



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS**

Determinación de la especificidad de los transportadores de ferroxaminas B y E en *Streptomyces coelicolor* mediante Ingeniería Genética: repercusión en el proceso biotecnológico de purificación de desferroxamina B (Desferal®)

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

IBt. Víctor Hugo Tierrafría Pulido

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO BARONA GÓMEZ
(Langebio-CINVESTAV)**

CUERNAVACA, MOR., ENERO 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

- Universidad Nacional Autónoma de México
- Instituto de Biotecnología
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Paco Barona
- Comité tutorial: Dr. Guillermo Gosset y Dr. Tonatiuh Ramírez
- Jurado de examen: Dra. Guadalupe Espín, Dra. Katy Juárez, Dr. Alfredo Martínez y Dr. Luis Servín.
- Miembros del galerón 7 (Langebio)
- Grupo del Dr. Xavier Soberón
- Grupo del Dr. Guillermo Gosset
- A toda mi familia, especialmente a mi hermana y padres.
- A mis amigos.

Índice

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia biológica del hierro

1.2 Cualidades del género *Streptomyces*

1.2.1 Metabolismo secundario

1.2.2 Sobre la cepa modelo *Streptomyces coelicolor*

1.3 Biosíntesis y transporte de sideróforos en *Streptomyces*

1.3.1 Biosíntesis de desferroxaminas

1.3.2 Formación del complejo FeIII-desferroxamina (ferroxamina)

1.3.3 Transporte de ferroxaminas mediante un transportador de tipo ABC

1.3.4 Reconocimiento de ferroxaminas por una proteína de unión asociada a membrana

1.3.5 Interacción de la proteína de unión con el transportador ABC

1.3.6 Mecanismo concertado de transporte de sideróforos

1.4 Regulación de la biosíntesis de desferroxaminas

1.5 Catabolismo de la desferroxamina B

1.6 Aplicación farmacológica de la desferroxamina B (Desferal[®])

ANTECEDENTES

2.1 Producción biotecnológica de desferroxamina B por *Streptomyces pilosus*

2.2 Purificación biotecnológica de la desferroxamina B

2.3 Metabolismo del hierro en *Streptomyces coelicolor*

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

4.2 Objetivos Específicos

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Inactivación génica de algunos elementos relacionados con el transporte de sideróforos en *S. coelicolor*

5.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

5.1.2 Construcción de las mutantes $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$ en *S. coelicolor*

5.1.3 Clonación de *desE* y *cdtB* en el vector de expresión pIJ6902

5.2 Caracterización de cepas de *S. coelicolor* mutadas en uno o más elementos de transporte de sideróforos

5.2.1 Recuperación de esporas

5.2.2 Caracterización fenotípica

5.2.3 Banco de Trabajo

5.2.4 Preinóculos

5.2.5 Producción de desferroxaminas

5.3 Análisis por HPLC de los complejos FeIII-sideróforo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* en *S. coelicolor*

6.1.1 Las proteínas DesE y CdtABC tienen un rol funcional importante

6.2 Efecto de la combinación de distintas mutaciones en algunos elementos de transporte de ferroxaminas en *S. coelicolor*

6.3 Efecto de la expresión de *desE* y *cdtB*

6.4 Acumulación diferencial de DFOE y DFOB producidas por distintas cepas de *S. coelicolor*

6.5 Análisis de la redundancia de sistemas de transporte de hierro en *S. coelicolor*

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO

Índice de Figuras

- Figura 1. Ruta NRPS para la biosíntesis del péptido de tipo hidroxamato coeliquelina
- Figura 2. Ruta propuesta para la biosíntesis de desferroxaminas en *Streptomyces*.
- Figura 3. Formación del complejo ferroxamina.
- Figura 4. El plegamiento de las proteínas de unión forma una cavidad donde se une el ligando.
- Figura 5. Interacción entre el ligando y la proteína de unión.
- Figura 6. Reconocimiento del complejo ligando-BP por el transportador ABC.
- Figura 7. Mecanismo de transporte de nutrientes dependiente de proteína de unión
- Figura 8. El hierro actúa como regulador transcripcional de la biosíntesis de sideróforos en *S. coelicolor*.
- Figura 9. Patrones de degradación de la desferroxamina B en *Mesorhizobium loti*.
- Figura 10. Agrupamientos de genes relacionados con el metabolismo del hierro en *S. coelicolor* M145.
- Figura 11. Diagrama general para inactivación génica en *Streptomyces* mediante recombinación homóloga.
- Figura 12. Reemplazo del gen silvestre *desE* de *S. coelicolor* por el cassette de resistencia a apramicina *aac(3)IV*.
- Figura 13. Mapas de las construcciones pIJ6902*desE* y pIJ6902*cdtB*.
- Figura 14. Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* de *S. coelicolor* en medio SFM.
- Figura 15. Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* de *S. coelicolor* en medio R2YE.
- Figura 16. Efecto de las inactivaciones $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$, así como de la sobreexpresión de los genes *desE* y *cdtB*, en un contexto W3.
- Figura 17. La reducción de hierro induce la biosíntesis de sideróforos en cultivos de *S. coelicolor*.
- Figura 18. Acumulación de desferroxaminas en distintas cepas de *S. coelicolor*.
- Figura 19. Relación entre la acumulación de DFOB con respecto a la acumulación de DFOE en distintas cepas de *S. coelicolor*.

RESUMEN

Introducción. El hierro está involucrado en diversos procesos vitales en la mayoría de los organismos, sin embargo en condiciones fisiológicas su biodisponibilidad es limitada. Para contrarrestar este problema, algunos microorganismos secretan quelantes de hierro de alta afinidad llamados sideróforos, moléculas que fijan el hierro extracelular, formando complejos hierro-sideróforo que son reconocidos por proteínas de unión e incorporados a la célula mediante transportadores dependientes de trifosfato de adenosina. La biosíntesis de sideróforos en *Streptomyces coelicolor* depende de dos agrupamientos de genes (*cch* y *des*), cuya expresión se regula negativamente por hierro. Los genes *cch* dirigen la biosíntesis de coeliquelina, mientras que los genes *des* se encargan de la biosíntesis de desferroxamina E y desferroxamina B. Esta última, comercializada como Desferal[®], ha reducido los altos niveles de hierro en pacientes anémicos, y en otras patologías relacionadas con la sobrecarga de hierro como el cáncer, Alzheimer y Parkinson. **Métodos.** *S. coelicolor* se cultivó en agar soya y manitol así como en medios líquidos tratados con resina Chelex para remover el hierro. La tecnología REDIRECT[®] se utilizó para la inactivación génica en *S. coelicolor*, y la clonación de los genes que codifican para las proteínas de unión DesE y CdtB se efectuó por amplificación por PCR. La acumulación de desferroxaminas se analizó por HPLC. **Resultados.** En una mutante de *S. coelicolor* deficiente en los genes *cch*, se inactivó la proteína de unión CdtB, codificada por un grupo de genes llamado *cdt*, para prevenir la asimilación de desferroxamina B y propiciar su acumulación en el cultivo. En ausencia de las proteínas de unión CchF y CdtB, la adquisición de desferroxaminas dependía de la proteína de unión DesE, provocando una eficiente disminución en la acumulación de desferroxamina E con respecto a la acumulación de desferroxamina B.

ABSTRACT

Introduction. Iron, involved in multiple vital life processes in most if not all organisms, has its bioavailability limited at physiological conditions. To meet their iron nutritional requirements, many saprophytic bacteria secrete high-affinity iron-chelators, known as siderophores. Siderophores scavenge extracellular iron, forming iron-siderophore complexes, which in turn are recognized by specific binding proteins and re-absorbed by the cell via adenosine triphosphate dependent transporter. Siderophore biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* is directed by two gene clusters (*cch* and *des*), whose expression is transcriptionally regulated by iron. The *cch* cluster directs the synthesis of coelichelin, whereas the *des* cluster the synthesis of desferrioxamine E and desferrioxamine B. The last one (Desferal[®]) succeeds in reducing iron overload caused by multiple blood transfusions controlling anemia, among other iron overload pathologies like cancer, Parkinson and Alzheimer. **Methods.** *S. coelicolor* was routinely grown in soy flour agar and iron-deficient Chelex-treated culture media. *S. coelicolor* gene knockout strains were constructed using REDIRECT[®] technology, and cloning of binding proteins encoding genes was achieved by PCR amplification. Desferrioxamines production was followed by LC-MS analysis. **Results.** Using the mutant strain *S. coelicolor* which lacks the entire *cch* cluster, we inactivated CdtB binding protein, encoded by a third cluster of genes called *cdt*, in order to prevent assimilation of desferrioxamine B and accumulate it in the culture. In absence of CchF and CdtB binding proteins, desferrioxamine assimilation relies on the presence of DesE. This approach resulted in optimal absorption of desferrioxamine E, reducing its presence from the culture supernatant and increasing the desferrioxamine B:desferrioxamine E ratio. This is the first *S. coelicolor* strain that reverses the wild type desferrioxamines biosynthesis profile.

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia biológica del hierro

El hierro es un elemento indispensable para el desarrollo de la mayoría de los organismos vivos. Actúa como cofactor de una gran variedad de proteínas involucradas en diversos procesos vitales como la respiración, la biosíntesis aeróbica y anaeróbica de trifosfato de adenosina (ATP), así como la proliferación y diferenciación celular. FeII y FeIII, coexisten en un amplio intervalo de condiciones ambientales, sin embargo, en condiciones aeróbicas, el FeIII es la forma más predominante. Desafortunadamente, el ion FeIII tiene una fuerte tendencia a hidrolizar y formar complejos hidróxido extremadamente insolubles que limitan su biodisponibilidad a pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (Stefansson, 2007). A pH neutro y alcalino, la concentración máxima de FeIII en solución acuosa es de 10^{-9} M (Chipperfield & Ratledge, 2000), mientras que los microorganismos requieren concentraciones del orden de 10^{-6} M para reproducirse (Franza *et al*, 2005). Por lo tanto, la obtención del hierro en estas condiciones representa un reto fisiológico para los organismos vivos, los cuales han desarrollado biomoléculas especializadas para optimizar la utilización de hierro.

En los humanos, la transferrina es la proteína encargada de transportar el hierro a través de la membrana celular. Si el hierro intracelular supera las necesidades básicas, su exceso aún permanece biodisponible mediante su almacenamiento en la ferritina, evitando reacciones indeseables que pueden dañar el ADN (Aisen *et al*, 2001). Los microorganismos, por su parte, garantizan sus niveles intracelulares de hierro mediante la biosíntesis y secreción de quelantes de hierro de alta afinidad llamados sideróforos. Estos compuestos contribuyen considerablemente a la virulencia de bacterias patógenas debido a que secuestran el hierro que el hospedero almacena en una gran diversidad de sustratos orgánicos (Telford & Raymond, 1998).

