secuencia completa de la agrupación de *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Tras analizar las secuencias de las dos agrupaciones obtenidas y junto con los recientes trabajos publicados por los grupos de Goranovic *et al.* (2010) y Mo *et al.* (2010) podemos constatar que existen dos tipos de agrupaciones génicas en las distintas cepas. En el primer grupo se encuentran las agrupaciones génicas de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, con alta identidad de secuencia y organización de CDSs. Estas dos agrupaciones presentan 5 genes adicionales (STSU_3250 a STSU_3270) situados entre las agrupaciones génicas de biosíntesis de las unidades extendedoras alilmalonil-CoA y metoximalonil-ACP, que no están presentes en las agrupaciones génicas de *S. tacrolimicus* y *S. kanamyceticus* KCTC 9225, que constituyen por tanto el segundo grupo. Posteriores experimentos de delección en marco prueban que estos genes no están implicados en la síntesis de tacrolimus, por lo que podemos establecer la agrupación de genes esenciales que deben estar presentes en las distintas cepas productoras de tacrolimus (Goranovic *et al.* 2010; Mo *et al.* 2010). Todas las agrupaciones deben constar de los genes codificantes de las PKS (*fkfA*, *fkfB* y *fkfC*), los genes responsables de la síntesis del anillo macrólido (*fkfQ*, *fkfL* y *fkfP*), los genes de biosíntesis de las unidades extendedoras metoximalonil-ACP (*fkfG*, *fkfH*, *fkfI*, *fkfJ* y *fkfK*) y alilmalonil-CoA (*fkfL*, *fkfL2*, *orfM* y *orfL*) denominados posteriormente *allA*, *allK*, *allR* y *allD* (Goranovic *et al.*, 2010) y *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* y *tcsD* (Mo *et al.*, 2011), respectivamente, los genes implicados en las modificaciones post-PKS (*fkfD* y *fkfM*) y el gen *fkfO*, codificante de la corismatasa que participa en la síntesis de la unidad iniciadora dihidroxixixlohexenilcarbonil-CoA.

Tras el análisis de la secuencia de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* y su comparación con el resto de las agrupaciones caracterizadas, observamos que el gen *fkfG* está truncado, no siendo la proteína funcional y por tanto no siendo teóricamente posible la producción de tacrolimus, ya que los derivados no metilados de tacrolimus en C12 y C15 no presentan actividad farmacológica inmunosupresora (Iwasaki *et al.*, 1995). Sin embargo, en las inmediaciones de los genes esenciales de la agrupación génica encontramos el gen *orfG*, que codifica una metiltransferasa y que puede reemplazar la función enzimática catalizada por la proteína FkfG truncada. Esta hipótesis se ve respaldada por la detección de tacrolimus

en las fermentaciones y por los resultados de qRT-PCR, donde se observa que la expresión del gen *orfG* está modulada por los reguladores de ruta FkbN y OrfD. Por otro lado, los experimentos de expresión heteróloga del gen *fkfG* de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 en *S. tacrolimicus* mostraron un aumento de la producción de un 28% frente a la cepa silvestre.

La biosíntesis de moléculas complejas policétidas como es el inmunosupresor tacrolimus debe estar fuertemente regulada por el alto coste energético que supone la síntesis de la maquinaria multienzimática requerida para su síntesis. Por ello procedimos al estudio de los posibles genes reguladores de ruta de la agrupación de *S. tacrolimicus*. Si comparamos las agrupaciones de las distintas cepas productoras aparece el gen *fkfN* como único gen regulador común. Dicho gen es esencial para la síntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, ya que su inactivación inhibe la producción de tacrolimus. Sin embargo, dichas cepas, a pesar de presentar una identidad de secuencia del 100 % para los genes de la agrupación de tacrolimus, muestran perfiles transcripcionales distintos. En la cepa *S. tsukubaensis* NRRL 18488, la transcripción de los genes estructurales estudiados no se ve completamente reprimida en el mutante *S. tsukubaensis*: Δ *fkfN* (Goranovic *et al.*, 2012). Este fenómeno se observa también en la agrupación génica de rapamicina de *S. hygroscopicus* (Kuscer *et al.*, 2007) y en la agrupación de picromicina de *S. venezuelae* (Wilson *et al.*, 2001).

En el caso de la agrupación génica de *S. tacrolimicus*, la inactivación del gen *fkfN*, aunque produjo una disminución drástica de la producción de tacrolimus (74 %), no llegó a inhibirla completamente. Esta disminución fue comprobada con los resultados de los análisis transcripcionales del mutante *S. tacrolimicus*: Δ *fkfN* frente a la cepa parental mediante qRT-PCR, donde los niveles de expresión de todos los genes estudiados fueron de 2 a 7 veces menores en la cepa mutante *S. tacrolimicus*: Δ *fkfN* que en la parental, actuando el gen *fkfN* como regulador positivo.

Aunque relativamente pocos reguladores de rutas biosintéticas de policétidos tipo LAL han sido identificados y analizados en detalle, aquellos caracterizados presentan diferentes mecanismos de regulación, ejerciendo en la mayoría de los casos papeles claves en la producción de metabolitos secundarios. Ejemplo de ello son los reguladores TcmN de la agrupación génica de biosíntesis de tautomisetina de *Streptomyces* sp. CK4412 y PikD de la agrupación de picromicina de *S. venezuelae*, únicos activadores específicos de ruta de sus respectivos agrupaciones (Hur *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2001).

El resto de los genes reguladores encontrados en la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* no están presentes en las agrupaciones del resto de cepas productoras caracterizadas. En la agrupación de tacrolimus de *S. tsukubaensis* NRRL 18488, aparecen dos

genes reguladores adicionales a *fkbn*, denominados *allN* y *fkbr*. FkbR pertenece a la familia de reguladores LysR y ha sido descrito como un elemento regulador positivo, no ejerciendo un efecto tan pronunciado en la producción de tacrolimus como el gen *fkbn*, ya que la inactivación del gen *fkbr* produce una disminución de la producción de tacrolimus del 80% en comparación con la cepa parental. Por el contrario AllN no ejerce efecto regulador en la producción de tacrolimus (Goranovic *et al.*, 2012). Por otro lado, la agrupación génica de *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, presenta también dos genes reguladores (además de *fkbn*) *tcs2* y *tcs7*, ortólogos a *allN* y *fkbr*, respectivamente. Al igual que AllN, Tcs2 no tiene efecto regulador en la síntesis de tacrolimus. Sin embargo, Tcs7 actúa como regulador negativo, efecto contrario a FkbR de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Mo *et al.*, 2012). Como explicación a esa diferencia funcional de los dos genes ortólogos se plantea la posibilidad de que las dos cepas presentes diferente regulación pleiotrópica (Goranovic *et al.*, 2012). La baja producción de tacrolimus por *S. tacrolimicus* podría ser debida a la ausencia del gen regulador *fkbr*. Los resultados de los experimentos de expresión heteróloga del gen *fkbr1*, homólogo del gen regulador *fkbr* para la síntesis de FK520 en *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus*, en *S. tacrolimicus* avalan esta hipótesis ya que demuestran que la introducción del regulador FkbR1 aumenta significativamente la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* llegando a triplicarla (Won *et al.*, 2008).

En el caso de la agrupación génica de tacrolimus de *S. tacrolimicus* fueron analizados 3 posibles genes reguladores de ruta, además de *fkbn*, denominados: *orfD*, *orfX* y *orfW*. Aunque los genes reguladores *orfX* y *orfW* no pudieron ser caracterizados funcionalmente por la imposibilidad de obtener dobles recombinantes mediante la tecnología REDIRECT[®], los experimentos de sobreexpresión indicaron que dichos genes no tienen efecto regulador en la producción de tacrolimus. Por otro lado el gen *orfD*, miembro la familia de reguladores TetR, ejerce un claro efecto en la síntesis de tacrolimus. Tras la inactivación del gen *orfD*, se observó un aumento de la producción de tacrolimus del 89 % de la cepa mutante *S. tacrolimicus:ΔorfD* frente a la cepa parental. Este dato fue verificado mediante análisis transcripcionales del mutante *S. tacrolimicus:ΔorfD* por qRT-PCR. Con todo ello OrfD fue caracterizado como un regulador negativo de la transcripción. Si bien aunque para todos los genes estudiados los niveles de expresión son de 2 a 9 veces mayores en la cepa *S. tacrolimicus:ΔorfD* que en la parental (regulador negativo), en el caso del gen *fkbn* los niveles de expresión fueron 500 veces menores en la cepa mutante, convirtiendo al gen *orfD* en un fuerte activador de la transcripción del otro regulador de ruta de la agrupación, *fkbn*. FkbN a su vez actúa como regulador positivo del gen regulador *orfD*, presentando éste un nivel de expresión 5 veces menor en la cepa *S. tacrolimicus:Δfkbn* que en la parental.

El número de reguladores de la familia TetR (a la que pertenece OrfD) disponibles en las bases de datos ha aumentado exponencialmente gracias a los avances en las técnicas de secuenciación existiendo en 2010 más de 20.000 miembros (Ahn *et al.*, 2012; Sahota y Stormo., 2010). Sin embargo, solo una pequeña cantidad han sido caracterizados, actuando en la mayoría de los casos como reguladores negativos de la transcripción. La delección del gen SAV151 de *S. avermitilis* produce un incremento de la producción de avermectina cercano al 100 %, disminuyendo un 70 % la producción tras su sobreexpresión (He *et al.*, 2014). Del mismo modo SAV7473 ha sido caracterizado como un regulador negativo de la transcripción afectando a la producción de avermectina de manera indirecta (Liu *et al.*, 2013). SAV576 también afecta a la producción de avermectina de manera negativa e indirecta mediante la represión directa de los genes SAV575 y SAV574, codificantes de una citocromo P450 reductasa y una deshidrogenasa, respectivamente (Gou *et al.*, 2013). Otro regulador de la familia TetR, GouR, localizado en la agrupación génica del antibiótico gougerotina de *S. graminearus*, juega un papel esencial en la biosíntesis del antibiótico reprimiendo la transcripción del operón *gouL-gouB* (formado por 11 genes estructurales) y activando la transcripción del gen transportador *gouM*, coordinando de este modo la biosíntesis y la exportación de gougerotina (Wei *et al.*, 2014).

Con los resultados obtenidos en este trabajo proponemos un modelo complejo de regulación para la activación y funcionalización de tacrolimus en *S. tacrolimicus* (Figura 3.38). Dicho modelo está basado en dos reguladores específicos de ruta: un regulador positivo de la familia LAL codificado por el gen *fbkN* y un regulador negativo de la familia TetR codificado por el gen *orfD* que activa fuertemente la transcripción de *fbkN* según los resultados de qRT-PCR. Para la activación completa de la síntesis de tacrolimus hipotetizamos con la existencia de otros reguladores positivos no caracterizado en este trabajo, ya que la producción de tacrolimus no se ve completamente inhibida tras la inactivación del gen *fbkN* (ver más abajo sobre el papel de este hipotético gen).

La regulación mediada de forma conjunta por reguladores de la familia LAL y TetR ha sido descrita en varios estreptomicetos. En la biosíntesis de avermectina en *S. avermitilis*, AveI (regulador de la familia TetR) actúa como regulador negativo de la producción de avermectina y AveR (regulador de la familia LAL) actúa como regulador positivo de la producción de avermectina y negativo de la producción de oligomicina (Chen *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010). En la agrupación de biosíntesis de geldanamicina de *S. hygrosopicus* se encuentran tres reguladores positivos, denominados Gel14, Gel17 y Gel19, que controlan la síntesis del compuesto anticancerígeno. Gel14 y Gel17 pertenecen a la familia de LAL y Gel19 a la familia TetR, actuando en cascada (Kim *et al.*, 2010). Otros ejemplos son la

agrupación génica de colismicina A de *Streptomyces* sp. CS40 regulada por el regulador positivo de la familia LAL ClmR2 y el regulador negativo de la familia TetR ClmR1 (Vior *et al.*, 2014), o la agrupación de biosíntesis de la tirandamicina en *Streptomyces* sp. SCSIO1666, cuya producción está controlada por el regulador positivo de la familia LAL TrdH y el regulador negativo TrdK de la familia TetR (Mo *et al.*, 2011). Un último ejemplo lo encontramos en la agrupación de estreptolidigina de *S. lydicus*, compuesto regulado de manera jerárquica mediante tres reguladores positivos específicos de ruta: SlgR1 regulador de familia TetR y SlgR2 y SlgY reguladores de la familia LAL (Gómez *et al.*, 2012).