1.2 Cualidades del género *Streptomyces*

Los estreptomicetos son bacterias saprofitas Gram-positivas que habitan el suelo y poseen un alto contenido de (G + C). Pertenecen a un grupo de bacterias conocido como actinomicetos. Los estreptomicetos crecen en forma de micelio, cuando la colonia inicial ha agotado los nutrientes solubles a su alrededor, se reproduce de manera similar a los hongos, mediante la propagación de ramificaciones aéreas formadoras de esporas, las cuáles pueden transportarse libremente hasta regiones lejanas donde pueden aprovechar una mayor cantidad de nutrientes solubles que aseguren su propagación continua. Este complejo desarrollo morfológico está coordinado con la secreción de enzimas y antibióticos, útiles para la degradación de algunos nutrientes insolubles y protección contra bacterias competidoras, respectivamente (Chater, 2006). Gracias a esto, los estreptomicetos han adquirido la habilidad para adaptarse a un amplio espectro de condiciones ambientales y utilizar una gran variedad de fuentes nutritivas, lo que explica la presencia de múltiples sistemas regulatorios, especializados en la detección y respuesta a estímulos extracelulares por medio de la formación de una enorme diversidad de compuestos naturales que el hombre ha sabido aprovechar para mejorar su calidad de vida.

Precisamente (i) la capacidad de estos microorganismos para adaptarse a una gran variedad de condiciones ambientales, que permite transferir una colonia de su medio ambiente natural a condiciones de laboratorio o industriales dónde puede crecer con diversas fuentes de carbono y nitrógeno; (ii) la facilidad con que obtienen estos nutrientes del medio, necesarios para mantener su actividad metabólica; y (iii) su capacidad para tolerar múltiples modificaciones genéticas, han permitido utilizar a los estreptomicetos en lugar de plantas, animales o síntesis química para incrementar hasta en tres órdenes de magnitud la producción de compuestos naturales de alto valor agregado, reduciendo sus costos de producción (Demain, 1988; Demain & Adrio, 2008).

1.2.1 Metabolismo secundario

Los productos naturales se dividen generalmente en metabolitos primarios (esenciales para el crecimiento vegetativo del organismo que los produce) y secundarios (no esenciales). Se cree

que los metabolitos secundarios no tienen ninguna función en el crecimiento del cultivo y se forman cuando éste ha disminuido su velocidad de crecimiento; sin embargo, es probable que estos sean necesarios para su supervivencia en el medio ambiente, e incluyen antibióticos, toxinas, pesticidas y factores de crecimiento de plantas y animales particularmente importantes para la salud y nutrición humana. Los antibióticos son los metabolitos secundarios mejor conocidos (Demain, 2000), y los estreptomicetos son la principal fuente de producción de antibióticos para usos médicos y agrícolas (Chater, 2006). La relevancia médica y comercial de los estreptomicetos radica justamente en su capacidad para producir poco más de dos tercios de los antibióticos de origen natural usados en la actualidad (y algunos otros productos farmacéuticos como agentes antitumorales e inmunosupresores, así como pigmentos y lípidos complejos) que significan un impacto económico admirable. En el 2001, el mercado global de antibióticos estaba compuesto por poco más de 160 antibióticos cuyas ventas se estimaron en cerca de 28 mil millones de dólares (Bax, 2001) y la búsqueda de nuevos antibióticos continúa en la actualidad.

1.2.2 Sobre la cepa modelo *Streptomyces coelicolor*

La secuencia del genoma de *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al*, 2002), el representante mejor conocido del género *Streptomyces*, permitió identificar cerca de 23 agrupamientos de genes (~4.5% del genoma) que codifican enzimas del metabolismo secundario. Al menos dos de estos agrupamientos están relacionados con la biosíntesis de tres sideróforos de tipo hidroxamato: coeliquelina, desferroxamina E y desferroxamina B, lo cual significa que *S. coelicolor* está sujeta a una fuerte presión selectiva para obtener hierro en condiciones donde su disponibilidad es limitada (Barona-Gómez *et al*, 2006) (Fig. 1 y 2). A pesar de ello, en *S. coelicolor*, como en muchos otros estreptomicetos, la obtención de hierro mediada por sideróforos ha sido poco estudiada (Müller & Raymond, 1984).

1.3 Biosíntesis y transporte de sideróforos en *Streptomyces*

La identificación de aminoácidos no proteicos en el esqueleto peptídico de algunos sideróforos, sugería que estos compuestos podrían ser péptidos no ribosomales, lo cual ha sido validado durante la última década (Challis & Ravel, 2000; Lautru *et al*, 2005). Las péptido sintetasas no ribosomales (NRPS), son enzimas multimodulares capaces de sintetizar péptidos sin necesidad de un templado de RNA, en los cuáles el orden de los aminoácidos depende del orden de los dominios presentes en las NRPSs. Ahora se sabe que antibióticos como la penicilina, vancomicina, el inmunosupresor ciclosporina y algunos sideróforos, son péptidos no ribosomales fabricados por esta maquinaria (Crosa & Walsh, 2002; Challis & Naismith, 2004). Recientemente se demostró la presencia de una ruta NRPS en *S. coelicolor* codificada por el *cluster cch*, donde una NRPS trimodular (CchH) y un tioesterasa (CchJ) se encargan de oligomerizar el tetrapéptido de tipo hidroxamato coeliquelina a partir de treonina y aminoácidos no proteicos (Lautru *et al*, 2005) (Fig. 1).

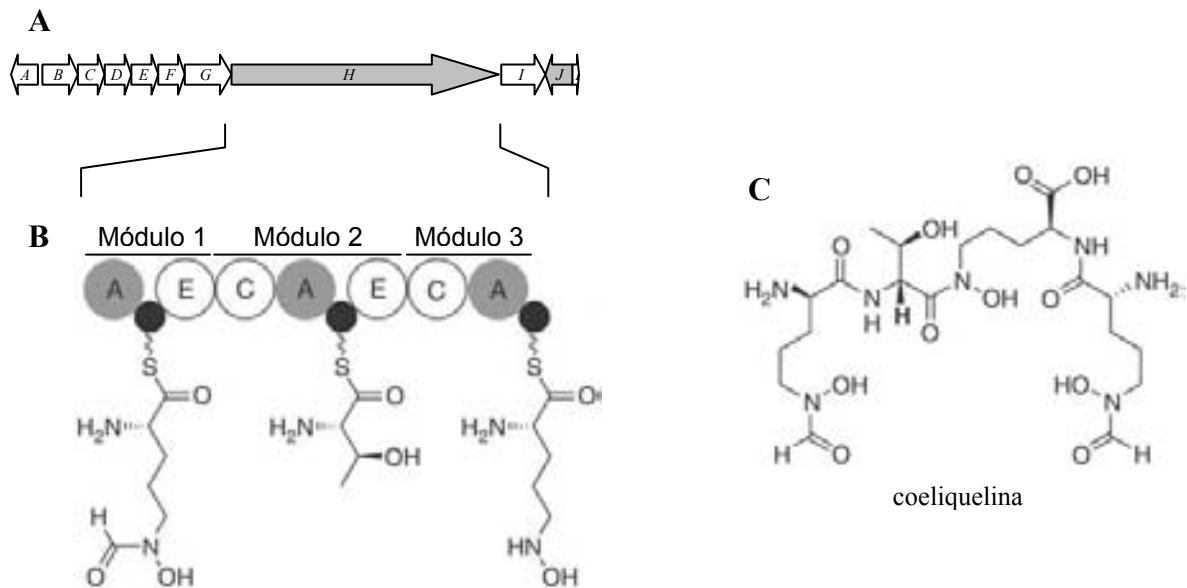


Figura 1. Ruta NRPS para la biosíntesis del péptido de tipo hidroxamato coeliquelina. A) Organización del *cluster* de biosíntesis de coeliquelina, el gen *cchH* (gris) codifica para la NRPS encargada de oligomerizar el sideróforo. B) La NRPS CchH es trimodular y está compuesta por 7 dominios: A, adenilación; E, epimerización; C, condensación. C) Estructura química de la coeliquelina (Lautru *et al*, 2005).

1.3.1 Biosíntesis de desferroxaminas

El creciente interés en las rutas de biosíntesis de sideróforos, aunado con el acelerado progreso en la secuenciación de genomas microbianos, han llevado al descubrimiento de una sintetasa independiente de las NRPSs (NIS) distribuida en una amplia gama de bacterias, dedicada específicamente a la síntesis de sideróforos no peptídicos (aunque derivados de aminoácidos, por ejemplo la lisina) como las desferroxaminas, producidos por algunas especies del género *Streptomyces* (Challis, 2005; Kadi *et al*, 2007). Las desferroxaminas están constituidas por unidades alternadas de ácido dicarboxílico y diamino o amino alcoholes unidas mediante enlaces amida o éster. En *S. coelicolor*, el paso inicial de su biosíntesis es la descarboxilación de L-lisina para formar cadaverina, catalizada por DesA. La cadaverina formada es hidroxilada posteriormente por DesB, para generar N-hidroxicadaverina (Schupp *et al*, 1988). Probablemente, DesC posee especificidad de sustrato relajada y es capaz de catalizar la acilación de N-hidroxicadaverina con acetil-CoA y succinil-CoA para formar los correspondientes ácidos monohidroxámicos N-hidroxi-N-acetilcadaverina y N-hidroxi-N-succinilcadaverina, respectivamente. DesD cataliza la condensación y oligomerización de tres unidades de N-hidroxi-N-succinilcadaverina para formar el trihidroxamato cíclico, desferroxamina E (DFOE), o la condensación de dos unidades de N-hidroxi-N-succinilcadaverina y una unidad de N-hidroxi-N-acetilcadaverina para formar el trihidroxamato lineal, desferroxamina B (DFOB) (Barona-Gómez *et al*, 2004; Kadi *et al*, 2007) (Fig. 2).

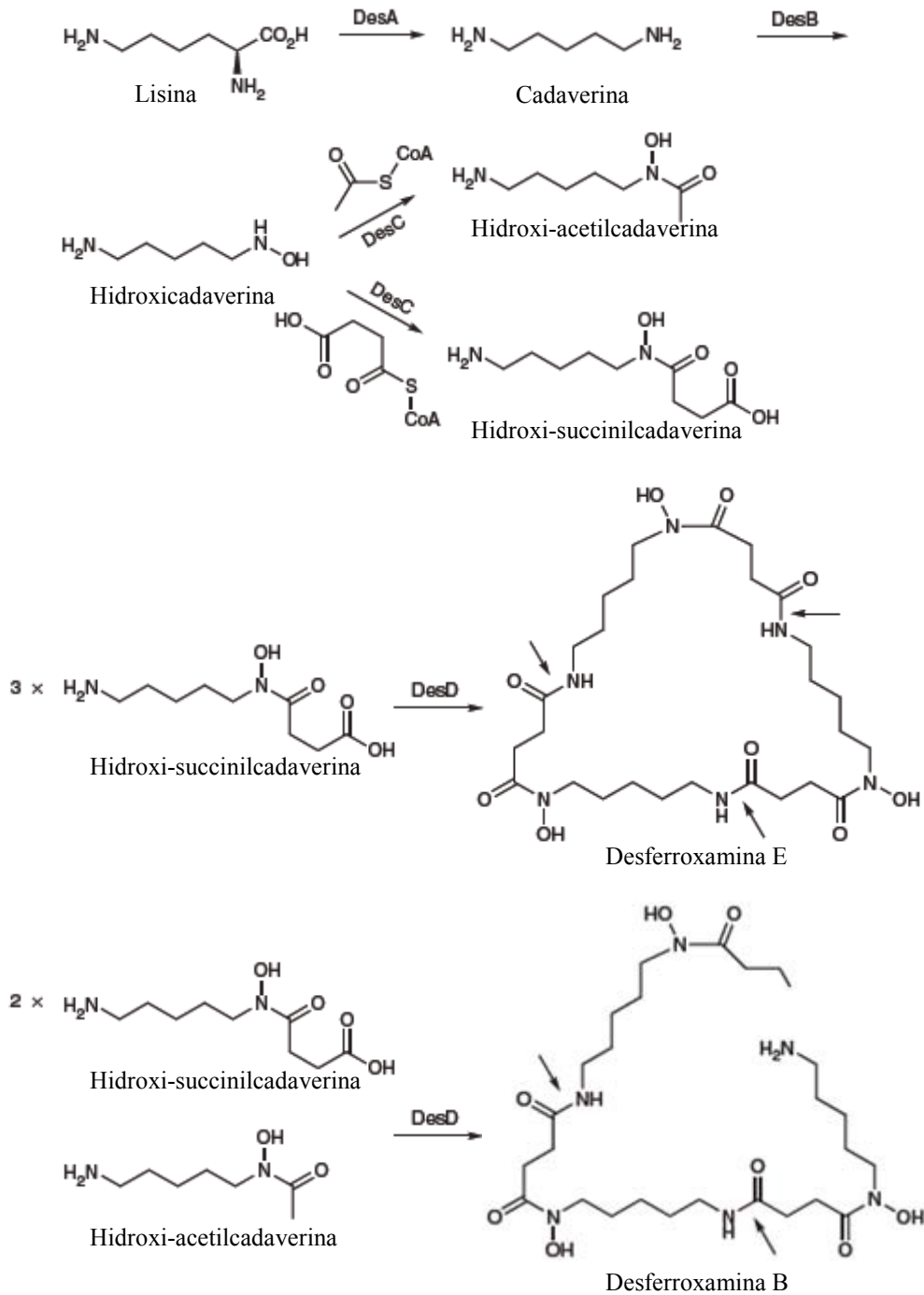


Figura 2. Ruta propuesta para la biosíntesis de desferroxaminas en *Streptomyces*. Nótese que la desferroxamina E mantiene una estructura cíclica, mientras que la desferroxamina B es una molécula lineal. En ambas estructuras los enlaces amida se indican con flechas (Barona-Gómez *et al*, 2004)

1.3.2 Formación del complejo FeIII-desferroxamina (ferroxamina)

Los grupos hidroxamato presentes en algunos sideróforos, son los responsables de capturar el FeIII, formando un sólido complejo hexadentado denominado ferroxamina, en una proporción estequiométrica 1:1. Particularmente, las ferroxaminas adquieren una geometría octaédrica de estabilidad característicamente elevada, cuyas constantes de formación se encuentran en el orden de 10^{32} y 10^{30} para la FOE y FOB, respectivamente. Por medio del análisis cristalográfico se demostró que la FOB existe como una mezcla racémica, y que su interacción con proteínas relacionadas con su transporte probablemente exhibe cierta selectividad geométrica, influenciada por la orientación de su extremo amino (Clarke *et al*, 2002) (Fig. 3).

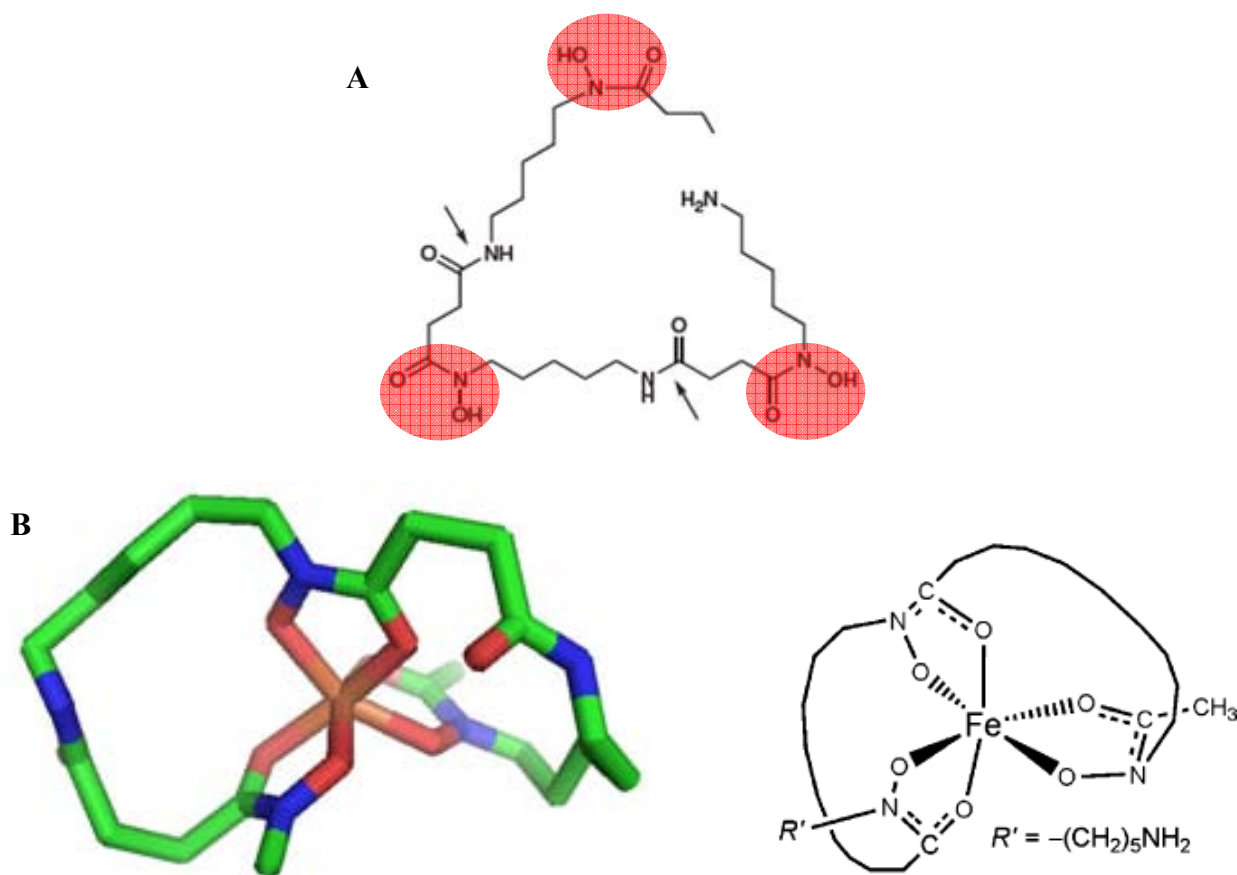


Figura 3. Formación del complejo ferroxamina. A) Los tres grupos hidroxamato (óvalos rojos) de la desferroxamina B son los responsables de quelar el FeIII. B) Específicamente los átomos de oxígeno (rojo) de los grupos hidroxamato se encargan de coordinar el FeIII justo en el centro de la ferroxamina B (FeIII-desferroxamina B) mediante la formación de puentes de hidrógeno (café) (Clarke *et al*, 2002).

1.3.3 Transporte de ferroxaminas mediante un transportador de tipo ABC

Las ferroxaminas son hidrofílicas e incapaces de transportarse libremente a través de la membrana celular (Müller & Raymond, 1984), por lo que son importadas al interior de la célula mediante un eficiente sistema de transporte asociado a membrana llamado *ATP binding cassette* (ABC). Los transportadores ABC acoplan la energía de la hidrólisis del ATP a una gran variedad de actividades biológicas esenciales, de las cuáles la más estudiada ha sido el transporte transmembranal en contra de un gradiente de concentración de nutrientes, uno de varios tipos diferentes de transporte en bacterias y otros organismos, razón por la cuál son ampliamente reconocidos (Davidson *et al*, 2008). Los sistemas ABC están constituidos básicamente por cuatro dominios. Dos dominios transmembranales (TMDs) que forman un poro, a través del cual, el sustrato atraviesa la membrana. Estos dominios también forman un sitio (o varios) de unión a sustrato que facilitan el transporte. Los otros dos dominios (dominios de unión a nucleótido o NBDs) están localizados en el citoplasma y se encargan de hidrolizar el ATP. Los NBDs contienen una región catalítica altamente conservada, capaz de unir el ATP, y una pequeña región variable indispensable para la unión con los TMDs. Los NBDs forman un dímero en cuya interfase se localizan dos sitios de unión a ATP (cada monómero aporta un sitio de unión). En ausencia de nucleótido, los NBDs se encuentran separados uno del otro, pero cuando unen ATP, hacen contacto y dos moléculas de nucleótido permanecen encerradas en la interfase del dímero. La oligomerización de los NBDs es indispensable para la hidrólisis del ATP, es por eso que existe un dímero de NBDs por cada transportador (Linton & Higgins, 2006).

Los transportadores ABC pueden ser divididos en dos categorías fundamentalmente. Los exportadores están involucrados en la secreción de péptidos, lípidos, polisacáridos y proteínas, incluyendo toxinas. Los importadores controlan la obtención de mono y oligosacáridos, iones orgánicos e inorgánicos, aminoácidos, péptidos, sideróforos, metales y vitaminas (Davidson *et al*, 2008). Estos últimos dependen generalmente de la presencia de un tercer elemento que interactúa con los TMDs, una proteína de unión (BP) capaz de reconocer el sustrato con gran afinidad. En las bacterias Gram-negativas, las BPs se localizan en el periplasma, mientras que en los organismos Gram-positivos se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática por medio de una cadena lipoproteica (Sebulsky *et al*, 2003).