Como se ha dicho anteriormente, en la regulación sobre la producción de tacrolimus en *S. tacrolimicus* estaría implicado un posible regulador adicional "X" (Figura 3.38), que hasta el momento se desconoce, y cuya presencia se deduce de los resultados de qRT-PCR. En condiciones normales, el papel de este gen apenas tendría importancia al estar fuertemente reprimido por OrfD (ver más adelante). En el caso del mutante *S. tacrolimicus*: $\Delta fkbN$, la eliminación de *fkbN* conlleva una disminución en la expresión de *orfD* (como se observa por qRT-PCR), lo que implicaría un aumento en la expresión del regulador "X", que sería el responsable en última instancia de la producción de tacrolimus detectada en el mutante (un 26 % respecto a la cepa parental). En el mutante *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$ apenas se detecta la expresión del principal regulador *fkbN* (574 veces menos), y aún así aumenta un 89 % la producción de tacrolimus. Este hecho sería explicable de nuevo por la presencia del regulador "X", cuya expresión aumentaría al no estar presente OrfD, siendo el responsable

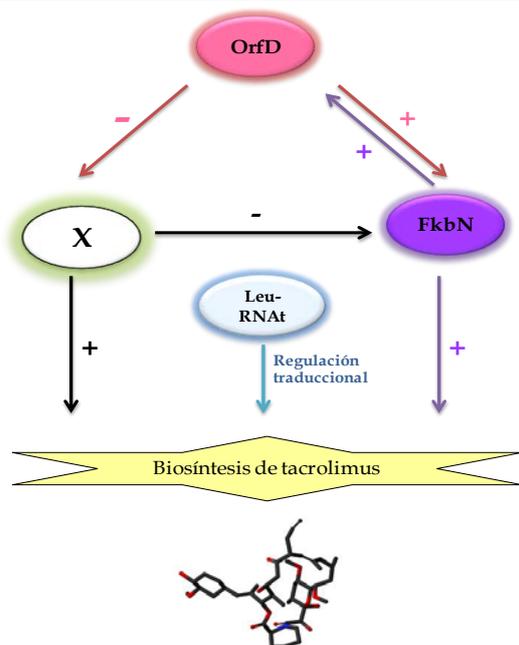


Figura 3.38. Modelo propuesto para la regulación de biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus*. El signo + indica regulación positiva y el signo - regulación negativa. La "X" representa un posible regulador específico de ruta desconocido hasta el momento.

del aumento de la producción de tacrolimus. La hipotética fuerte represión de OrfD sobre el gen "X" se deduce por la diferencia de expresión entre los mutantes *S. tacrolimicus*: $\Delta fkbN$ y *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$. En ambos casos la expresión de *fkbN* sería muy baja, ya que en uno de los mutantes ($\Delta fkbN$) el gen ha sido totalmente eliminado (y no habría expresión) y en el otro ($\Delta orfD$) la expresión disminuye cerca 574 veces. Sin embargo, en el mutante *S. tacrolimicus*: $\Delta orfD$ la producción de tacrolimus es más de 7 veces mayor que en *S. tacrolimicus*: $\Delta fkbN$, lo que se explica porque en el primero el efecto represor de OrfD desaparece totalmente al no estar presente el gen *orfD*, mientras que en el segundo, aunque la expresión de dicho gen disminuye unas 5 veces, sigue habiendo expresión del mismo.

Además de los reguladores específicos de ruta, no se puede descartar una regulación pleiotrópica mediada por un gen tipo *bldA* codificante del ARNt de leucina. Prueba de ello es la existencia en la agrupación de tacrolimus de *S. tacrolimicus* de 7 codones TTA: 1 en el gen regulador *orfD*, 2 en el gen codificante de la policétido sintasa *fkbC*, 1 en el gen codificante de la PKS *fkbB*, 1 en el gen codificante de la PKS *fkbA*, 1 en el codificante NRPS *fkbP* y 1 en el gen regulador *fkbN*. La existencia de puntos de regulación adicionales en los genes codificantes de las PKS y NRPS es habitual, puesto que son genes de gran tamaño (entre 11 y 22 kb las PKS y 4,5 kb *fkbP*) y su síntesis supone un elevado coste energético. Por otro lado, la existencia de codones TTA en los genes reguladores ha sido descrita previamente en otros reguladores específicos de ruta, donde ejercen un papel regulatorio esencial sobre la producción de los metabolitos que controlan. Ejemplo de ello es el gen regulador *actII-ORF4*, que presenta un codón TTA esencial para la síntesis de actinorrodina. El mutante *bldA* de *S. coelicolor* es defectivo en la producción de actinorrodina, aunque, la falta de producción se ve revertida cuando el codón TTA es sustituido por otro codón de leucina (Fernández-Moreno *et al.*, 1991). Del mismo modo los reguladores LndI de *S. globisporus* y AveR de *S. avermitilis* presentan un codón TTA en sus transcritos que resulta esencial para la síntesis de landomicina y avermectina, respectivamente (Rebets *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2007).

Este trabajo muestra un estudio detallado de las agrupaciones génicas de tacrolimus de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y *S. tacrolimicus*, así como proporciona valiosa información sobre el mecanismo regulador ejercido por FkbN y OrfD sobre la agrupación de tacrolimus en *S. tacrolimicus*. Finalmente, demuestra el potencial de manipular genes reguladores para incrementar el título de producción de tacrolimus, ya que tanto la sobreexpresión del gen *fkbN* como la delección de *orfD* conducen a un incremento de la producción del inmunosupresor tacrolimus

4. Conclusiones

1. La secuenciación y comparación de las agrupaciones génicas de biosíntesis de tacrolimus de las distintas especies estudiadas ha permitido determinar que los genes esenciales para la síntesis de tacrolimus son los genes codificantes de las PKS (*fkbA*, *fkbB* y *fkbC*), los genes para la formación del anillo macrólido (*fkbQ*, *fkbL* y *fkbP*), los genes de biosíntesis de las unidades extendedoras metoximalonil-CoA (*fkbG*, *fkbH*, *fkbl*, *fkbl* y *fkbl*) y alilmalonil-CoA (*fkbl*, *fkbl2*, *orfM* y *orfL*), y los genes *fkbl*, *fkbl* y *fkbl*.
2. Desde el punto de vista evolutivo existen dos tipos de agrupaciones génicas de biosíntesis de tacrolimus representadas por un lado por *S. tacrolimicus* y *S. kanamyceticus* KCTC 9225 y por otro por *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, que poseen 5 genes adicionales dentro de la agrupación, aunque sin estar implicados en la biosíntesis.
3. Los cultivos en medio sólido permiten detectar la baja producción de tacrolimus por la cepa *S. tacrolimicus*, cuya producción media se estima en 13 ng/mg de peso seco para la cepa silvestre.
4. El producto del gen *orfG*, situado en las inmediaciones de los genes esenciales de la agrupación de tacrolimus de *S. tacrolimicus*, reemplaza la función enzimática catalizada por la proteína FkbG, cuyo gen está truncado en el genoma.
5. La expresión heteróloga del gen *fkbl* de *S. tsukubaensis* en *S. tacrolimicus* conduce a un aumento significativo del 28 % en la producción de tacrolimus.
6. El regulador de la familia LAL FkbN controla positivamente la biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus* ya que su inactivación provoca una disminución drástica de la producción.
7. La interrupción del gen *fkbl* en *S. tacrolimicus* da lugar a un descenso en la expresión de los genes de la agrupación de tacrolimus estudiados (*orfG*, *orfD*, *fkbl*, *fkbl*, *orfL*, *fkbl*), lo que sugiere que la proteína FkbN actúa como regulador positivo de la transcripción de estos marcos de lectura.
8. El regulador de la familia TetR OrfD controla negativamente la biosíntesis de tacrolimus en *S. tacrolimicus*, ya que su inactivación provoca un incremento de la producción.
9. La interrupción del gen *orfD* en *S. tacrolimicus* afecta significativamente la expresión de los genes de la agrupación de tacrolimus estudiados (*orfG*, *fkbl*, *fkbl*, *orfL*, *fkbl*), cuya transcripción se ve aumentada.

10. La expresión del gen regulador *fkbN* disminuye drásticamente en el mutante *S. tacrolimicus*: Δ *orfD*, por lo que la presencia de la proteína OrfD tiene un efecto activador sobre la transcripción de *fkbN*.
11. Los genes reguladores *orfX* y *orfW* no tienen ningún efecto sobre la producción de tacrolimus, a pesar de encontrarse en las inmediaciones de la agrupación génica.

5. Bibliografía

A

- Ahn SK, Cuthbertson L, Nodwell JR. 2012.** Genome context as a predictive tool for identifying regulatory targets of the TetR family transcriptional regulators. *PLoS One*. 7(11):e50562.
- Alatoom AA, Aburto R, Hamood AN, Colmer-Hamood JA. 2007.** VceR negatively regulates the *vceCAB* MDR efflux operon and positively regulates its own synthesis in *Vibrio cholerae* 569B. *Can J Microbiol*. 53(7): 888-900.
- Albrecht A, Ottow JCG, Benckiser G. 1997.** Incomplete Denitrification (NO and N₂O) from Nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* Revealed by Acetylene Inhibition and ¹⁵N Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry Analyses. *Naturwissenschaften* 84, 145-147.
- Alloway RR, Sadaka B, Trofe-Clark J, Wiland A, Bloom RD. 2012.** A randomized pharmacokinetic study of generic tacrolimus versus reference tacrolimus in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 12(10): 2825-31.
- Altenbuchner J, Cullum J. 1984.** DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol Gen Genet*. 195(1-2):134-8.
- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Martínez-Burgo Y, Robles-Reglero V, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2014.** A 18-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(5):2183-95.
- Andexer JN, Kendrew SG, Nur-e-Alam M, Lazos O, Foster TA, Zimmermann AS, Warneck TD, Suthar D, Coates NJ, Koehn FE, Skotnicki JS, Carter GT, Gregory MA, Martin CJ, Moss SJ, Leadlay PF, Wilkinson B. 2011.** Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22;108(12): 4776-81.
- Antón N, Mendes MV, Martín JF, Aparicio JF. 2004.** Identification of PimR as a positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol*. 186(9):2567-75.
- Arai T, Kouama Y, Suenaga T, Honda H. 1962.** Ascomycin, an antifungal antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*. 15: 231-2.
- Arakawa K, Tsuda N, Taniguchi A, Kinashi H. 2012.** The butenolide signaling molecules SRB1 and SRB2 induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*. *Chembiochem*. 9;13(10):1447-57.
- Arias P, Fernández-Moreno MA, Malpartida F. 1999.** Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol*. 181(22):6958-68.
- Armitage JM, Kormos RL, Griffith BP, Hardesty RL, Fricker FJ, Stuart RS, Marrone GC, Todo S, Fung J, Starzl TE. 1991.** A clinical trial of FK 506 as primary and rescue immunosuppression in cardiac transplantation. *Transplant Proc*. 23(1 Pt 2): 1149-52.
- Arndt C, Cruz MC, Cardenas ME, Heitman J. 1999.** Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 145 (Pt 8): 1989-2000.
- Aroonsri A, Kitani S, Choi SU, Nihira T. 2008.** Isolation and characterization of *bamA* genes, homologues of the gamma-butyrolactone autoregulator-receptor gene in *Amycolatopsis mediterranei*, a rifamycin producer. *Biotechnol Lett*. 30(11):2019-24.