1.3.4 Reconocimiento de ferroxaminas por una proteína de unión asociada a membrana

La mayor parte del conocimiento adquirido del sistema sustrato-BP proviene del estudio de organismos Gram-negativos, mientras muy poco se sabe de la bioquímica y estructura de las BPs en bacterias Gram-positivas. A pesar de ello, algunas estructuras de alta resolución han demostrado que la totalidad de las BPs caracterizadas hasta el momento son monoméricas y adoptan un patrón común de plegamiento que consiste en dos dominios globulares conectados por una o más cadenas polipeptídicas entre los cuáles se une el sustrato (Fig. 4). La mayoría de las BPs, como la proteína periplásmica de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*, sufren modificaciones estructurales significativas una vez que han interactuado con su sustrato correspondiente, que consisten en el cierre de sus dos dominios alrededor del ligando (Davidson *et al*, 2008). Sin embargo, recientemente se ha descubierto una nueva clase de BPs (tipo III) que incluye la BtuF (*E. coli*) que une vitamina B₁₂; FhuD (*E. coli*), FhuD₂ (*Staphylococcus aureus*), y CchF, DesE y CdtB (*S. coelicolor*), que unen FeIII-hidroxiatos; así como algunas proteínas que atrapan zinc como la TroA de *Treponema palladium* (Codd, 2008). A diferencia de las BPs que unen azúcares y aminoácidos (representadas por la MBP), el sitio de unión en las proteínas del tipo III es poco profundo y posee una cadena polipeptídica muy poco flexible que mantiene unidos los dominios globulares, sugiriendo que la proteína no sufre cambios conformacionales significativos después de su unión con el sustrato (Sebulsky *et al*, 2003).

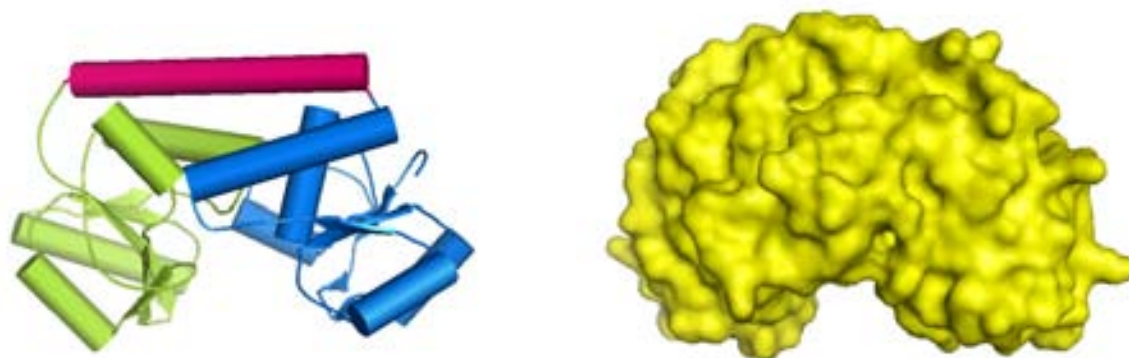


Figura 4. El plegamiento de las proteínas de unión forma una cavidad donde se une el ligando. Vista frontal de la BP FhuD de *E. coli*, donde se observa la cavidad que forman los dominios globulares (verde y azul), localizados en lados opuestos de la hélice (rosa) que interconecta ambos dominios.

El esqueleto de la mayoría de los sideróforos fijados tiene muy pocas o ninguna interacción directa con la BP, sugiriendo que el reconocimiento de sideróforos ocurre básicamente mediante puentes de hidrógeno entre los núcleos FeIII-hidroxamato del sideróforo y las cadenas laterales de diversos residuos clave (que suelen ser en su mayoría residuos hidrofóbicos) sobre la superficie del sitio de unión de la BP (Fig. 5) (Clarke *et al*, 2002). Estas interacciones también juegan un papel importante en la estabilidad del complejo, impidiendo su degradación proteolítica. Las BPs de tipo III sufren un discreto cambio conformacional cuando unen el ligando, esta pequeña modificación se relaciona principalmente con cambios en la accesibilidad de algunas regiones vulnerables en el asa de conexión interdominio de la BP y no con movimientos significativos de cualquiera de sus dominios globulares, como ocurre en el caso de la proteína de unión a maltosa (Sebulsky *et al*, 2003).

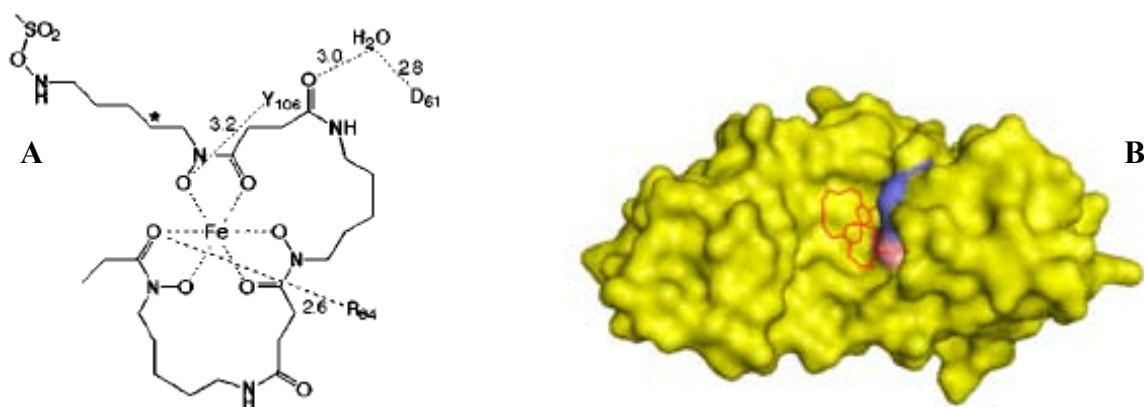


Figura 5. Interacción entre el ligando y la proteína de unión. A) La interacción por puentes de hidrógenos entre los átomos de oxígeno de los grupos hidroxamato de las ferroxaminas y la BP se señalan con líneas punteadas. B) Vista inferior del complejo ferroxamina B-FhuD *E. coli* donde se observa claramente los residuos arginina 84 (rosa) y tirosina 106 (azul), dentro del sitio activo de la BP (amarillo), que mantiene unida a la ferroxamina B (rojo) (Clarke *et al*, 2002).

Recientemente se demostró que el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* codifica para 34 probables BPs, aunque únicamente es capaz de sintetizar dos sideróforos, la pioverdina y la pioquelina. Esta observación advierte la posibilidad de que este organismo sea capaz de utilizar una gran variedad de sideróforos producidos por otros microorganismos, denominados xenosideróforos. La presencia de múltiples receptores, aunada a la existencia de muy pocos

sistemas de transporte en *P. aeruginosa*, significa que esta bacteria está sometida a un fenómeno de presión que derivó en la acumulación de sistemas de transporte de sideróforos, es decir, que un sideróforo puede ser reconocido por al menos una BP y transportado a través de por lo menos un sistema de transporte. Este hecho fue comprobado, cuando una mutante de *P. aeruginosa*, incapaz de sintetizar pioverdina y pioquelina, fue capaz de utilizar los sideróforos ferricromo, FOB y esquizoquineina (Cuív *et al*, 2007). En un estudio similar, se observó que la DFOE producida por *Streptomyces griseus* estimula el crecimiento de *Streptomyces thanasiensis*, una especie incapaz de sintetizar desferroxaminas de manera natural (Yamanaka *et al*, 2005). Ambos casos señalan que algunos microorganismos deficientes en la producción de sideróforos pueden sobrevivir en su medio ambiente mediante la utilización de xenosideróforos, debido probablemente a una especificidad de sustrato relajada por parte de sus sistemas de transporte (Haas *et al*, 2008).

1.3.5 Interacción de la proteína de unión con el transportador ABC

S. aureus es una bacteria Gram-positiva que posee un transportador ABC (FhuBGC₂) dependiente de una BP para la utilización de sideróforos de tipo hidroxamato. FhuB y FhuG constituyen los dos TMDs, FhuC corresponde con el NBD y FhuD₂ es la BP que reconoce al sideróforo. Recientemente han sido identificados dos residuos altamente conservados, E97 y E231, ubicados cada uno en la superficie de cada dominio globular de FhuD₂ y considerablemente alejados del sitio de unión a sustrato, indicando que seguramente no interaccionan con el ligando (Fig. 6A). Se ha sugerido que el reconocimiento molecular entre la BP y las subunidades FhuB y FhuG del transportador, depende de por lo menos dos interacciones distintas principalmente; la primera, entre FhuB/FhuG y los residuos E97 y E231 de FhuD₂ y la segunda, entre FhuB/FhuG y el propio sideróforo unido a FhuD₂, lo cual aproxima el sitio de unión a sustrato de la BP con la interfase formada entre los TMDs del transportador (Fig. 6B). Sin embargo, podrían ocurrir interacciones adicionales entre el transportador ABC y regiones menos conservadas en la superficie inferior de la BP. De esta manera y a diferencia del transportador de maltosa, donde el reconocimiento depende de un gran cambio conformacional de la BP inducido por el ligando para poder ajustarse al transportador, *S. aureus* es capaz de reconocer la BP sin la necesidad de un cambio conformacional significativo en la proteína de

unión. Es muy probable que un mecanismo similar actúe en *S. coelicolor* debido a que los residuos involucrados de manera directa con el transporte se encuentran altamente conservados en un amplio número de sistemas de transporte de sideróforos en bacterias (Sebulsky *et al*, 2003).

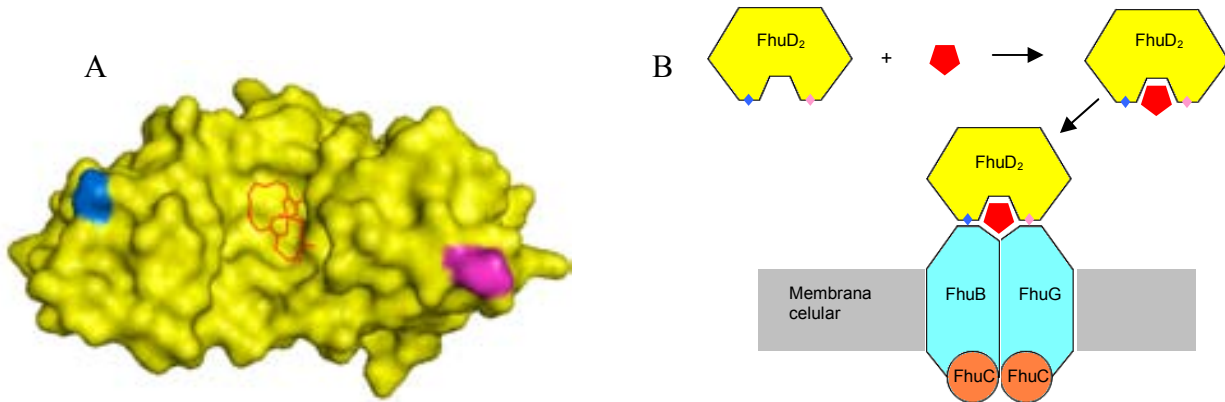


Figura 6. Reconocimiento del complejo ligando-BP por el transportador ABC. A) Vista inferior del complejo sideróforo-BP donde se visualizan los residuos altamente conservados (azul y rosa) que interactúan con los TMDs del transportador. B) Modelo de reconocimiento de la BP. Interacciones adicionales poco conservadas entre la superficie del complejo sideróforo-BP y los TMDs del transportador aseguran la eficiencia del transporte (Clarke *et al*, 2002; Sebulsky *et al*, 2003).