B

- Bakal CJ, Davies JE. 2000.** No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends Cell Biol.* 10(1): 32-8.
- Ban YH, Lee JH, Gu GR, Lee B, Mo S, Kwon HJ, Yoon YJ. 2013a.** Mutational biosynthesis of a FK506 analogue containing a non-natural starter unit. *Mol Biosyst.* 9(5):944-7.
- Ban YH, Shinde PB, Hwang JY, Song MC, Kim DH, Lim SK, Sohng JK, Yoon YJ. 2013b.** Characterization of FK506 biosynthetic intermediates involved in post-PKS elaboration. *J Nat Prod.* 28;76(6):1091-8.
- Bao K, Cohen SN. 2001.** Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* 15;15(12):1518-27.
- Baranasic D, Gacesa R, Starcevic A, Zucko J, Blazic M, Horvat M, Gjuracic K, Fujs S, Hranueli D, Kosec G, Cullum J, Petkovic H. 2013.** Draft Genome Sequence of *Streptomyces rapamycinicus* Strain NRRL 5491, the Producer of the Immunosuppressant Rapamycin. *Genome Announc.* 8;1(4).
- Barreiro C, Martínez-Castro M. 2014.** Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(2):497-507.
- Barreiro C, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J, Salehi-Najafabadi Z, Rodríguez-García A, Tauch A, Martín JF. 2012.** Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol.* 194(14):3756-7.
- Bassler BL. 2002.** Small talk Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 17;109(4):421-4.
- Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, Westerhoff HV, van Spanning RJ. 2004.** Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol Microbiol.* 54(1):148-58.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. 2010.** mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods.* 50(4): 237-43.
- Beinert H, Emptage MH, Dreyer JL, Scott RA, Hahn JE, Hodgson KO, Thomson AJ. 1983.** Iron-sulfur stoichiometry and structure of iron-sulfur clusters in three-iron proteins: evidence for [3Fe-4S] clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(2):393-6.
- Benson A, Barrett T, Sparberg M, Buchman AL. 2008.** Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. *Inflamm Bowel Dis.* 14(1): 7-12.
- Bentley R, Meganathan R. 1981.** Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in streptomycetes. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS Lett.* 23; 125(2): 220-2.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 9; 417(6885): 141-7.
- Bérdy J. 2012.** Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo).* 65(8):441.

- Berger LR, Reynolds DM. 1958.** The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim Biophys Acta*. 29(3):522-34.
- Bibb M. 1996.** 1995 Colworth Prize Lecture The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 142 (Pt 6): 1335-44.
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE .1992.** Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*. 116(1):43-9.
- Bignell DR, Bate N, Cundliffe E. 2007.** Regulation of tylosin production: role of a TylP-interactive ligand. *Mol Microbiol*. 63(3):838-47.
- Bignell DR, Huguet-Tapia JC, Joshi MV, Pettis GS, Loria R. 2010.** What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 98(2): 179-94.
- Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB. 1951.** Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Br Med J*. 1(4716):1157-63.
- Birnboim HC, Doly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 24:7(6):1513-23.
- Bloom RD, Trofe-Clark J, Wiland A, Alloway RR. 2013.** A randomized, crossover pharmacokinetic study comparing generic tacrolimus vs the reference formulation in subpopulations of kidney transplant patients. *Clin Transplant*.
- Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. 1976.** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 6(4): 468-75.
- Botas, A. 2013.** Regulación del metabolismo en *Streptomyces*. Control por ArgR. Tesis Doctoral.
- Breuder T, Hemenway CS, Movva NR, Cardenas ME, Heitman J. 1994.** Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(12): 5372-5376.
- Brinkman AB, Ettema TJ, de Vos WM, van der Oost J. 2003.** The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol*. 48(2): 287-94.
- Buchanan R E. 1918.** Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. VIII. The subgroups and genera of the *Actinomycetales*. *J Bacteriol* 3, 403-406.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987.** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E.coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*. 5(4): 376-378.
- Bustin SA. 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25. 169-193.
- Busuttil RW, Holt CD. 1998.** Tacrolimus is superior to cyclosporine in liver transplantation. *Transplant Proc*. 30(5): 2174-8.
- Buttner MJ, Chater KF, Bibb MJ. 1990.** Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*. 172. 3367-3378.

C

- Cabri W, Morra L, Paisonni P, Roletto J. 2005.** Process for the purification of tacrolimus. Patent application WO2006048145A1.
- Carlson JC, Fortman JL, Anzai Y, Li S, Burr DA, Sherman DH. 2010.** Identification of the tirandamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp 307-9. *Chembiochem*. 1;11(4):564-72.

- Carmody M, Byrne B, Murphy B, Breen C, Lynch S, Flood E, Finnan S, Caffrey P. 2004.** Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques. *Gene*. 8;343(1):107-15.
- Carro L, Zúñiga P, de la Calle F, Trujillo ME. 2012.** *Streptomyces pharmamarensis* sp nov isolated from a marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(Pt 5):1165-70.
- Chakraborty R, Bibb M. 1997.** The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol*. 179(18):5854-61.
- Chandra G, Chater KF. 2008.** Evolutionary flux of potentially *bldA*-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 94(1): 111-26.
- Chao YP, Xie FH, Yang J, Lu JH, Qian SJ. 2007.** Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *J Environ Sci (China)*. 19(9):1125-8.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010.** The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*. 34(2): 171-98.
- Chater KF, Chandra G. 2008.** The use of the rare UUA codon to define "expression space" for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J Microbiol*. 46(1):1-11.
- Chater KF, Hopwood DA, Kieser T y Thompson CJ. 1992.** Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 96:69-95.
- Chater KF. 2006.** *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 29; 361(1469): 761-8.
- Chatterjee A, Cui Y, Hasegawa H, Chatterjee AK. 2007.** *PsrA*, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* tomato strain DC3000. *Appl Environ Microbiol*. 73(11): 3684-94.
- Chaudhary AK, Dhakal D, Sohng JK. 2013.** An insight into the "-omics" based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction. *Biomed Res Int*.
- Chen D, Zhang L, Pang B, Chen J, Xu Z, Abe I, Liu W. 2013.** FK506 maturation involves a cytochrome p450 protein-catalyzed four-electron C-9 oxidation in parallel with a C-31 O-methylation. *J Bacteriol*. 195(9):1931-9.
- Chen D, Zhang Q, Zhang Q, Cen P, Xu Z, Liu W. 2012.** Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Appl Environ Microbiol*. 78(15):5093-103.
- Chen L, Lu Y, Chen J, Zhang W, Shu D, Qin Z, Yang S, Jiang W. 2008.** Characterization of a negative regulator *AveI* for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80(2):277-86.
- Chen S, Huang X, Zhou X, Bai L, He J, Jeong KJ, Lee SY, Deng Z. 2003.** Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol*. 10(11):1065-76.
- Chen W, He F, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. 2010.** Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *BMC Microbiol*. 26;10:198.

Choi SH, Greenberg EP. 1992. Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol.* 174(12):4064-9.

Christen S, Srinivas A, Bähler P, Zeller A, Pridmore D, Bieniossek C, Baumann U, Erni B. 2006. Regulation of the Dha operon of *Lactococcus lactis*: a deviation from the rule followed by the TetR family of transcription regulators. *J Biol Chem.* 11;281(32):23129-37

Clarke L, Carbon J. 1976. A colony bank containing synthetic *Col El* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell.* 9(1): 91-99.

Cohen SN. 2013. DNA cloning: A personal view after 40 years. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(39): 15521-9.

Corre C, Song L, O'Rourke S, Chater KF, Challis GL. 2008. 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;105(45):17510-5.

Crawford DL, McCoy E. 1972. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. *Appl Microbiol.* 24(1):150-2.

Cross T. 1981. Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J Appl Bacteriol.* 50(3): 397-423.

Cruz H, Pérez C, Wellington E, Castro C, Servín-González L. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene.* 24;144(1):141-2.

Cundliffe E. 2008. Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J Microbiol Biotechnol.* 18(9):1485-91.

Cvak L, Buchta M, Jegorov A, Blatny P, Keri V, Csorvasi A, Simon A, Mako G. 2007. Process for purifying tacrolimus. Patent Application WO 2007106587 A2.2007.

D

Darriet P, Pons M, Lamy S, Dubourdieu D. 2000. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J Agric Food Chem.* 48(10): 4835-8.

Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12): 6640-6645.

Dausset J. 1958. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.* 20(1-4):156-66.

Daza A, Martín JF, Dominguez A, Gil JA. 1989. Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J Gen Microbiol.* 135(9): 2483-91.

de la Fuente A, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P. 2002. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol.* 184(23):6559-65.

De Schrijver A, De Mot R. 1999. A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology.* 145 (Pt 6):1287-8.

Débarbouillé M, Shuman HA, Silhavy TJ, Schwartz M. 1978. Dominant constitutive mutations in malT, the positive regulator gene of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 15;124(2):359-71.

Dittrich W, Betzler M, Schrempf H. 1991. An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein. *Mol Microbiol.* 15(11):2789-97.

Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill ME, Parsek MR, Nierman WC, Greenberg EP. 2009. Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. J Bacteriol. 191(12):3909-18.

Dumont F, Garrity GM, Fernandez IM, Matas TD. 1992. Process for producing FK-506. US Patent 5,116, 756.

E

Elliot M, Damji F, Passantino R, Chater K, Leskiw B. 1998. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. J Bacteriol. 180(6):1549-55.

Embley TM, Stackebrandt E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. Annu Rev Microbiol. 48: 257-89.

Ensign JC. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. Annu Rev Microbiol. 32:185-219.

Evans GA, Lewis K, Rothenberg BE. 1989. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. Gene. 79(1): 9-20.

F

Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem. 132(1): 6-13.

Ferdows MS, Barbour AG. 1989. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Proc Natl Acad Sci USA. 86(15): 5969-73.

Fernández-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, Malpartida F. 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. Cell. 23;66(4):769-80. PubMed PMID: 1878971.

Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, Cole J, Constantinidou C. 2007. The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. J Bacteriol. 189(12): 4410-7.

Fischer G, Kyriacou A, Decaris B, Leblond P. 1997. Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*. Biochimie. 79(9-10): 555-8.

Fischer M, Alderson J, van Keulen G, White J, Sawers RG. 2010. The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. Microbiology. 156.

Flaig W, Kutzner HJ. 1960. Contribution to the ecology of genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. Arch Mikrobiol. 35: 207-28.

Flårdh K, Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat Rev Microbiol. 7(1):36-49.

Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med. 27(2-3): 126-39.

Flett F, Mersinias V, Smith CP. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiol Lett. 155(2): 223-229.

Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. 2001. Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. J Biol Chem. 23;276(47):44297-306.

Fung JJ, Todo S, Jain A, McCauley J, Alessiani M, Scotti C, Starzl TE. 1990. Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. *Transplant Proc.* 22(1): 6-12.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176(2):269-75.

G

Gallagher SR, Desjardins PR. 2006. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Mol Biol.* Appendix 3:Appendix 3D.

Galperin MY, Higdon R, Kolker E. 2010. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst.* 6(4): 721-8.

Gao R, Mack TR, Stock AM. 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci.* 32(5): 225-34.

Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. 2005. The Revised Road Map to the Manual. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, *The Proteobacteria*, Part A, Introductory Essays (editado por Brenner, Krieg, Staley and Garrity). Springer, New York, pp. 159-206.

Garrity GM, Heimbuch BK, Motamedi H, Shafiee A. 1993. Genetic relationships among actinomycetes that produce the immunosuppressant macrolides FK506, FK520/FK523 and rapamycin. *J Ind Microbiol.* 12(1):42-7.

Garrity GM, JG Holt. 2001. The Road Map to the Manual. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol. 1 (edited by Boone and Castenholz). Springer, New York, pp. 119-155.

George DG, Hunt LT, Yeh LS, Barker WC. 1985. New perspectives on bacterial ferredoxin evolution. *J Mol Evol.* 22(1):20-31.

Gerber NN, Lechevalier HA. 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol.* 13(6):935-8.

Gerber NN. 1979. Volatile substances from actinomycetes: their role in the odor pollution of water. *CRC Crit Rev Microbiol.* 7(3):191-214.

Giel JL, Rodionov D, Liu M, Blattner FR, Kiley PJ. 2006. IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 60(4): 1058-75.

Gil JA, Naharro G, Villanueva JR, Martín JF. 1985. Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol.* 131(6):1279-87.

Glazebrook MA, Doull JL, Stuttard C, Vining LC. 1990. Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *J Gen Microbiol.* 136: 581-588.

Gómez C, Olano C, Méndez C, Salas JA. 2012. Three pathway-specific regulators control streptolydigin biosynthesis in *Streptomyces lydicus*. *Microbiology.* 158(Pt 10):2504-14. PubMed PMID: 22820841.

Gomez-Escribano JP, Martín JF, Hesketh A, Bibb MJ, Liras P. 2008. *Streptomyces clavuligerus* relA-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology.* 154(Pt 3):744-55.

Gonzalez FJ, Korzekwa KR. 1995. Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35:369-90.

- González JF, Venturi V. 2013.** A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci.* 18(3):167-74.
- Goodfellow M, Fiedler HP. 2010.** A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 98(2): 119-42.
- Goranovič D, Blažič M, Magdevska V, Horvat J, Kušcer E, Polak T, Santos-Aberturas J, Martínez-Castro M, Barreiro C, Mrak P, Kopitar G, Kosec G, Fujs S, Martín JF, Petković H. 2012.** FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. *BMC Microbiol.* 19;12:238.
- Goranovic D, Kosec G, Mrak P, Fujs S, Horvat J, Kuscer E, Kopitar G, Petkovic H. 2010.** Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. *J Biol Chem.* 7;285(19):14292-300.
- Goto T, Hatanaka H, Kino T, Okuhara M, Tanaka H. 1984.** Tricyclo compounds, a process for their production and a pharmaceutical composition containing the same. US Patent 4,894,366.
- Gravius B, Glocker D, Pigac J, Pandza K, Hranueli D, Cullum J. 1994.** The 387 kb linear plasmid pPZG101 of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. *Microbiology.* 140 (Pt 9): 2271-7.
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M. 2003.** Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(2): 277-301, table of contents.
- Guerini D. 1997.** Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(2): 271-5.
- Guerra SM, Rodríguez-García A, Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. 2012.** LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One.* 7(2):e31475.
- Guo J, Zhang X, Luo S, He F, Chen Z, Wen Y, Li J. 2013.** A novel TetR family transcriptional regulator, SAV576, negatively controls avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One.* 8(8):e71330.
- Guo J, Zhao J, Li L, Chen Z, Wen Y, Li J. 2010.** The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Mol Genet Genomics.* 283(2):123-33.
- Gust B, Kieser T, Chater KF. 2002.** REDIRECT© technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. John Innes Centre.

H

- Hammer-Jespersen, K. 1983.** Nucleoside catabolism. In *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms* (Munch-Petersen A, ed) pp. 203-258, Academic Press, London.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-580.
- Hanks SK, Hunter T. 1995.** Protein kinases 6 The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8): 576-96.
- Hatanaka H, Iwami M, Kino T, Goto T, Okuhara M. 1988.** FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces* I Taxonomy of the producing strain. *J Antibiot* (Tokyo). 41(11): 1586-91.
- Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M. 1989.** FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No 9993. *J Antibiot* (Tokyo). 42(4): 620-2.

- Haydock SF, Appleyard AN, Mironenko T, Lester J, Scott N, Leadlay PF. 2005.** Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. *Microbiology*. 151(Pt 10):3161-9.
- He F, Liu W, Sun D, Luo S, Chen Z, Wen Y, Li J. 2014.** Engineering of the TetR family transcriptional regulator SAV151 and its target genes increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(1):399-409.
- He W, Lei J, Liu Y, Wang Y. 2008.** The LuxR family members GdmRI and GdmRII are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Arch Microbiol*. 189(5):501-10.
- Heitman J, Movva NR, Hiestand PC, Hall MN. 1991.** FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1; 88(5): 1948-52.
- Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC. 1988.** A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(18): 6602-6.
- Hesketh A, Chen WJ, Ryding J, Chang S, Bibb M. 2007.** The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol*. 8(8):R161.
- Higashi T, Iwasaki Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007.** A-factor and phosphate depletion signals are transmitted to the grizazone biosynthesis genes via the pathway-specific transcriptional activator GriR. *J Bacteriol*. 189(9):3515-24.
- Higgins CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM, Davis NE. 1974.** The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. 27(4): 298-300.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 11. 1026-1030.
- Hillen W, Berens C. 1994.** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*. 48:345-69.
- Hirano S, Tanaka K, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2008.** Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 154(Pt 3): 905-14.
- Hobbs GC, CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. 1989.** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 31: 272-277.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J. 2004.** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64(2):175-86.
- Holmes DS, Quigley M. 1981.** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114. 193-197.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf. 1985.** Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory Manual. John Innes Foundation. Norwich, UK.
- Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. 2006.** The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol*. 61(5): 1237-51.
- Hopwood DA. 2007.** *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press.

- Horbal L, Rebets Y, Rabyk M, Luzhetskyy A, Ostash B, Welle E, Nakamura T, Fedorenko V, Bechthold A. 2010.** Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tü117. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(4):1069-79.
- Horinouchi S. 2002.** A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* 7:d2045-57.
- Horinouchi S. 2003.** AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30(8): 462-7.
- Hsiao NH, Kirby R. 2008.** Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 93(1-2): 1-25.
- Hu H, Lin HP, Xie Q, Li L, Xie XQ, Hong K. 2012.** *Streptomyces qinglanensis* sp nov, isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 3):596-600.
- Huang D, Li S, Xia M, Wen J, Jia X. 2013a.** Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement. *Microb Cell Fact.* 24:12:52.
- Huang D, Xia M, Li S, Wen J, Jia X. 2013b.** Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of *Streptomyces tsukubaensis* and exogenous feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40(9):1023-37.
- Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ, Cohen SN. 2005.** Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5):1276-87.
- Hur YA, Choi SS, Sherman DH, Kim ES. 2008.** Identification of TmcN as a pathway-specific positive regulator of tautomycetin biosynthesis in *Streptomyces* sp CK4412. *Microbiology.* 154(Pt 10):2912-9.
- Hwang JY, Kim HS, Kim SH, Oh HR, Nam DH. 2013.** Organization and characterization of a biosynthetic gene cluster for bafilomycin from *Streptomyces griseus* DSM 2608. *AMB Express.* 10;3(1):24.
- I**
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96(1): 23-28.
- Ishaque M, Kluepfel D. 1980.** Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can J Microbiol.* 26(2):183-9.
- Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, Shiba T, Hattori M. 2004.** The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12; 101(41): 14925-30.
- Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, Fujii Y, Sakuma S, Fujitsu T, Fujikawa A. 1995.** Further metabolism of FK506 (tacrolimus) Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos.* 23(1): 28-34.
- Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, Makowka L, Marsh JW, Koneru B, Stieber A. 1988.** Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc.* 20(1 Suppl 1): 498-504.
- J**
- Jarvie T, Harkins T. 2008.** De novo assembly and genomic structural variation analysis with genome sequencer FLX 3K long-tag paired end reads. *Biotechniques.* 44(6): 829-31.

Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes?. *FEMS Microbiol Lett.* 15;150(2):179-88.

Jiang C, Wang H, Kang Q, Liu J, Bai L. 2012. Cloning and characterization of the polyether salinomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces albus* XM211. *Appl Environ Microbiol.* 78(4):994-1003.

Jørgensen H, Degnes KF, Dikiy A, Fjaervik E, Klinkenberg G, Zotchev SB. 2010. Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam, ML-449. *Appl Environ Microbiol.* 76(1):283-93.

Jørgensen H, Degnes KF, Sletta H, Fjaervik E, Dikiy A, Herfindal L, Bruheim P, Klinkenberg G, Bredholt H, Nygård G, Døskeland SO, Ellingsen TE, Zotchev SB. 2009. Biosynthesis of macrolactam BE-14106 involves two distinct PKS systems and amino acid processing enzymes for generation of the aminoacyl starter unit. *Chem Biol.* 30;16(10):1109-21.

Juneja P, Hubrich F, Diederichs K, Welte W, Andexer JN. 2014. Mechanistic implications for the chorismatase FkbO based on the crystal structure. *J Mol Biol.* 9;426(1):105-15.

Jung S, Moon S, Lee K, Park YJ, Yoon S, Yoo YJ. 2009. Strain development of *Streptomyces* sp for tacrolimus production using sequential adaptation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(12):1467-71.

Jung WS, Yoo YJ, Park JW, Park SR, Han AR, Ban YH, Kim EJ, Kim E, Yoon YJ. 2011. A combined approach of classical mutagenesis and rational metabolic engineering improves rapamycin biosynthesis and provides insights into methylmalonyl-CoA precursor supply pathway in *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91(5):1389-97.

K

Kapadia M, Rolston KV, Han XY. 2007. Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Am J Clin Pathol.* 127(4): 619-24.

Karki S, Kwon SY, Yoo HG, Suh JW, Park SH, Kwon HJ. 2010. The methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus and the nearby gene with the beta-ketoacyl synthase domain are involved in the biosynthesis of galbonolides in *Streptomyces galbus*, but these loci are separate from the modular polyketide synthase gene cluster. *FEMS Microbiol Lett.* 310(1): 69-75.

Kawachi R, Akashi T, Kamitani Y, Sy A, Wangchaisoonthorn U, Nihira T, Yamada Y. 2000. Identification of an AfsA homologue (BarX) from *Streptomyces virginiae* as a pleiotropic regulator controlling autoregulator biosynthesis, virginiamycin biosynthesis and virginiamycin M1 resistance. *Mol Microbiol.* 36(2):302-13.

Kelly KS, Ochi K, Jones GH. 1991. Pleiotropic effects of a relC mutation in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol.* 173(7):2297-300.

Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD. 1997. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy.* 17(6): 1148-56.

Kendrew SG, Petkovic H, Gaisser S, Ready SJ, Gregory MA, Coates NJ, Nur-E-Alam M, Warneck T, Suthar D, Foster TA, McDonald L, Schlingman G, Koehn FE, Skotnicki JS, Carter GT, Moss SJ, Zhang MQ, Martin CJ, Sheridan RM, Wilkinson B. 2013. Recombinant strains for the enhanced production of bioengineered rapalogs. *Metab Eng.* 15:167-73.

Kendrick KE, Ensign JC. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bacteriol* 155: 357-366.

- Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, Kornitskaia EIa, Ivkina NS, Rapoport IA. 1967.** [The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*]. Dokl Akad Nauk SSSR. 177(1):232-5.
- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood DA. 2000.** Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, John Innes Centre, Norwich, Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom.
- Kieser T, Melton RE. 1988.** Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*. Gene. 65: 83-91.
- Kim B, Sahin N, Minnikin DE, Zakrzewska-Czerwinska J, Mordarski M, Goodfellow M. 1999.** Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp nov. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 1:7-17.
- Kim DH, Ryu JH, Lee KS, Lee BM, Lee MO, Lim SK, Maeng PJ. 2013.** Mutational biosynthesis of tacrolimus analogues by *fkbO* deletion mutant of *Streptomyces* sp KCTC 11604BP. Appl Microbiol Biotechnol. 97(13):5881-92.
- Kim DW, Hesketh A, Kim ES, Song JY, Lee DH, Kim IS, Chater KF, Lee KJ. 2008.** Complex extracellular interactions of proteases and a protease inhibitor influence multicellular development of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 70(5):1180-93.
- Kim ES, Hong HJ, Choi CY, Cohen SN. 2001.** Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. J Bacteriol. 183(7):2198-203.
- Kim HS, Park YI. 2007.** Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. J Microbiol Biotechnol. 17(10):1638-44.
- Kim HS, Park YI. 2008.** Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. J Biosci Bioeng. 105(4):418-21.
- Kim W, Lee JJ, Paik SG, Hong YS. 2010.** Identification of three positive regulators in the geldanamycin PKS gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* JCM4427. J Microbiol Biotechnol. 20(11):1484-90.
- Kinashi H, Shimaji-Murayama M. 1991.** Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 173(4): 1523-9.
- Kinashi H. 2011.** Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. J Antibiot (Tokyo). 64(1): 19-25.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. 1987.** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* I Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. J Antibiot (Tokyo). 40(9): 1249-55.
- Kirby R. 2011.** Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. FEMS Microbiol Lett. 319(1): 1-10.
- Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S, Nihira T. 2009.** Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 82(6):1089-96.
- Kitani S, Kinoshita H, Nihira T, Yamada Y. 1999.** In vitro analysis of the butyrolactone autoregulator receptor protein (FarA) of *Streptomyces lavendulae* FRI-5 reveals that FarA acts as a DNA-binding transcriptional regulator that controls its own synthesis. J Bacteriol. 181(16):5081-4.

- Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, Nihira T. 2011.** Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27;108(39):16410-5.
- Klieneberger-Nobel E. 1947.** The life cycle of sporing *Actinomyces* as revealed by a study of their structure and septation. *J Gen Microbiol.* 1(1): 22-32.
- Knirschová R, Nováková R, Fecková L, Timko J, Turna J, Bistáková J, Kormanec J. 2007.** Multiple regulatory genes in the salinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces albus* CCM 4719. *Folia Microbiol (Praha).* 52(4):359-65.
- Kölling R, Gielow A, Seufert W, Kücherer C, Messer W. 1988.** AsnC, a multifunctional regulator of genes located around the replication origin of *Escherichia coli*, oriC. *Mol Gen Genet.* 212(1): 99-104.
- Kölling R, Lothar H. 1985.** AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 164(1): 310-5.
- Korn-Wendisch F, Kutzner HJ. 1992.** The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes*, pp. 921±995. Edited by A. Balows, H. G. Tru\$per, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Kosec G, Goranovič D, Mrak P, Fujs S, Kušcer E, Horvat J, Kopitar G, Petković H. 2012.** Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506. *Metab Eng.* 14(1):39-46.
- Krug A, Wendisch VF, Bott M. 2005.** Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene acn in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* 7;280(1):585-95.
- Kuimova TF, Soina VS. 1981.** A submerged sporulation and ultrastructural changes in the mycelium of *Streptomyces chrysomallus*. *Hindustan Antibiot Bull* 23: 1-5.
- Kumar P, Sharma S, Shukla S, Maurya Rk, Katial V, Mitra A GP. 2007.** Production of tacrolimus (fk-506) using new *Streptomyces species*. US20070191415.
- Kumon Y, Sasaki Y, Kato I, Takaya N, Shoun H, Beppu T. 2002.** Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol.* 184(11): 2963-8.
- Kuscer E, Coates N, Challis I, Gregory M, Wilkinson B, Sheridan R, Petković H. 2007.** Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Bacteriol.* 189(13):4756-63.
- Kutzner HJ. 1981.** The family *Streptomycetaceae*. In *the Prokaryotes A handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Chapter 156, pag. 2028-90, vol. II. Springer Verlag: Berlin.
- L**
- Lacey J, Lacey ME. 1987.** Micro-organisms in the air of cotton mills. *Ann Occup Hyg.* 31(1):1-19.
- Laureti L, Song L, Huang S, Corre C, Leblond P, Challis GL, Aigle B. 2011.** Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12;108(15):6258-63.
- Lawrence JG, Hendrickson H. 2005.** Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. *Curr Opin Microbiol.* 8(5): 572-8.
- Leblond P, Redenbach M, Cullum J. 1993.** Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 175(11): 3422-9.
- Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. 2002.** *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 43(6):1413-30.

- Leskiw BK, Bibb MJ, Chater KF. 1991.** The use of a rare codon specifically during development?. *Mol Microbiol.* 5(12): 2861-7.
- Lezhava A, Mizukami T, Kajitani T, Kameoka D, Redenbach M, Shinkawa H, Nimi O, Kinashi H. 1995.** Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 177(22): 6492-8.
- Li C, Roege KE, Kelly WL. 2009.** Analysis of the indanomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167. *Chembiochem.* 17;10(6):1064-72.
- Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, Mehra S, Glod F, Kyung YS, Sherman DH, Hu WS. 2008.** Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics.* 29;9:56.
- Lightner A, Concepcion W, Grimm P. 2011.** Steroid avoidance in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 16(5) :477-82.
- Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993.** The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* 10(5): 923-33.
- Liu Y, Deng Z, Tan H, Deng Q, Cao L. 2014.** Characterization of cattle fecal *Streptomyces* strains converting cellulose and hemicelluloses into reducing sugars. *Environ Sci Pollut Res Int.* 28.
- Liu Y, Yan T, Jiang L, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. 2013.** Characterization of SAV7471, a TetR-family transcriptional regulator involved in the regulation of coenzyme A metabolism in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol.* 195(19):4365-72.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods.* 25. 402-408.
- Lloyd AB. 1969.** Dispersal of Streptomycetes in air. *J Gen Microbiol.* 57(1): 35-40.
- Lodder J. 1970.** The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: North Holland Publishing Co.
- Lombó F, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 1999.** The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol.* 181(2):642-7.
- Long CM, Virolle MJ, Chang SY, Chang S, Bibb MJ. 1987.** alpha-Amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases. *J Bacteriol.* 169(12):5745-54.
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whitman WB. 2012.** Road map of the Actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol. 2, The Actinobacteria, Part A (edited by Goodfellow, Kämpfer, Busse, Trujillo, Suzuki, Ludwig y Whitman). Springer, New York, pp. 1-28.

M

- Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE. 1996.** The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol.* 19(1):101-12.
- MacEachran DP, Stanton BA, O'Toole GA. 2008.** Cif is negatively regulated by the TetR family repressor CifR. *Infect Immun.* 2008 Jul;76(7):3197-206.
- Machida K, Arisawa A, Takeda S, Tsuchida T, Aritoku Y, Yoshida M, Ikeda H. 2008.** Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor macrolide, pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(11):2946-52.

- MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. 1992.** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*. 111: 61-68.
- Maddocks SE, Oyston PC. 2008.** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. 154(Pt 12):3609-23.
- Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. 2005.** ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*. 13(5):236-42.
- Maharjan S, Oh TJ, Lee HC, Sohng JK. 2009.** Identification and functional characterization of an afsR homolog regulatory gene from *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. *J Microbiol Biotechnol*. 19(2):121-7.
- Malpartida F, Hopwood DA. 1992.** Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host 1984. *Biotechnology*. 24:342-3.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008.** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*. 74(12): 3877-86.
- Manteca A, Fernández M, Sánchez J. 2005.** A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*. 151(Pt 11): 3689-97.
- Manteca A, Sanchez J, Jung HR, Schwämmle V, Jensen ON. 2010.** Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics*. 9(7): 1423-36.
- Manteca A, Sanchez J. 2009.** *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol*. 75(9):2920-4.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 15;437(7057):376-80.
- Martín JF, Liras P. 2010.** Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*. 13(3): 263-73.
- Martín JF, Sola-Landa A, Santos-Beneit F, Fernández-Martínez LT, Prieto C, Rodríguez-García A. 2011.** Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol*. 4(2):165-74.
- Martín JF. 2004.** Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol*. 186(16): 5197-201.
- Martínez-Castro M, Barreiro C, Romero F, Fernández-Chimeno RI, Martín JF. 2011.** *Streptomyces tacrolimicus* sp nov, a low producer of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Int J Syst Evol Microbiol*. 61(Pt 5):1084-8.
- Martínez-Castro M, Salehi-Najafabadi Z, Romero F, Pérez-Sanchiz R, Fernández-Chimeno RI, Martín JF, Barreiro C. 2013.** Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer *Streptomyces tsukubaensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97(5):2139-52.

- Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. 2009.** Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp ATCC 55098. *J Microbiol Methods*. 78(2): 150-4.
- Martínez-Castro M. 2011.** Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*. Tesis Doctoral.
- Mazodier P, Petter R, Thompson C. 1989.** Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J Bacteriol*. 171(6): 3583-3585.
- McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS. 2000.** Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet*. 29; 355(9201):376-7.
- McAlpine JB, Bachmann BO, Pirae M, Tremblay S, Alarco AM, Zazopoulos E, Farnet CM. 2005.** Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *J Nat Prod*. 68(4):493-6.
- McGregor JF. 1954.** Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces* sp. *J Gen Microbiol*. 11(1): 52-6.
- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. 2006.** The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;103(42): 15582-7.
- McMurry L, Petrucci RE Jr, Levy SB. 1980.** Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(7):3974-7.
- Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RA, Breitling R, Takano E. 2010.** The sequence of a 18-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol*. 12; 2: 212-24.
- Meier I, Wray LV, Hillen W. 1988.** Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* by the tandem *tet* operators O1 and O2. *EMBO J*. 7(2):567-72.
- Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy JB Jr, Dammin GJ. 1960.** Successful homotransplantation of the kidney between non-identical twins. *N Engl J Med*. 262:1251.
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A. 2003.** GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res*. 31(8): 2187-95.
- Migita A, Watanabe M, Hirose Y, Watanabe K, Tokiwano T, Kinashi H, Oikawa H. 2009.** Identification of a gene cluster of polyether antibiotic lasalocid from *Streptomyces lasaliensis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 73(1):169-76.
- Mikami Y, Miyashita K, Arai T. 1982.** Diaminopimelic acid profiles of alkalophilic and alkaline-resistant strains of Actinomycetes. *J Gen Microbiol*. 128(8): 1709-12.
- Miller JH. 1972.** *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Min SI, Ha J, Kim YS, Ahn SH, Park T, Park DD, Kim SM, Min SK, Hong H, Ahn C, Kim SJ. 2013.** Therapeutic equivalence and pharmacokinetics of generic tacrolimus formulation in de novo kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*.

- Mishra A, Verma S. 2012.** Optimization of process parameters for tacrolimus (FK506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology. *J Biochem Tech.* 3:419-425.
- Mo S, Ban YH, Park JW, Yoo YJ, Yoon YJ. 2009.** Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(12):1473-82.
- Mo S, Kim DH, Lee JH, Park JW, Basnet DB, Ban YH, Yoo YJ, Chen SW, Park SR, Choi EA, Kim E, Jin YY, Lee SK, Park JY, Liu Y, Lee MO, Lee KS, Kim SJ, Kim D, Park BC, Lee SG, Kwon HJ, Suh JW, Moore BS, Lim SK, Yoon YJ. 2011.** Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues. *J Am Chem Soc.* 2;133(4):976-85.
- Mo S, Lee SK, Jin YY, Oh CH, Suh JW. 2013.** Application of a combined approach involving classical random mutagenesis and metabolic engineering to enhance FK506 production in *Streptomyces* sp RM7011. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(7):3053-62.
- Mo S, Yoo YJ, Ban YH, Lee SK, Kim E, Suh JW, Yoon YJ. 2012.** Roles of *fkbN* in positive regulation and *tcs7* in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp strain KCTC 11604BP. *Appl Environ Microbiol.* 78(7):2249-55.
- Mo X, Wang Z, Wang B, Ma J, Huang H, Tian X, Zhang S, Zhang C, Ju J. 2011.** Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster of the bacterial RNA polymerase inhibitor tirandamycin from marine-derived *Streptomyces* sp SCSIO1666. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;406(3):341-7.
- Mochizuki S, Hiratsu K, Suwa M, Ishii T, Sugino F, Yamada K, Kinashi H. 2003.** The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol Microbiol.* 48(6): 1501-10.
- Molnár I, Aparicio JF, Haydock SF, Khaw LE, Schwecke T, König A, Staunton J, Leadlay PF. 1996.** Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene.* 22;169(1):1-7.
- Mondou F, Shareck F, Morosoli R, Kluepfel D. 1986.** Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene.* 49(3):323-9.
- Morita RY. 1985.** Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special emphasis of maintenance of the starved viable state. Edit. M. Fletcher and GD Floodgate . *Bacteria in their Natural Environments.* Academic Press. London. UK. 11-130.
- Motamedi H, Cai SJ, Shafiee A, Elliston KO. 1997.** Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *Eur J Biochem.* 15;244(1):74-80.
- Motamedi H, Shafiee A, Cai SJ, Streicher SL, Arison BH, Miller RR. 1996.** Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. *J Bacteriol.* 178(17):5243-8.
- Motamedi H, Shafiee A. 1998.** The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur J Biochem.* 15;256(3):528-34.
- Moya R, Hernández M, García-Martín AB, Ball AS, Arias ME. 2010.** Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresour Technol.* 101(7):2224-9.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. 2007. Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep.* 24(3):585-609.

Muramatsu H, Mokhtar SI, Katsuoka M, Ezaki M. 2005. Phylogenetic analysis of immunosuppressant FK506-producing streptomycete strains. *Actinomycetologica* 19: 33-39.

Muramatsu H, Nagai K. 2013. *Streptomyces tsukubensis* sp nov, a producer of the immunosuppressant tacrolimus. *J Antibiot (Tokyo).* 66(4): 251-4.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. 1963. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med.* 268: 1315-23.

Muth G, Farr M, Hartmann V, Wohlleben W. 1995. *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5: nucleotide sequence analysis of the self-transmissible minimal replicon and characterization of the replication mode. *Plasmid.* 33(2): 113-26.

N

Navas López VM, Blasco Alonso J, Sierra Salinas C, Barco Gálvez A, Vicioso Recio MI. 2009. Safety and efficacy of oral tacrolimus in the treatment of paediatric inflammatory bowel disease. *An Pediatr (Barc).* 70(6): 519-25.

Nikitina TV, Nazarova NI, Tishchenko LI, Tuohimaa P, Sedova VM. 2003. [Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431]. *Tsitologiya.* 45(4):392-402.

Nodwell JR, McGovern K, Losick R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 22(5):881-93.

Novella IS, Barbés C, Sánchez J. 1992. Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can J Microbiol* 38: 769-773.

O

Ochi K. 1987. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *J Bacteriol.* 169(8):3608-16.

Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11):4050-60.

Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, Tomono A, Horinouchi S. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(3):431-9.