1.3.6 Mecanismo concertado de transporte de sideróforos

La información estructural y bioquímica de una gran variedad de transportadores ABC ha permitido proponer un mecanismo de transporte de sideróforos basado en la catálisis del ATP, denominado *ATP-switch*, conformado por distintas etapas que involucran cambios conformacionales del transportador, en dos sentidos fundamentalmente, entre los dominios NBD y entre los dominios TMD. El factor que permite el transporte del sustrato es un cambio entre las dos configuraciones principales de los NBDs: un dímero “cerrado” formado por la unión de dos moléculas de ATP en la interfase del dímero, y su consecutiva disociación para dar lugar a un dímero “abierto” originado por la hidrólisis del ATP y la liberación de ADP + Pi. El cambio de la conformación abierta del dímero NBD a la conformación cerrada, induce diversos cambios conformacionales en los dominios TMDs, indispensables para el transporte del ligando. El

restablecimiento de esta maquinaria a su forma inicial, alista al transportador para el siguiente ciclo de transporte (Linton & Higgins, 2007). Otros estudios establecen que la importación de nutrientes en los sistemas dependientes de BP ocurre siempre y cuando el complejo ligando-BP se encuentre fuertemente unido a los dominios TMD del transportador (Fig. 6B). Debido a que el transportador de *S. coelicolor* pertenece a la familia de los sistemas ABC dependientes de BP, es muy probable que el transporte de sideróforos en este organismo comparta algunas similitudes con el mecanismo descrito para el transporte de maltosa (Fig. 7).

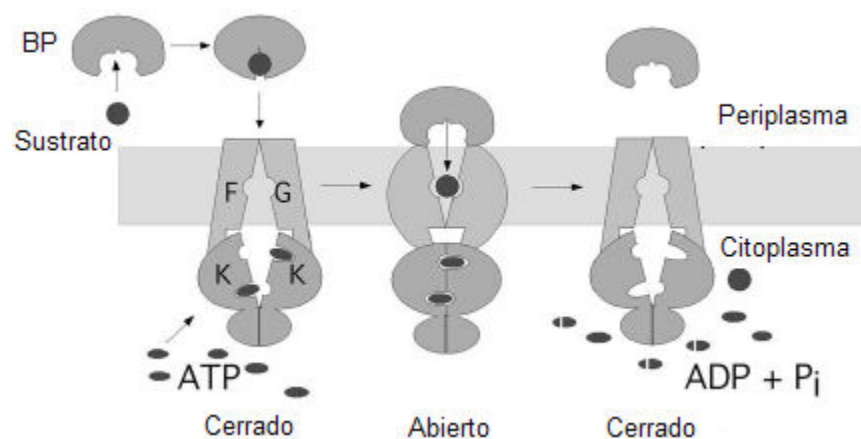


Figura 7. Mecanismo de transporte de nutrientes dependiente de proteína de unión. En ausencia de sustrato, el transportador permanece cerrado hacia el periplasma, incluso en presencia de ATP. Cuando el sustrato se une a la BP, este complejo estimula la hidrólisis del ATP permitiendo que los NBDs se cierren, juntando también los dominios TM en esta región, cerrando el transportador en dirección del citoplasma. Este cambio permite que las regiones TM del lado del periplasma se separen entre sí formando una cavidad lista para recibir el sustrato, mientras la BP y el transportador se encuentran intensamente unidas a través de la inserción de un asa del transportador justo en el sitio de unión a sustrato de la BP obstruyendo la unión de otra molécula y asegurando que el sustrato sea depositado (Chen *et al*, 2001)

Recientemente han sido determinadas las estructuras de los sistemas BtuCD y HI1470/1 de *E. coli* y *Haemophilus influenzae*, respectivamente, que representan dos conformaciones distintas de transportadores ABC (Locher *et al*, 2002; Pinkett *et al*, 2007). Aunque los dominios TMD de ambos sistemas se mantienen estrechamente unidos a lo largo de la región transmembranal, sus extremos a cada lado de la membrana se organizan de manera distinta. El transportador BtuCD

está abierto en dirección al periplasma y cerrado del lado citoplasmático de la bicapa lipídica adoptando una configuración denominada “hacia afuera”, mientras que el transportador de metales HII470/1 adopta una posición inversa, abierta únicamente en dirección del citoplasma “hacia adentro”. Respecto a la organización de las subunidades NBD, ambos sistemas muestran una configuración abierta, similar a la propuesta para el dímero FhuC₂ de *S. aureus* (Fig. 6B), que contrasta notablemente con la forma cerrada del dímero MalK₂ del sistema MBP (Chen *et al*, 2001) (Fig. 7). Estas diferencias en la configuración de los dominios TMD advierten que el mecanismo de transporte puede variar en distintos sistemas a pesar de que el patrón de unión y liberación de ATP en los dominios NBD sea idéntico.

1.4 Regulación de la biosíntesis de desferroxaminas

La inducción de la biosíntesis de desferroxaminas, promovida por la disminución de hierro en cultivos de *S. coelicolor* (Imbert *et al*, 1995), asegura que la formación de sideróforos está sujeta a un complejo sistema de regulación dependiente de hierro. Recientemente se demostró que el nivel máximo de expresión de los genes *desE*, *desA* y *desD* del operón *des* de *S. coelicolor*, vinculado con la biosíntesis de desferroxaminas, ocurre entre 6-8 h después de la restricción de hierro (Tunca *et al*, 2007) (Fig. 8A). Por otra parte, se demostró que, en presencia de hierro, la proteína DmdR (*divalent metal dependent regulator*) de *S. coelicolor* se une en forma de dímeros a secuencias palindrómicas de ADN de aproximadamente 19 nucleótidos, denominadas *iron boxes*, ubicadas río arriba de los genes *desA* de *S. pilosus* y *S. coelicolor* (Flores & Martín, 2004). El análisis del genoma de ambos organismos reveló la presencia de la región -10 del promotor del gen *desA*, dentro de la secuencia *iron box*. También se identificó el sitio de inicio de la transcripción del operón *des*, dentro de la *iron box* en *S. pilosus*, mientras que en *S. coelicolor* se ubica apenas un par de nucleótidos río abajo de dicha secuencia. En conjunto, estos trabajos proponen que el hierro es indispensable para la unión de la proteína DmdR a la *iron box* (cada monómero DmdR contiene un sitio de unión a FeII). En contraste, cuando los niveles celulares de hierro son muy bajos, los represores activos DmdR liberan al correpresor FeII, y son incapaces de mantenerse unidos a la *iron box*, sugiriendo que el promotor es reconocido más eficientemente por el complejo de transcripción ARN polimerasa, favoreciendo de esta manera, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de desferroxaminas (Tunca *et al*, 2007) (Fig. 8B). En *S.*

coelicolor han sido claramente identificadas *iron boxes* en el promotor de diversos genes, *desE*, *desA* (Barona-Gómez *et al*, 2004) y *cchA*, *cchB*, *cchE*, *cchF*, *cchI*, *cchJ* (Tunca *et al*, 2007), indicando que el operón *desEFABCD*, encargado de la biosíntesis de desferrooxaminas E y B, y el *cluster cchABCDEFGHIJK*, encargado de la biosíntesis de coeliquelina, respectivamente, se regulan por la concentración de hierro.

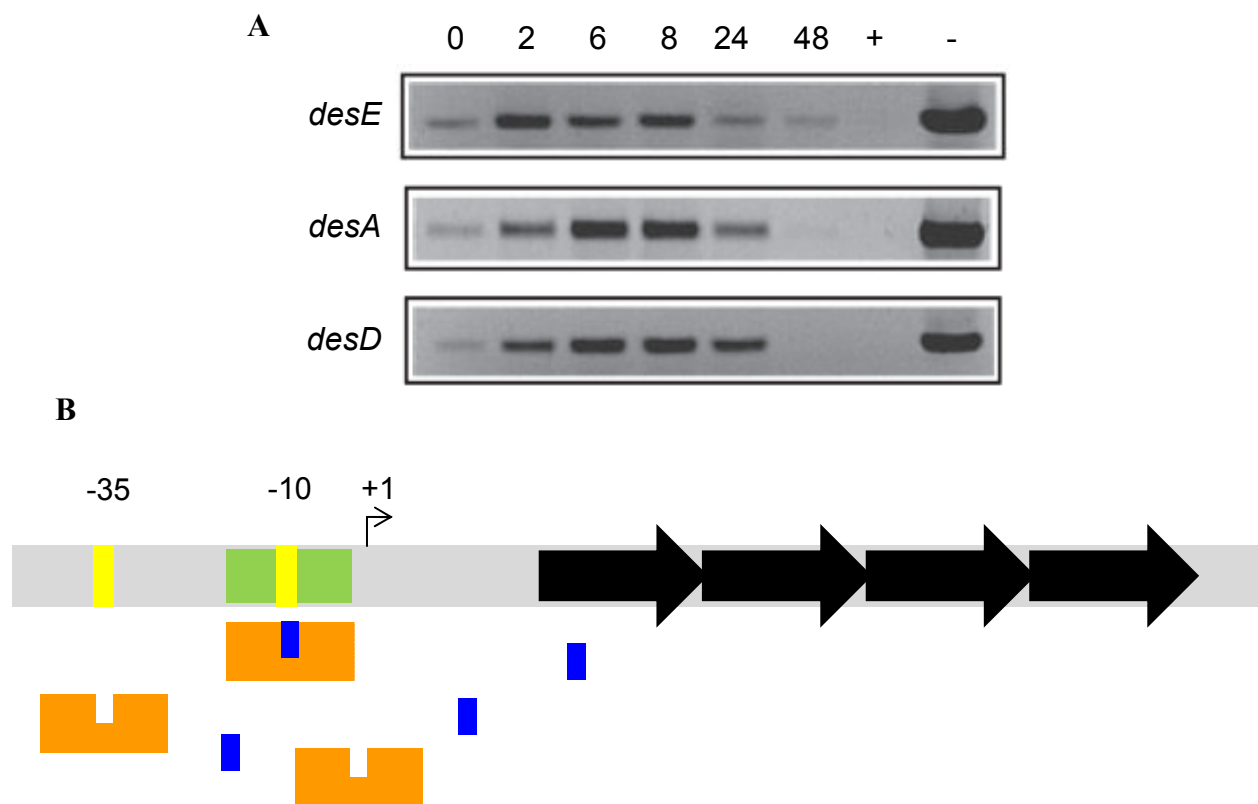


Figura 8. El hierro actúa como regulador transcripcional de la biosíntesis de sideróforos en *S. coelicolor*. A) Análisis transcripcional por RT-PCR de los genes *desE*, *desA* y *desD* después de retirar el hierro (t=0) del cultivo de *S. coelicolor*. B) En exceso de hierro, el complejo hierro (rectángulo azul) + DmdR (naranja), se fija a la secuencia *iron box* (rectángulo verde), donde se localiza la región -10 del promotor (rectángulo amarillo), e impide la biosíntesis de sideróforos.

En *S. coelicolor*, han sido caracterizados dos genes *dmdR* distintos (*dmdR1* y *dmdR2*), localizados en dos regiones cromosomales distintas. Se demostró que la expresión del gen *dmdR2* incrementa con la inactivación del gen *dmdR1*, indicando que la segunda copia *dmdR* está regulada negativamente por la proteína DmdR1. Probablemente, la proteína DmdR2 actúa como

una copia de seguridad para asegurar la presencia de un regulador DmdR para controlar la gran cantidad de sideróforos producidos por *Streptomyces* (Flores *et al*, 2005).

1.5 Catabolismo de la desferroxamina B

A pesar de los esfuerzos por comprender la genética que permite a los organismos adquirir el hierro por medio de sideróforos, poco se sabe acerca de la manera en que estos compuestos se incorporan nuevamente a los ciclos de carbono y nitrógeno. Dada su naturaleza no peptídica o cíclica, la mayoría de los sideróforos (en su forma libre de hierro) representan una fuente de energía poco habitual (Winkelmann *et al*, 1999; Harwani *et al*, 1997). Además, en suelos donde abunda el hierro, la mayoría de los sideróforos son convertidos rápidamente en sus complejos férricos, adquiriendo una mayor estabilidad química que les impide ser degradados por enzimas hidrolíticas, propiciando su acumulación. A pesar de ello, recientemente se ha observado que *Pseudomonas* FC1, *Azospirillum irakense* y *Mesorhizobium loti* tienen la habilidad de degradar sideróforos de maneras distintas. *Pseudomonas* FC1 puede metabolizar algunos hidroxamatos de naturaleza peptídica utilizando una proteasa alcalina intracelular capaz de degradar péptidos cíclicos pequeños. Por su parte, *A. irakense* y *M. loti* también se valen de enzimas intracelulares para degradar compuestos no peptídicos como las desferroxaminas, aunque son incapaces de degradar sus complejos férricos (Winkelmann *et al*, 1999). Castignetti y colaboradores demostraron que el mecanismo de degradación de DFOB en *A. irakense* y *M. loti* es distinto, sin embargo ambos coinciden en la ruptura asimétrica de la desferroxamina al inicio de la ruta. Específicamente, la DFOB hidrolasa de *M. loti* es capaz de degradar la DFOB mediante la hidrólisis de sus enlaces amida, liberando primeramente un monohidroxamato MH2 y un ácido dihidroxámico intermediario DH. Posteriormente el DH se degrada para dar una segunda molécula de monohidroxamato MH2 así como el monohidroxamato MH1 (Fig. 9) (Pierwola *et al*, 2004).

talasemias (Codd, 2008). Las talasemias son causadas por la carencia de hemoglobinas funcionales provocando desórdenes sanguíneos como la anemia. La anemia se controla por medio de diversas transfusiones sanguíneas que llevan inevitablemente a una sobrecarga de hierro (Chaston & Richardson, 2003). Un alto nivel de hierro en sangre se asocia con diversos estados patológicos importantes que incluyen cáncer y daño de órganos por mencionar algunos. El efecto carcinogénico del exceso de hierro está relacionado con daño al ADN, interferencia con el funcionamiento normal de la célula, así como con la proliferación celular (Dayani *et al*, 2004). Por su parte, la acumulación de hierro en el cerebro puede producir enfermedades neurodegenerativas (Aisen *et al*, 2001). Varios estudios clínicos han demostrado que el Desferal[®] ha podido disminuir los altos niveles de hierro presentes en distintos procesos neurodegenerativos, convirtiéndolo en fuerte candidato para el tratamiento del mal de Parkinson y el Alzheimer (Dayani *et al*, 2004; Warshawsky *et al*, 2005). La propiedad antiproliferativa del Desferal[®] también ha probado que a concentraciones del orden de 10^{-6} M es capaz de capturar una parte del hierro intracelular necesario para la síntesis de ADN en células tumorales deteniendo su proliferación, ofreciendo de esta manera una excelente opción para el tratamiento del cáncer (Dayani *et al*, 2004). Aunque el Desferal[®] ha representado la mejor opción para combatir estos padecimientos durante más de 30 años, su costo es muy elevado y su administración oral lo inactiva, por lo que debe administrarse únicamente de manera parenteral. Generalmente su administración se da bajo un riguroso esquema que para algunos pacientes resulta demasiado severo, pero si el tratamiento de disminución de hierro llegara a interrumpirse, la acumulación del metal con el paso del tiempo puede tener consecuencias fatales. Asimismo, el Desferal[®] puede generar reacciones alérgicas en algunos individuos ocasionadas por productos de fermentación adicionales a la DFOB provenientes de los procesos actuales de purificación de este sideróforo a partir de cultivos bacterianos (Chaston & Richardson, 2003). Recientemente han sido descubiertos dos nuevos productos farmacéuticos basados en el mismo principio de quelar hierro, deferiprona y deferasirox; este último se encuentra en la fase III de pruebas clínicas en pacientes con anemias dependientes de transfusión. Aunque ambos compuestos son activos si se administran oralmente, ninguno ha podido reemplazar al Desferal[®] debido a su toxicidad (inhibiendo enzimas que contienen hierro mediante interacciones estéricas) y a la falta de eficiencia que han impedido su aplicación en humanos (Chaston & Richardson, 2003).

ANTECEDENTES

1.1 Producción biotecnológica de desferroxamina B por *Streptomyces pilosus*

Existe una amplia variedad de microorganismos que producen cantidades considerables de desferroxaminas cuando se desarrollan en medios de cultivo bajos en hierro (Gaeumann *et al*, 1964). En la década de los 60s, la producción industrial de desferroxamina B giraba en torno al cultivo de *S. pilosus* en medios cuya cantidad de hierro no debía exceder de 10^{-7} M. Debe tomarse en cuenta que esta cantidad se refiere al hierro soluble FeII (capaz de inhibir la producción de desferroxaminas), y no al hierro insoluble FeIII, que suele ser mucho más elevado. En la actualidad, el medio de cultivo se prepara con fuentes habituales de carbono y nitrógeno, así como sales inorgánicas de magnesio, zinc o manganeso; el cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, preferentemente sumergido y con agitación durante 4 a 10 días. El intervalo de temperatura adecuada varía entre 18°C y 40°C, aunque la temperatura preferible es de 27°C. A pesar de que *S. pilosus* produce una amplia gama de desferroxaminas (A, C, D₁, D₂, E, F y G), en los procesos actuales de fermentación a escala industrial sigue utilizándose para la obtención de DFOB para usos médicos (Keri *et al*, 2005).

1.2 Purificación biotecnológica de la desferroxamina B

La mayoría de los métodos convencionales de purificación de la DFOB (Desferal®) generada por fermentación están basados en la cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cristalizaciones consecutivas. Entre los adsorbentes mayormente utilizados se encuentran el carbón activado, la tierra de diatomeas activada y las resinas de intercambio iónico. Algunos adsorbentes alternativos incluyen óxido de aluminio y silicatos de magnesio (Keri *et al*, 2005). La purificación comienza con la indispensable conversión de ferroxaminas a desferroxaminas, mediante la adición de una sustancia capaz de formar complejos férricos, removiendo de esta manera el FeIII contenido inicialmente en la FOB. Esta operación puede realizarse en el medio de cultivo inmediatamente después de que haya concluido la fermentación

(Gaeumann *et al*, 1964). Un estudio reciente ha demostrado la purificación de DFOB utilizando una ingeniosa variante de cromatografía de afinidad. Esta técnica se basa en la afinidad natural entre el NiII y los ácidos hidroxámicos y consiste en utilizar una resina que une covalentemente ácidos orgánicos tridentados a los cuáles se fija el NiII. Este sistema puede retener ácidos hidroxámicos y sideróforos de tipo hidroxamato como la DFOB directamente del sobrenadante de un cultivo de *S. pilosus*. Sin embargo, además de la DFOB, el sobrenadante del cultivo de *S. pilosus* contiene múltiples sustancias tanto proteicas como no proteicas sintetizadas por el microorganismo, así como componentes del mismo medio, vitaminas, proteínas y aminoácidos que aparentemente compiten por los sitios de unión a NiII y que disminuyen en gran medida la capacidad de captura de DFOB, lo que representa la principal desventaja de este método (Braich & Codd, 2008). Uno de los compuestos que se encuentran en mayor proporción en un extracto de desferroxaminas obtenido por fermentación, es la forma cíclica E (nocardamina) (Müller & Raymond, 1984), la cual ha encontrado una aplicación exitosa al formar parte de un novedoso medio de cultivo que permite la pronta identificación (solamente 42 h, menos de la mitad del tiempo requerido en medios de cultivo tradicionales) de especies de *Salmonella* en muestras ambientales y de alimentos (*Oxoid Salmonella Rapid Test* FR0201A).

Debido a que ninguno de los métodos de purificación actuales (por sí mismos o en combinación) es capaz de eliminar o reducir eficientemente, por debajo del 2.5%, los productos de fermentación de tipo polihidroxamato relacionados estructuralmente con la DFOB, los cuales deben ser removidos antes de su uso en productos farmacéuticos (Keri *et al*, 2005), es necesario establecer un proceso mejorado para la biotransformación de DFOB producida por fermentación para su administración en pacientes.

1.3 Metabolismo del hierro en *Streptomyces coelicolor*

Hasta el momento han sido caracterizados tres agrupamientos de genes relacionados con el metabolismo del hierro en *S. coelicolor*. El *cluster cch* está compuesto por 11 genes, siendo el primero y último gen, *cchA* (SCO0499) y *cchK* (SCO0489), respectivamente (Lautru *et al*, 2005). Cuatro de estos genes, *cchABHJ*, se encargan de la biosíntesis de tetrapéptido de tipo hidroxamato coeliquelina, y cuatro más, *cchCDEF* (SCO0497-0494), codifican para una unidad

completa de transporte de sideróforos integrada por dos permeasas (CchCD), una ATPasa (CchE) y una BP (CchF) (Barona-Gómez *et al*, 2006) (Fig. 10). Por su parte, el operón *des* contiene 6 genes, cuatro de ellos, *desABCD* (SCO2782-2785), están delegados a la síntesis de las desferrooxaminas DFOE y DFOB (Barona-Gómez *et al*, 2004) (Fig. 1). A diferencia del *cluster cch*, el operón *des* únicamente contiene un elemento involucrado con el transporte de sideróforos, el gen *desE* (SCO2780) que codifica para una BP (Fig. 10) (Barona-Gómez *et al*, 2006).