Ohta Y, Ikeda M. 1978. Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 36(3): 487-491.

O'Keefe DP, Harder PA. 1991. Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol Microbiol.* 5(9):2099-105.

Olano C, Gómez C, Pérez M, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbajo RJ, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 2009. Deciphering biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin and generation of glycosylated derivatives. *Chem Biol.* 30;16(10):1031-44.

Olano C, Lombó F, Méndez C, Salas JA. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng.* 10(5):281-92.

Oliynyk M, Samborskyy M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol.* 25(4):447-53.

Oliynyk M, Stark CB, Bhatt A, Jones MA, Hughes-Thomas ZA, Wilkinson C, Oliynyk Z, Demydchuk Y, Staunton J, Leadlay PF. 2003. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. *Mol Microbiol.* 49(5):1179-90.

Otaka E, Ooi T. 1987. Examination of protein sequence homologies: IV Twenty-seven bacterial ferredoxins. *J Mol Evol.* 26(3):257-67.

Otsuka M, Ichinose K, Fujii I, Ebizuka Y. 2004. Cloning, sequencing, and functional analysis of an iterative type I polyketide synthase gene cluster for biosynthesis of the antitumor chlorinated polyenone neocarzilin in *Streptomyces carzinostaticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3468-76.

P

Pandza K, Pfalzer G, Cullum J, Hranueli D. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology.* 143 (Pt 5): 1493-501.

Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. 1998. Major facilitator superfamily; 62: 1-34.

Parajuli N, Viet HT, Ishida K, Tong HT, Lee HC, Liou K, Sohng JK. 2005. Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peuceitius* ATCC 27952. *Res Microbiol.* 156(5-6):707-12.

Park JW, Mo SJ, Park SR, Ban YH, Yoo YJ, Yoon YJ. 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP. *Anal Biochem.* 393(1):1-7.

Parkinson JS, Kofoid EC. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26:71-112.

Peczynska-Czoch, W. & M Mordarski. 1988. Actinomycete enzymes In: M. Goodfellow, S.T. Williams & M. Mordarski (eds.) *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, London, pp. 220 – 283.

Pellegrini GJ Jr, Graziano JC, Ragunathan L, Bhat MA, Hemashettar BM, Brown JM. 2012. Scalp abscess due to *Streptomyces cacaoi* subsp *cacaoi*, first report in a human infection. *J Clin Microbiol.* 50(4): 1484-6.

Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF. 1997. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol.* 179(6):2053-9.

Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF, Liras P. 1998. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. *Gene.* 12;211(2):311-21.

Perry J, Koteva K, Wright G. 2011. Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol Biosyst.* 7(5): 1388-98.

Petersen MA, Hyldig G, Strobel BW, Henriksen NH, Jørgensen NO. 2011. Chemical and sensory quantification of geosmin and 2-methylisoborneol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from recirculated aquacultures in relation to concentrations in basin water. *J Agric Food Chem.* 14;59(23): 12561-8.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1;29(9):e45.

Piel J, Hertweck C, Shipley PR, Hunt DM, Newman MS, Moore BS. 2000. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate *Streptomyces maritimus*: evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chem Biol.* 7(12): 943-55.

Pimentel-Elardo SM, Scheuermayer M, Kozytska S, Hentschel U. 2009. *Streptomyces axinellae* sp nov, isolated from the Mediterranean sponge *Axinella polypoides* (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 6):1433-7.

Pompeani AJ, Irgon JJ, Berger MF, Bulyk ML, Wingreen NS, Bassler BL. 2008. The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. *Mol Microbiol.* 70(1):76-88.

Ponseti JM, Gamez J, Azem J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. 2008. Tacrolimus for myasthenia gravis: a clinical study of 212 patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1132:254-63.

Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li XZ, Nishino T. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 21(4):713-24.

Possoz C, Ribard C, Gagnat J, Pernodet JL, Guérineau M. 2001. The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol Microbiol.* 42(1):159-66.

Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 16(5):466-71.

Q

Qin Z, Cohen SN. 1998. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Mol Microbiol.* 28(5):893-903.

Quintana ET, Wierzbicka K, Mackiewicz P, Osman A, Fahal AH, Hamid ME, Zakrzewska-Czerwinska J, Maldonado LA, Goodfellow M. 2008. *Streptomyces sudanensis* sp nov, a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 93(3): 305-13.

R

Raibaud O, Richet E. 1987. Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169(7):3059-61.

Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):326-56.

Rascher A, Hu Z, Buchanan GO, Reid R, Hutchinson CR. 2005. Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol.* 71(8):4862-71.

Rebets YV, Ostash BO, Fukuhara M, Nakamura T, Fedorenko VO. 2006. Expression of the regulatory protein LndI for landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 is controlled by the availability of tRNA for the rare UUA codon. *FEMS Microbiol Lett.* 256(1):30-7.

Recio E, Colinas A, Rumero A, Aparicio JF, Martín JF. 2004. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarcin production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem.* 1;279(40):41586-93.

- Redenbach M, Flett F, Piendl W, Glocker I, Rauland U, Wafzig O, Kliem R, Leblond P, Cullum J. 1993.** The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol Gen Genet.* 241(3-4):255-62.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. 1996.** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol.* 21: 77-96.
- Redenbach M, Scheel J, Schmidt U. 2000.** Chromosome topology and genome size of selected *actinomycetes* species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78(3-4): 227-35.
- Reeves CD, Chung LM, Liu Y, Xue Q, Carney JR, Revill WP, Katz L. 2002.** A new substrate specificity for acyl transferase domains of the ascomycin polyketide synthase in *Streptomyces hygrosopicus*. *J Biol Chem.* 277(11): 9155-9.
- Rho YT, Lee KJ. 1994.** Kinetic characterization of sporulation in *Streptomyces albidoflavus* SMF301 during submerged culture. *Microbiology* 140: 2061-2065.
- Rigali S, Nothhaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. 2006.** The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 61(5): 1237-51.
- Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP. 2008.** Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 9(7):670-5.
- Riley M, Anilionis A. 1978.** Evolution of the bacterial genome. *Annu Rev Microbiol.* 32: 519-60.
- Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martín JF. 2007.** Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant. *Proteomics.* 7(14): 2410-29.
- Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F, Martín JF. 2009.** Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnIII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37(10): 3230-42.
- Rolfes RJ, Zalkin H. 1990.** Purification of the *Escherichia coli* purine regulon repressor and identification of corepressors. *J Bacteriol.* 172(10): 5637-42.
- Ruddick SM, Williams ST. 1972.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. V. Some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. *Soil Bid. Biochem.* Vol. 4, pp. 93-103. Pergamon Press. Printed in Great Britain.
- Rueda B, Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. 2001.** Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Can J Microbiol.* 47(11): 1042-7.

S

- Sahota G, Stormo GD. 2010.** Novel sequence-based method for identifying transcription factor binding sites in prokaryotic genomes. *Bioinformatics.* 1;26(21):2672-7.
- Salehi-Najfabadi, Z. 2010.** Caracterización de los receptores de gamma butirrolactonas en las especies productoras de tacrolimus *Streptomyces tacrolimicus* y *Streptomyces tsukubaensis*. Análisis de sus sistemas de autoregulación. Tesis doctoral
- Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF. 2011.** Characterisation of a γ -butyrolactone receptor of *Streptomyces tacrolimicus*: effect on sporulation and tacrolimus biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92(5):971-84.

- Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Rodríguez-García A, Cruz A, López GE, Martín JF. 2014.** The gamma-butyrolactone receptors BulR1 and BulR2 of *Streptomyces tsukubaensis*: tacrolimus (FK506) and butyrolactone synthetases production control. *Appl Microbiol Biotechnol.* 22.
- Salituro GM, Dumont F, Garrity GM, Huang L, Jones ETT, Omstead MN, Fernandez IM Matas TD. 1993.** Process for producing FK506. US Patent 5,194,378
- Sambrook J, Russell DW. 2001.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sands MK, Roberts RB. 1952.** The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 63(4):505-11.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-5467.
- Santos CL, Correia-Neves M, Moradas-Ferreira P, Mendes MV. 2012.** A walk into the LuxR regulators of Actinobacteria: phylogenomic distribution and functional diversity. *PLoS One.* 7(10):e46758.
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Martín JF. 2012.** Overlapping binding of PhoP and AfsR to the promoter region of *glnR* in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol Res.* 167:532-535.
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín JF. 2009.** Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol.* 72(1):53-68.
- Sato M, Kaji S. 1980.** Screening for actinomycetes capable of producing pectinolytic enzymes. *Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 32:121-123.
- Savic M, Bratic I, Vasiljevic B. 2007.** *Streptomyces durmitorensis* sp nov, a producer of an FK506-like immunosuppressant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 9):2119-24.
- Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee PC, Horinouchi S. 2004.** Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene.* 9; 334:53-61.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. 1944.** Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 55:66.
- Schell MA. 1993.** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 47: 597-626.
- Schrempf H, Bujard H, Hopwood DA, Goebel W. 1975.** Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 121(2):416-21.
- Schrempf H, Goebel W. 1977.** Characterization of a plasmid from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 131(1):251-8.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006.** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 7:3.
- Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, Brennan RG. 2007.** Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol.* 368(4): 1042-50.

- Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, Luther C, Ruzicka FJ, Beinert H, Kiley PJ. 2001.** IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(26): 14895-900.
- Schwartz R, Dameshek W. 1959.** Drug-induced immunological tolerance. *Nature.* 13;183(4676):1682-3.
- Schwecke T, Aparicio JF, Molnár I, König A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortés J, Lester JB. 1995.** The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;92(17):7839-43.
- Sekurova ON, Brautaset T, Sletta H, Borgos SE, Jakobsen M ØM, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, Zotchev SB. 2004.** In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol.* 186(5):1345-54.
- Shafiee A, Motamedi H, Chen T. 1994.** Enzymology of FK-506 biosynthesis Purification and characterization of 31-O-desmethylFK-506 O: methyltransferase from *Streptomyces* sp MA6858. *Eur J Biochem.* 15;225(2):755-64.
- Sharrocks AD, Shaw PE. 1992.** Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 11;20(5):1147.
- Sheldon PJ, Busarow SB, Hutchinson CR. 2002.** Mapping the DNA-binding domain and target sequences of the *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis regulatory protein, DnrI. *Mol Microbiol.* 44(2):449-60.
- Shirling SB, Gottlieb D. 1966.** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 16: 313-340.
- Shoun H, Kano M, Baba I, Takaya N, Matsuo M. 1998.** Denitrification by *actinomycetes* and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *J Bacteriol.* 180(17): 4413-5.
- Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G. 2008.** Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants. *CNS Neurosci Ther.* 14(1): 36-46.
- Sigmund JM, Clark DC, Rainey FA, Anderson AS. 2003.** Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductases from natural populations of actinomycetes. *Microb Ecol.* 46(1):106-12.
- Silverberg JI, Silverberg NB. 2011.** Topical tacrolimus is more effective for treatment of vitiligo in patients of skin of color. *J Drugs Dermatol* (5): 507-10.
- Singh BP, Behera BK. 2009.** Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids. *Lett Appl Microbiol.* 49(2): 254-9.
- Singhaniaa RR, Patel AK, Soccolc CR, Pandeya A. 2009.** Recent advances in solid-state fermentation. *Review. Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18.
- Snell GI, Westall GP, Paraskeva MA. 2013.** Immunosuppression and Allograft Rejection Following Lung Transplantation: Evidence to Date. *Drugs.* 19.
- Sola-Landa A, Moura RS, Martín JF. 2003.** The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10): 6133-8.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Amin R, Wohlleben W, Martín JF. 2013.** Competition between the GlnR and PhoP regulators for the *glnA* and *amtB* promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 1; 41(3):1767-82.

- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF. 2008.** Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 36(4): 1358-68.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2005.** Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol.* 56(5): 1373-85.
- Southern EM. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stackebrandt E, Rainey F A, Ward-Rainey N L. 1997.** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 479-491.
- Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR. 1963.** The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. *Surg Gynecol Obstet.* 117: 385-95.
- Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. 1989.** FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet.* 28;2(8670):1000-4.
- Stent GS, Brenner S. 1961.** A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;47:2005-14.
- Stragier P, Richaud F, Borne F, Patte JC. 1983.** Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli* I Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J Mol Biol.* 5;168(2):307-20.
- Stratigopoulos G, Gandecha AR, Cundliffe E. 2002.** Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced gamma-butyrolactone receptor. *Mol Microbiol.* 45(3):735-44.
- Subramoni S, Venturi V. 2009.** LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology.* 155(Pt 5):1377-85.
- Sun Y, Zhou X, Tu G, Deng Z. 2003.** Identification of a gene cluster encoding meilingmycin biosynthesis among multiple polyketide synthase contigs isolated from *Streptomyces nanchangensis* NS3226. *Arch Microbiol.* 180(2):101-7.
- Świątek MA, Tenconi E, Rigali S, van Wezel GP. 2012.** Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production. *J Bacteriol.* 194(5):1136-44.
- Swift S, Lynch MJ, Fish L, Kirke DF, Tomás JM, Stewart GS, Williams P. 1999.** Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* (10):5192-9.
- Syed DG, Lee JC, Li WJ, Kim CJ, Agasar D. 2009.** Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour Technol.* 100(5):1868-71.

T

- Taguchi S, Nishiyama K, Kumagai I, Miura K. 1989.** Analysis of transcriptional control regions in the *Streptomyces* subtilisin-inhibitor-encoding gene. *Gene.* 14;84(2):279-86.
- Tahlan K, Ahn SK, Sing A, Bodnaruk TD, Willems AR, Davidson AR, Nodwell JR. 2007.** Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 63(4):951-61.
- Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. 1989.** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature.* 2; 337(6206): 473-5.

- Takano E, Gramajo HC, Strauch E, Andres N, White J, Bibb MJ. 1992.** Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 6(19):2797-804.
- Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, Chater K. 2005.** A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 56(2):465-79.
- Takano E. 2006.** Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 9(3):287-94.
- Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K, Miyasaka N. 2013.** Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3,267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.*
- Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007.** AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol.* 1;369(2):322-33.
- Tang GL, Cheng YQ, Shen B. 2004.** Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. *Chem Biol.* 11(1):33-45.
- Tao WX, Wu J, Deng ZX, Tao MF. 2007.** [Cloning of *bldA* and the effect on morphological differentiation and avermectins production in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 47(1):34-8.
- Tautz D, Renz M. 1983.** An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* 132(1): 14-19.
- Tandler MD, Burkholder PR. 1961.** Studies on the thermophilic actinomycetes I Methods of cultivation. *Appl Microbiol.* 9:394-9.
- Todd JD, Wexler M, Sawers G, Yeoman KH, Poole PS, Johnston AW. 2002.** RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* 148(Pt 12): 4059-71.
- Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos R, Jain A, Alessiani M, Takaya S, Shapiro R. 1990.** Liver, kidney, and thoracic organ transplantation under FK 506. *Ann Surg.* 212(3): 295-305; discussion 306-7.
- Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K, Reyes J, Nakamura K, Casavilla A, Selby R, Nour BM, Wright H, Fung JJ. 1991.** Intestinal transplantation in composite visceral grafts or alone. *Ann Surg.* 216(3): 223-33; discussion 233-4.
- Toft C, Andersson SG. 2010.** Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nat Rev Genet.* 11(7): 465-75.
- Torkkell S, Ylihonko K, Hakala J, Skurnik M, Mäntsälä P. 1997.** Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis. *Mol Gen Genet.* 256(2): 203-9.
- Tripathi G, Rawal SK. 1998.** Simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnology Techniques.* 12, 8, pp 629-631.
- Tsujibo H, Miyamoto K, Kuda T, Minami K, Sakamoto T, Hasegawa T, Inamori Y. 1992.** Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl Environ Microbiol.* 58(1):371-5.

Tucker NP, Hicks MG, Clarke TA, Crack JC, Chandra G, Le Brun NE, Dixon R, Hutchings MI. 2008. The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One*. 3(11): e3623.

Tunca S, Barreiro C, Sola-Landa A, Coque JJ, Martín JF. 2007. Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *FEBS J*. 274(4):1110-22.

Turło J, Gajzlerska W, Klimaszewska M, Król M, Dawidowski M, Gutkowska B. 2012. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. *Enzyme Microb Technol*. 10;51(6-7):388-95.

U

Uguru GC, Stephens KE, Stead JA, Towle JE, Baumberg S, McDowall KJ. 2005. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*. 58(1):131-50.

Ulrich LE, Zhulin IB. 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res*. 38(Database issue): D401-7.

Umeyama T, Lee PC, Ueda K, Horinouchi S. 1999. An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 145 (Pt 9):2281-92.

V

Van Keulen G, Jonkers HM, Claessen D, Dijkhuizen L, Wösten HA. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*. 185(4): 1455-8.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71(3): 495-548.

Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Perez-Maya AA, Ocampo-Candiani J. 2012. Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *J Bacteriol*. 194(10):2761-2.

Vior NM, Olano C, García I, Méndez C, Salas JA. 2014. Collismycin A biosynthesis in *Streptomyces* sp CS40 is regulated by iron levels through two pathway-specific regulators. *Microbiology*. 160(Pt 3):467-78.

Volff JN, Altenbuchner J. 1998. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol*. 27(2): 239-46.

W

Wainwright M. 1990. *Miracle Cure Story of Antibiotics*. Blackwell Publ. Ltd.Oxford.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1(8):945-51.

Wang CM, Cane DE. 2008. Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. *J Am Chem Soc*. 130(28): 8908-9.

Wang XJ, Yan YJ, Zhang B, An J, Wang JJ, Tian J, Jiang L, Chen YH, Huang SX, Yin M, Zhang J, Gao AL, Liu CX, Zhu ZX, Xiang WS. 2010. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchengensis*. *J Bacteriol*. 192(17):4526-7.

- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001.** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch Microbiol. 176(5):386-90.
- Weber T, Welzel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W. 2003.** Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. J Biotechnol. 19;106(2-3):221-32.
- Wei J, Tian Y, Niu G, Tan H. 2014.** GouR, a TetR family transcriptional regulator, coordinates the biosynthesis and export of gougerotin in *Streptomyces gramineus*. Appl Environ Microbiol. 80(2):714-22.
- Weickert MJ, Adhya S. 1992.** A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. J Biol Chem. 267(22): 15869-74.
- Wenzel SC, Williamson RM, Grünanger C, Xu J, Gerth K, Martinez RA, Moss SJ, Carroll BJ, Grond S, Unkefer CJ, Müller R, Floss HG. 2006.** On the biosynthetic origin of methoxymalonyl-acyl carrier protein, the substrate for incorporation of "glycolate" units into ansamitocin and soraphen A. J Am Chem Soc. 128(44): 14325-36.
- Weyland H. 1969.** Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. Nature. 223(5208): 858.
- Wietzorrek A, Bibb M. 1997.** A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. Mol Microbiol. 25(6):1181-4.
- Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dyé F, Lithgow JK, Downie JA. 2002.** N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. J Bacteriol. 184(16):4510-9.
- Willey J, Schwedock J, Losick R. 1993.** Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Genes Dev. 7(5):895-903.
- Williams ST, Flowers TH. 1978.** The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. Microbios. 20(80):99-106.
- Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. 2001.** Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. J Bacteriol. 183(11):3468-75.
- Won SJ, Yu JY, Jin KH, Kyoung SS. 2008.** Method for promoting production of FK506 by introducing fkbR1 gene encoding FK520 transcription regulator derived from *Streptomyces* sp. Korean Intellectual Property Office. KR100800222.
- Wu K, Chung L, Revill WP, Katz L, Reeves CD. 2000.** The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. Gene. 251(1): 81-90.

X

- Xia M, Huang D, Li S, Wen J, Jia X, Chen Y. 2013.** Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. Biotechnol Bioeng. 110(10):2717-30.
- Xu J, Wang Y, Xie SJ, Xu J, Xiao J, Ruan JS. 2009.** *Streptomyces xiamenensis* sp nov, isolated from mangrove sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 59(Pt 3):472-6.

Y

- Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. 2003.** SEARCHPKS: A program for detection and analysis of polyketide synthase domains. Nucleic Acids Res. 1;31(13):3654-8.

- Yagüe P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca A. 2013.** Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett.* 342(2): 79-88.
- Yang CC, Huang CH, Li CY, Tsay YG, Lee SC, Chen CW. 2002.** The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol Microbiol.* 43(2): 297-305.
- Yang HL, Zubay G, Urm E, Heiness G, Cashel M. 1974.** Effects of guanosine tetraphosphate, guanosine pentaphosphate, and beta-gamma methylenyl-guanosine pentaphosphate on gene expression of *Escherichia coli* in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(1):63-7.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1):103-19.
- Yeoman KH, Curson AR, Todd JD, Sawers G, Johnston AW. 2004.** Evidence that the *Rhizobium* regulatory protein RirA binds to cis-acting iron-responsive operators (IROs) at promoters of some Fe-regulated genes. *Microbiology.* 150(Pt 12): 4065-74.
- Yoon YJ, Kim JJ, Lim SK. 2013.** Novel tacrolimus analogues, a neuroprotective composition comprising the same, an immunosuppressive composition comprising the same, a method for preparing the same, and a mutant for producing the same. US Patent 2013/0230559 A1.
- Yu TW, Bai L, Clade D, Hoffmann D, Toelzer S, Trinh KQ, Xu J, Moss SJ, Leistner E, Floss HG. 2002.** The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(12): 7968-73.
- Yussim A, Shaharabani E, Mor E, Lustig S, Bar-Nathan N, Shmueli D, Sobolev V, Dorfman B, Or H, Shapira Z. 1996.** Conversion from cyclosporine to tacrolimus in hepatic and renal transplantation. *Transplant Proc.* 28(6): 3178-9.

Z

- Zhai J, Gu J, Yuan J, Chen J. Tacrolimus in the treatment of ocular diseases. 2011.** *BioDrugs.* 1;25(2):89-103.
- Zhao W, Zhong Y, Yuan H, Wang J, Zheng H, Wang Y, Cen X, Xu F, Bai J, Han X, Lu G, Zhu Y, Shao Z, Yan H, Li C, Peng N, Zhang Z, Zhang Y, Lin W, Fan Y, Qin Z, Hu Y, Zhu B, Wang S, Ding X, Zhao GP. 2010.** Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Res.* 20(10): 1096-108.
- Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. 2009.** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 3): 589-608.

6. Anexos

6.1. Oligonucleótidos

I. Cebadores empleados en la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tacrolimicus*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
fk1101	AACCTTCCTGGTCCCGTTCC	fk1407	ACATGGTGACCACCGTCCTC
fk1102	CCCGCCGACGACCTCATCTC	fk1408	TACGTGACGGCGCAGAACGA
fk1103	TGGCGTATCTCGGTCGACAC	fk1421	TTGCGTCTGTCCTCGAACCC
fk1104	AGCCTCCTTTGACGGCGTTG	fk2101	GTCACGGCGACCAGGGTGG
fk1105	TCGATGATCCGGACCGCAGA	fk2102	TGCAGGGTGTCCACCGCGTG
fk1106	GACTACTACTCCTCCACCGC	fk2103	CAGTGAGGTGGTGTGCCCCA
fk1107	AACCCTTCGATGTCTCCCGC	fk2104	TTGATCACCCGGGACACCGT
fk1108	GGTATTCCTCCTGTGGGCTT	fk2105	TGCTGTCTGCGCCAGTGTGA
fk1109	GTCGTGGCGTGGACATCAG	fk2106	TCGGTGTGTGCGGTGTGGC
fk1110	GAAGTGGCCTCGCAAATGGG	fk2107	ACTCTCGCTCTTCGGCAGTC
fk1111	TCATCGCCACACCGGAGATC	fk2108	TCGGCACCTTCTTCTACACC
fk1112B	CGGAGCGCAGCGCGGGCAGC	fk2120	CAACGTATTCCGCAAACCTGG
fk1112G	AAACCCTCAACACCATCCCC	fk2200	AGCCACCGGCACAGGTATCC
fk1112	ACTCCTCCTCGTTCTGCACG	fk2201	CCGTCGTGGGATGGCGTGC
fk1113	TCTCGATGTGGCCATCCTGG	fk2202	CTGCCCGGCGGCATCACGTC
fk1201	GCATCGCGGTAATCACTGCC	fk2203	CAAGGCGTTCGCCGACTCGG
fk1202	AGACGGGTCCCGATCGAGTC	fk2204	TCGTTGAGTTCTCCCGCAG
fk1203	CCTGCGTACGGCGGTGTTC	fk2205	GGCGGACGGCATCGGGCTCG
fk1204	TAGAGGACGAATGCGGCGAG	fk2206	AGTGCTCGCTCGCACTGGTC
fk1205	GTTGGTGCAGGGCGGTGTGA	fk2301	CGTCGCTGGCGAGCCTGTGC
fk1206	GTCAGCTCGCCGGTCAGACC	fk2302	GAGCTGCTCGCGGTACTCGG
fk1221	GAGAAGTATCCGCTGTTGCG	fk2303	TGACCGTGAGACGCTGCTGA
fk1301	TTCACCGTCGTCGCCGAGCA	fk2304	GGGGCTGCGTCGGGATTCTG
fk1302	AGGCGCCGCCGATGTCCGAG	fk2305	AAGAACGACCACGACCTGGC
fk1303	TCGACGGCCGAGGTCAGATC	fk2306	TGTGGCACCTGAAGCTGCTC
fk1304	TGGGCGAGTTCAGGTATCC	fk2307	GTCGATCAGCCCGGCGAGCA
fk1305	AGCAGTTCGCTGAAACG	fk2308	AACACCGCGTCTTCACGAG
fk1306	CTCTTGGCATGTACGGCTAT	fk2309	ACTGTCTTCGAGACCGAGCC
fk1307	CTCAGCACGTCGGCCACGC	fk2310	AAGGTGAAGTTCTCGCCGC
fk1308	TCACTTGACAGCGATCACCC	fk2311	TGGGCACGGGCTCGAACAGC
fk1308 b	GTAGAAACTGGCGAGCCAGC	fk2312	CGGGGTCGACGCCCATGAAG
fk1309	TTGAGGGCGGGCAGCACGAC	fk2313B	TCACACCCGAACGTGTCAC
fk1401	ACACCCTGCACGTCGAACTG	fk2313G	CGTGACGGATCGCCACCTGC
fk1402	TTTCATACCGTGCCTGCTCC	fk2313	GTCGGTGGATCGCACGGTGG
fk1403	TGTGGTCTGCTACGACTCG	fk2314	TCGGATTGGGGGCGTAGATC
fk1404	GTACGCGGGGACCTCAAGCT	fk2401	CGCGTGATCGTACTCAGTGG
fk1405	AACTCCGCCACGCTGATGGA	fk2402	TCCACGACGACCAGGATGTC
fk1406	GTCAGCCGCCACGAGGCCTG	fk2403	AGGTCGGCTGAGGCGATGTC