Recientemente se examinó la habilidad de algunas mutantes de *S. coelicolor*, deficientes en el *cluster cch* y/o el operon *des*, independientemente o en combinación, para crecer en presencia y ausencia de hierro mediante el suplemento de sideróforos. Se demostró que la coeliquelina, DFOE y DFOB funcionan como sideróforos en este organismo y que la secreción de al menos uno de estos metabolitos es esencial para su crecimiento (Barona-Gómez *et al*, 2006). Sin embargo, el hecho de que la DFOB estimuló significativamente el crecimiento de la mutante $\Delta cchABCDEFGHIJ \Delta desEFABCD$ (deficiente en las BPs DesE y CchF), demostró la presencia de un tercer sistema capaz de transportar eficientemente la FOB en *S. coelicolor* (Fig. 10) (Barona-Gómez *et al*, 2006). Posteriormente se comprobó por medio del análisis *in silico* del genoma de *S. coelicolor*, que este sistema podría estar representado por el operón *cdtABC*. Para determinar el papel que juega este operón en la obtención de sideróforos producidos por *S. coelicolor*, se creó una mutante $\Delta cdtABC$ y se registró la resistencia, tanto de la cepa silvestre como de la mutante, a un par de antibióticos de tipo hidroxamato, salmicina (análogo de ferroxaminas) y albomicina (análogo de ferricromo) (Bunet *et al*, 2006). Se observó que solo la cepa silvestre era sensible a la salmicina, mientras que ambas cepas eran resistentes a la albomicina. Una prueba de competencia entre la obtención de salmicina y desferrooxaminas demostró que efectivamente el operón *cdtABC* era capaz de transportar desferrooxaminas. Sin embargo, cuando se estudió la capacidad de transportar FOB con hierro marcado en la cepa silvestre y la mutante $\Delta cdtABC$, no se observó ninguna diferencia, sugiriendo que el operón *cdtABC* no era el único trasportador de FOB y que su obtención podría estar ocurriendo mediante otro sistema de transporte (Bunet *et al*, 2006). Los genes del operón *cdt* posiblemente forman una unidad transcripcional como sugiere su arreglo en el cromosoma. La secuencia codificante de *cdtC* se sobrelapa con la de *cdtB* por 4 pb, mientras que la región intergénica entre *cdtB* y *cdtA* no excede las 7 pb. Asimismo, la región intergénica que separa a *cdtC* del siguiente gene río arriba,

SCO7401, que está orientado en la misma dirección, es lo suficientemente larga (104 pb) para permitir la presencia de una región promotora para la transcripción acoplada del operón *cdtABC*. Este operón codifica para una proteína de transporte de membrana que contiene dos dominios permeasa, una lipoproteína de transporte receptora de complejos FeIII-sideróforos o BP y una ATPasa, respectivamente (Fig. 10) (Bunet *et al*, 2006).

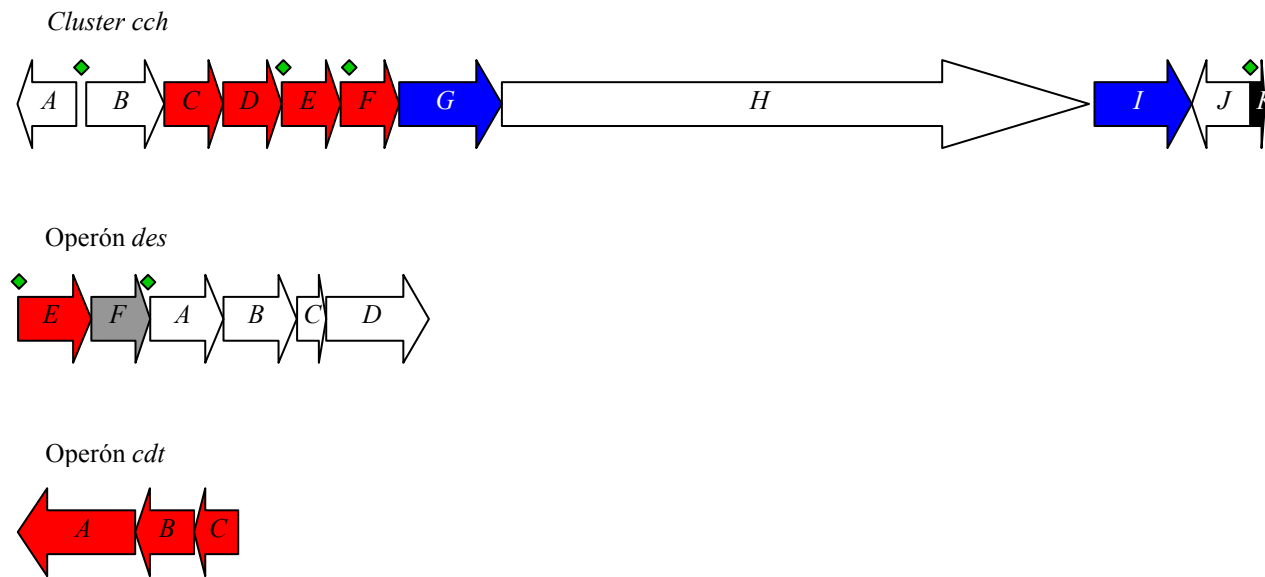


Figura 10. Agrupamientos de genes relacionados con el metabolismo del hierro en *S. coelicolor* M145. Genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos, blanco. Genes relacionados con la excreción de sideróforos, azul. Genes para la obtención de sideróforos, rojo. Genes para la utilización de hierro en el interior de la célula, gris. Genes de función desconocida, negro. *Iron boxes*, rombos verde (Lautru *et al*, 2005; Barona-Gómez *et al*, 2006; Bunet *et al*, 2006).

HIPÓTESIS

Al inactivar algunos elementos de la compleja red de obtención de sideróforos identificados hasta el momento en *S. coelicolor*, es posible evitar o disminuir la adquisición de una de las dos desferroxaminas, promoviendo su acumulación en el sobrenadante de cultivos líquidos, lo cual permite optimizar el proceso de purificación de DFOE y DFOB.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Demostrar *in vivo* la especificidad de los sistemas de transporte de coeliquelina, DFOE y DFOB en *S. coelicolor* en función de su acumulación en el sobrenadante de cultivos líquidos deficientes en hierro, y determinar su posible impacto biotecnológico en la producción diferencial de DFOE/DFOB.

2.2 Objetivos Específicos

- Conocer el rol de las proteína de unión a ligando DesE y CdtB de *S. coelicolor*, en el transporte de sideróforos, por medio de la inactivación cromosomal del gen *desE* y del operón *cdtABC*, respectivamente.
- Analizar la repercusión de la ausencia del *cluster cch* en las mutantes $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$, en el transporte de desferroxaminas.
- Conocer el impacto de la sobreexpresión de los genes *desE* y *cdtB* en el transporte de sideróforos, en distintas mutantes de *S. coelicolor*.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1.1 Inactivación génica de algunos elementos relacionados con el transporte de sideróforos en *S. coelicolor*

La extracción de ADN plasmídico y cromosomal, así como las digestiones con enzimas de restricción y la electroforesis en gel de agarosa, se realizaron de acuerdo con las técnicas estándar de biología molecular (Sambrook *et al*, 1989). Los plásmidos se introdujeron a *E. coli* por métodos químicos estándar (células calcio competentes) o por electroporación (a 1.8 kV o 2.5 kV dependiendo del tipo de celda). Las distintas cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (ver anexo) a 30°C cuando contienen plásmidos termosensibles, y a 37°C cuando carecen de un plásmido con estas características. Ampicilina (100 µg/mL), apramicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), viomicina (30 µg/mL), tetraciclina y tioestreptón se adicionaron al medio de cultivo cuando fue necesario.

1.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

E. coli BW25113 se empleó para propagar el plásmido pIJ790, capaz de recombinar las regiones alrededor de los genes *desE* y *cdtABC*, contenidos en los cósmidos SC105 y SC10G8 de *S. coelicolor*, respectivamente. *E. coli* XL1-Blue se utilizó para propagar el vector de expresión pIJ6902, en el cual se clonaron los genes *desE* y *cdtB* por separado. *E. coli* ET12567/pUZ8002, se utilizó para evitar la metilación del ADN previo a su conjugación con *S. coelicolor* A3(2), para sortear su potente sistema de restricción de ADN metilado (Tabla 1; Fig. 11).

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa/Plásmido	Genotipo relevante	Información adicional
<i>S. coelicolor</i>		
M145	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	Bentley <i>et al</i> , 2002
W3	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph$	Barona-Gómez <i>et al</i> , 2006
TIPV1	$\Delta desE::aac(3)IV$	este estudio
TIPV2	$\Delta cdtABC::aac(3)IV$	este estudio
TIPV3	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta desE::aac(3)IV$	este estudio
TIPV4	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta cdtABC::aac(3)IV$	este estudio
TIPV5	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta desE::aac(3)IV$ pIJ6902 <i>cdtB</i>	este estudio
TIPV6	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta cdtABC::aac(3)IV$ pIJ6902 <i>desE</i>	este estudio
TIPV7	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta desE::aac(3)IV$ pIJ6902 <i>desE</i>	este estudio
TIPV8	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta cdtABC::aac(3)IV$ pIJ6902 <i>cdtB</i>	este estudio
TIPV9	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta desE::aac(3)IV$ pIJ6902	este estudio
TIPV10	$\Delta cchABCDEFGHIJK::vph \Delta cdtABC::aac(3)IV$ pIJ6902	este estudio
<i>E. coli</i>		
BW25113	Derivada de K12: $\Delta araBAD \Delta rhaBAD$	Datsenko & Wanner, 2000
ET12567	<i>dam dcm hsdS cat tet</i>	MacNeil <i>et al</i> , 1992
BT340	DH5 α /pCP20	Datsenko & Wanner, 2000
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) recA1</i>	Stratagene
Plásmidos		
pIJ790	<i>gam bet exo cat araC oriR101 repA101^{ts}</i>	Datsenko & Wanner, 2000
pIJ773	<i>aac(3)IV (Apra^R) oriT (RK2) sitios FRT</i>	Stratagene
pIJ6902	<i>aac(3)IV (Apra^R) tsr (Thio^R) oriT (RK2)</i>	Stratagene
pUZ8002	<i>tra neo RP4</i>	Kieser <i>et al</i> , 2000

1.1.2 Construcción de las mutantes $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$ en *S. coelicolor*

Para inactivar ambos genes se utilizó un método basado en PCR, disponible comercialmente como REDIRECT[®] (Gust *et al*, 2002) (Fig. 11).