II. Cebadores empleados en la secuenciación de la agrupación génica de tacrolimus en *S. tsukubaensis*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
fkba-L42	CCATGCCTTCTTCGTCCGAG	fkbb-L51	ATGGTGATGGCGATGCGGCA
fkba-U42	ACCGTGCTGCGTGCCCGTCT	fkbb-L61	GTCCCGTCGTACCCGTAGAC
fkba-L61	CACGATGTCCTGCATCACGC	fkbb-L62	ACCACGCCATCCTCATCACC
fkba-U71	AAGATGGTGCAGGCGATCGG	fkbb-L71	ACGGTGCTTGCGGTGATTCCG
fkba-U72	CCCGCCGTGCGACTGGACCAC	fkbb-L81	TCGAACGCCGAACACTGTGC
fkba-L71	TACGGAACCCGTCGGTGTGCG	fkbc-L11	GAAGCTGGTGCTCACGGTGC
fkba-L72	TCGAAGAGGAAGGCGATGCG	fkbc-U11	TCGTGGTGGTGTTCCTTCGCC
fkbb-L11	GGGAAGCCCTCGCCGAACCTG	fkbc-L41	AGCTGTCGAGACCACGCAT
fkbb-L31	TCGGTCTTCGCCCTCCAAGT	fkbp-L	CCCACCACCACGTCCAGCGT
fkbb-U31	AATGGAAGGCGTGGCTGGTC	fkbp-U	AGGAACTGGATCCGGACAGC
fkbb-L41	GACGTATCACGCCGATGTCC	2023-L	TATGGGTGCCGCCGTTGATG
fkbb-U41	AGTCGAAGCCCACGTCTTTG	2023-U	ACGAAAGGGCAGGGACGACT

III. Cebadores empleados en el rastreo de la genoteca de *S.tacrolimicus* y *S.tsukubaensis*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
fkbb1	GGCATCAAGCACTGGCTGG	orfB1	ATGACGACCTCACCTCCGGA
fkbb2	GCCTCGAGTACCGTCCC	orfB2	ACACGGATTCGTACCGTTG
fkbb3	CGGCTCGTTCGACCTGTTC	fkbbO1	CACCGTACTGCCGCTTCGAGAA
fkbb4	CCGACGTGGAACACCACG	fkbbO2	ATCGACGTCCGGTGGGGCGTAA
fkbb5	GCCAACGTGACATCAAGC	fkbbO2-St	ATGTTGTCCAGGGCGACCTC
fkbb6	TTCGTGGTACTCGCCCTC	fkbbL1	GCAGTACGTCGAACGCGATG
fkbb7	TTCCGGCTGCCSACSATC	fkbbL2	CAACTATCAGCGATTCCGGC
fkbb8	AGCACGTGGAASGCGATGTG	fkbbM1	GAGACACTGCGACTGCCGAA
fkbb9	GGCAGTGATTACCGCGATGC	fkbbM2	ACGAACAGCGGTTCTCTGCTC
fkbb10	ACGCTCAGGCTGTCGATGTG		

IV. Cebadores empleados en la interrupción de los genes reguladores mediante tecnología REDIRECT®, cebadores de comprobación (PCR y Southern) y cebadores empleados en la sobreexpresión de los genes reguladores de *S. tacrolimicus* y del gen *fkbG* de *S. tsukubaensis*.

Nombre	Secuencia 5'→3'
fkbn-Up	ACCGATTTTCGACTACGGCCGCGAGGTGGTTCGGGAAGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
fkbn-Down	ACGGCCGGCTGAGCGGCTCCGGCAGCAGGGGCGCGGCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
orfD-Up	CCACCTCCCTGAATCCAGACGGGCTGAGCACCGGACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
orfD-Down	ACCAGTCGCGCAGGGTGTGGAGGAAGTCGGGCATCGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
orfW-Up	ACTATGTCCACTATCTCTCATCTCTAGGATGGAGACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC
orfW-Down	GGCGGCCCGGCGGGCTCCGTGACGGCGCCCGCTCGCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
orfX-Up	GCTCTGAGGCGGGTGGTAGGCGTCTGGCGGTCCGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
orfX-Down	AAAGCCGAGCGTGCGACCGGTCCGCCGTCCGTTACGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC

Nombre	Secuencia 5'→3'
fkbn RD1	TCGACGTGGAGAAGAGCGAA
fkbn RD2	ACCTCGTCGATCACCTGGAC
orfD RD1	TCCTGACCACTTCCAGCTGG
orfD RD2	CACTGCTGCGGAATAGTGC
fkbn-SE1	*CCACTAGTTGAGCGGCTCCGGCAGCAGG
fkbn-SE2	*CCACTAGTACCACCGCGCCGACGACCGT
orfD-SE1	*CCACTAGTCCGTGCACGACGGCACCGGA
orfD-SE2	*CCACTAGTGTGTGGAGGAAGTCGGGC
orfW-SE1	*CCACTAGTGCGCCCTGTCCTCGGGG
orfW-SE2	*CCACTAGTCTCCGTGACGGCGCCCGC
orfX-SE1	*CCACTAGTCCTGGCGTCTCCTACTCC
orfX-SE2	*CCACTAGTGAAAGCCGACCGTGCGAC
fkbg-SE1	*CCACTAGTGGTGGCCGGATGGGGAGG
fkbg-SE2	*CCACTAGTGAGCCCTCGCCGCGACCC
SouthernD1	ACACGGATTCGTCACGGT
SouthernD2	AAGAAGGTCCTGGCCGAC

*En negrita se indica la secuencia de corte de *SpeI*

V. Cebadores universales utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'→3'
T3-cos	GCCGCAATTAACCCTCACTAAAG
T7-cos	CATAATACGACTCACTATAGGGA

VI. Cebadores utilizados en los experimentos de qRT-PCR.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
orfD QRT U1	CTCAACAGAAAGCGGACA	fkbn QRT U1	CGAGCAGCCCCGATGAACT
orfD QRT D1	CGAAATAGCGGAAGAAGGT	fkbn QRT D1	ACCAGGCCCGTCCACTCC
orfL QRT U1	ACGGAAGCGGATCTGGTGGAG	fkbQ QRT U2	CTCACCGACACCGTCCA
orfL QRT D1	CAGGCCGTGGGAGTAGAAGAAAC	fkbQ QRT D2	TTCGTCATCCGCCAGCA
orfG QRT U1	CGGGGCAACGGGTCCTG	fkbo QRT U2	TGCGTCGTCTCGTGTCC
orfG QRT D1	CGCGGGCTGATGTCCAC	fkbo QRT D2	GAACCCCGCCGTCCTCAC
fkbg QRT U1	ACACCGCCACCCGGCAG	hrdB U	CGCGGCATGCTCTTCCT
fkbg QRT D1	CCGACGCACTCCTCGCTTAC	hrdB D	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC

6.2. Publicaciones y comunicaciones científicas

- En este apartado se recogen las publicaciones científicas derivadas de colaboraciones realizadas durante el desarrollo de parte del trabajo de esta tesis doctoral:

Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. 2009. Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp ATCC 55098. *J Microbiol Methods*. 78(2):150-4.

Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF. 2011. Characterisation of a γ -butyrolactone receptor of *Streptomyces tacrolimicus*: effect on sporulation and tacrolimus biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92(5):971-84. PubMed PMID: 21792593.

Barreiro C, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J, Salehi-Najafabadi Z, Rodríguez-García A, Tauch A, Martín JF. 2012. Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol*. 194(14):3756-7.

- A continuación se muestran el listado de comunicaciones a congresos donde han sido presentados parte de los resultados expuestos en la presente memoria:

Desarrollo de un sistema eficaz para el rastreo de una librería génica en el productor de tacrolimus *Streptomyces* sp. ATCC 55098. M. Martínez-Castro, C. Barreiro, A. Sola-Landa, E. Solera, J.F. Martín. XXI Congreso Nacional de Microbiología. 17-20 Septiembre 2007, Sevilla (Spain).

Molecular characterization of the genes involved in the biosynthesis of tacrolimus immunosuppressant in *Streptomyces* sp. ATCC 55098. Solera E., Sola-Landa A., Martín-Jiménez P. and Martín JF. 3er European Congress of Microbiology. FEMS. 28 Junio-2 Julio 2009, Gotemburgo (Sweden).

Caracterización molecular de los genes reguladores de ruta del cluster biosintético del inmunosupresor tacrolimus en *Streptomyces* sp. ATCC 55098. Elena Solera, Alberto Sola-Landa, Patricia Martín-Jiménez, Juan Francisco Martín. XXII Congreso Nacional de Microbiología. 21-24 Septiembre 2009, Almería (Spain).

Regulatory systems involved in the production of the immunosuppressant tacrolimus in *Streptomyces* sp. ATCC 55098. C. Barreiro, M. Martínez-Castro, E. Solera, Z. Salehi-Najafabadi, A. Sola-Landa, JF. Martín. *Biology of Streptomycetes*. 7-11 Octubre 2009, Münster (Germany).

Estrategia de validación mediante proteómica y transcriptómica del genoma de *Streptomyces tsukubaensis*, PRINCIPAL productor del inmunosupresor tacrolimus. Barreiro. C., Sola-Landa, A., Prieto, C., Rodríguez-García, A., Martínez-Castro, M., Pérez-Redondo, R., García-Estrada, C., Fernández-Martínez, L.T., Solera, E., Salehi-Najafabadi, Z., Aparicio, J., Martín, JF. XXIII Congreso Nacional de Microbiología. 11-14 Julio 2011, Salamanca (Spain).

From next generation sequencing to knowledge: a case study of functional genomics annotation in prokaryotes. Prieto C, Barreiro C, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martínez-Castro M, García-Estrada C, Pérez-Redondo R, Fernández-Martínez L, **Solera E**, Kosalková K, Aparicio J, Martín JF. XIX international conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and ECCB and X annual European Conference on Computational Biology (ECCB). 24-27 Julio de 2011, Viena (Austria).

Estudio de la regulación de la agrupación génica de tacrolimus en *Streptomyces tacrolimicus*. Solera, E., Sola-Landa, A., Albillos, S.M., A., Martín, J.F. XXIII Congreso Nacional de Microbiología. 11-14 Julio 2011, Salamanca.