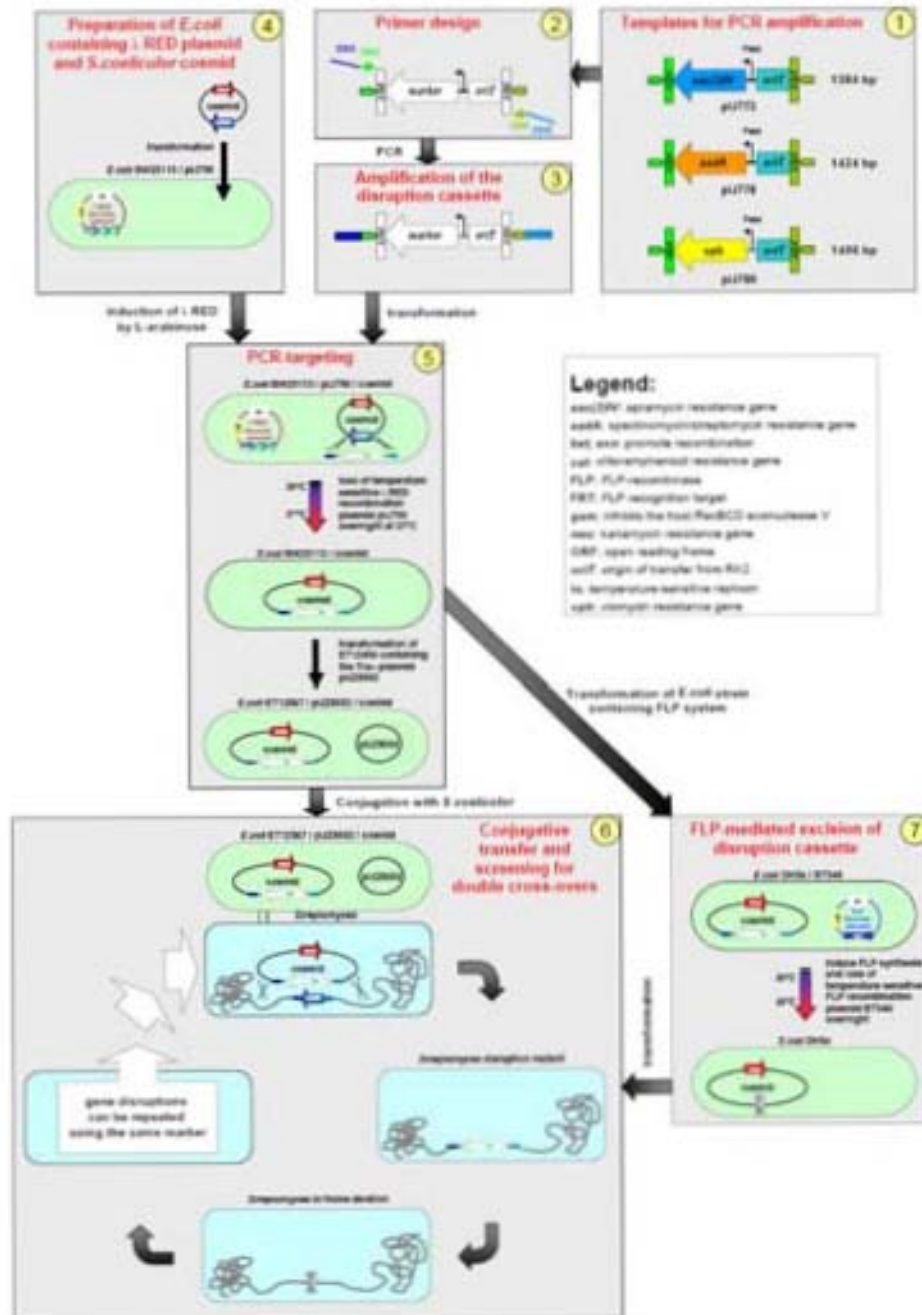


Figura 11. Diagrama general para inactivación génica en *Streptomyces* mediante recombinación homóloga.

Primeramente se digirió el plásmido pIJ773 con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI, el producto liberado fue un cassette constituido por un marcador de resistencia a apramicina *aac(3)IV* y un origen de transferencia *oriT*. Este cassette se utilizó como templado de la PCR usando los oligonucleótidos *mut_desE_For*, 5'-**CGC GAC GCT CCG CAC CGT TCG AAG GCA GCC ACC ACC ATG** att ccg ggg atc cgt cga cc-3', y *mut_desE_Rev*, 5'-**CCG TCC TCA TGA GGG GCT CCG GGG GAG GGG GGC GGG TCA** tgt agg ctg gag ctg ctt c-3'. Estos *primers* (de 59 y 58 nucleótidos, respectivamente) se diseñaron para producir la inactivación del gen *desE* en el cósmido SC105 inmediatamente después de sus codones de inicio y de paro. Los extremos 5' de ambos *primers* (identificados en negritas) complementan con las regiones río arriba y río abajo de *desE*, mientras que los extremos 3' (identificados en minúsculas), de 20 y 19 nucleótidos, respectivamente, complementan con los extremos del cassette *aac(3)IV* (Fig. 11).

El producto de PCR obtenido, se introdujo posteriormente a *E. coli* BW25113/pIJ790/SC105 con el propósito de reemplazar *desE* de SC105, por el marcador de resistencia a apramicina *aac(3)IV*. El cósmido mutagenizado, SC105 Δ *desE::aac(3)IV*, se introdujo en la cepa no metilante *E. coli* ET12567/pUZ8002, para posteriormente ser introducido en *S. coelicolor* mediante conjugación (Fig. 11). Tras la conjugación, 20 colonias fueron sembradas en medio SFM-apramicina y posteriormente en medio SFM-kanamicina. Solamente 4 colonias mostraron resistencia a apramicina (Fig. 12A) y sensibilidad a kanamicina (Fig. 12B) simultáneamente, indicando que el gen silvestre *desE* había sido reemplazado exitosamente mediante recombinación homóloga, por el cassette de resistencia a apramicina *aac(3)IV*.

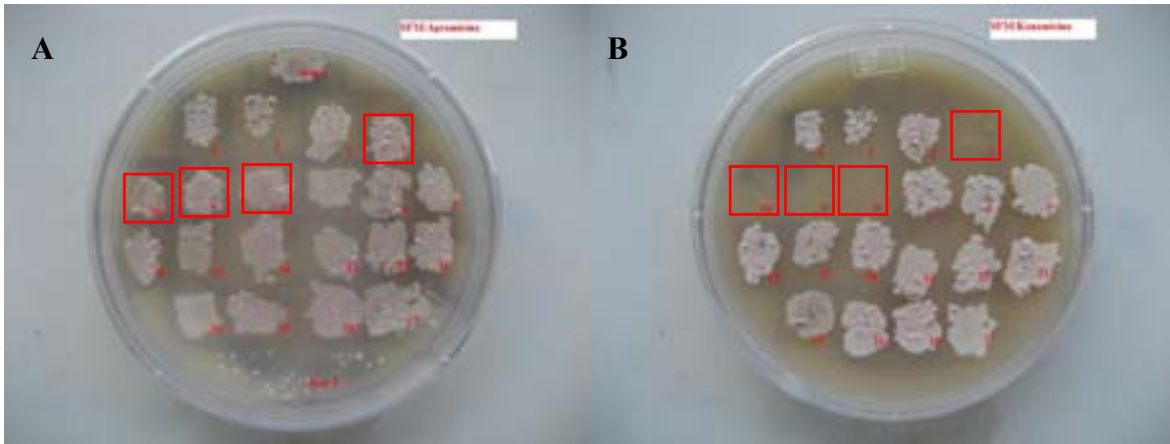


Figura 12. Reemplazo del gen silvestre *desE* de *S. coelicolor* por el cassette de resistencia a apramicina *aac(3)IV*. A) *Screening* $\Delta desE::aac(3)IV$ en medio SFM-apramicina. B) *Screening* $\Delta desE::aac(3)IV$ en medio SFM-kanamicina. Ambas fotografías fueron tomadas después de 5-7 días de incubación a 30°C.

La confirmación de la mutante $\Delta desE::aac(3)IV$ se realizó mediante una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos de *screening* 5'-ATG CTG ATC GCA CGG GAG TTG G-3' y 5'-ACC TGG AGG GCG AAG AAA CG-3', localizados dentro de una región de 200 pb alrededor del gen *desE*. El producto de la reacción fue de 1626 pb, correspondiente con las 1382 pb del cassette *aac(3)IV*, más 168 pb y 76 pb, río arriba y río abajo del gen silvestre, respectivamente.

El reemplazo $\Delta desE::aac(3)IV$ fue suficiente para analizar el papel que juega *desE* en el transporte de sideróforos en *S. coelicolor*. La misma metodología fue empleada para obtener la mutante $\Delta cdtABC::aac(3)IV$, pero empleando los oligonucleótidos apropiados para las distintas PCRs de mutagénesis y de confirmación correspondientes.

1.1.3 Clonación de *desE* y *cdtB* en el vector de expresión pIJ6902

Primeramente, se realizaron reacciones de PCR para amplificar individualmente los genes *desE* y *cdtB*. Los oligonucleótidos *forward* y *reverse* usados para amplificar cada gen, contienen los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, respectivamente (Fig. 13). El par de oligonucleótidos

utilizados para amplificar *desE* fue: *desE_For_NdeI*, 5'-TGA CGG ACC **ATA TGT** CCC ACG CCA GCG CT-3' y *desE_Rev_BamHI*, 5'-ACA CGG ATC CAG GGG GGC GGG TCA GCC-3'; y el par para amplificar *cdtB* fue: *cdtB_For_NdeI*, 5'-GGG AAT TCC **ATA TGA** GAC GCC TCC TGC TCA C-3' y *cdtB_Rev_BamHI*, 5'-ACA CGG ATC CTG TTA GCA GCC GGA TCT GAG-3'. En ambos oligonucleótidos For, el sitio de restricción *NdeI* se indica en negritas, mientras que en ambos *primers* Rev, el sitio de restricción *BamHI* se encuentra subrayado. Ambas amplificaciones se verificaron mediante un gel de agarosa al 1%, esperando productos de ~1063 pb y ~1015 pb para *desE* y *cdtB*, respectivamente.

Una vez amplificados los genes *desE* y *cdtB*, se digirieron ambos productos de PCR, así como el vector de expresión pIJ6902, con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* simultáneamente. La digestión se incubó durante la noche a 37°C. Las digestiones enzimáticas se verificaron al siguiente día, como se ha indicado previamente. Posteriormente, se ligaron individualmente los insertos *desE* y *cdtB* con el vector pIJ6902. Las ligaciones se incubaron durante la noche a 17°C. Al siguiente día, estas construcciones se introdujeron en *E. coli* XL1-Blue, las células transformadas se cultivaron en medio sólido LB-apramicina a 37°C para seleccionar las transformantes positivas. Aquellas colonias resistentes a apramicina, se inocularon en cultivos de 5 mL de medio líquido LB-apramicina para continuar seleccionando el plásmido deseado y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se extrajo el ADN plasmídico de estos cultivos y se confirmó la inserción de *desE* y *cdtB* mediante una PCR de *screening* sobre ambos genes, con productos esperados de ~1370 y ~1320, respectivamente. Los oligonucleótidos de *screening* fueron: *Sc_Com_For*, 5'-CCG AGC GTT CTG AAC AAA TC-3' y *Sc_Com_Rev*, 5'-TTC TCA CTC CGC TGA AAC TG-3' (Fig. 13).

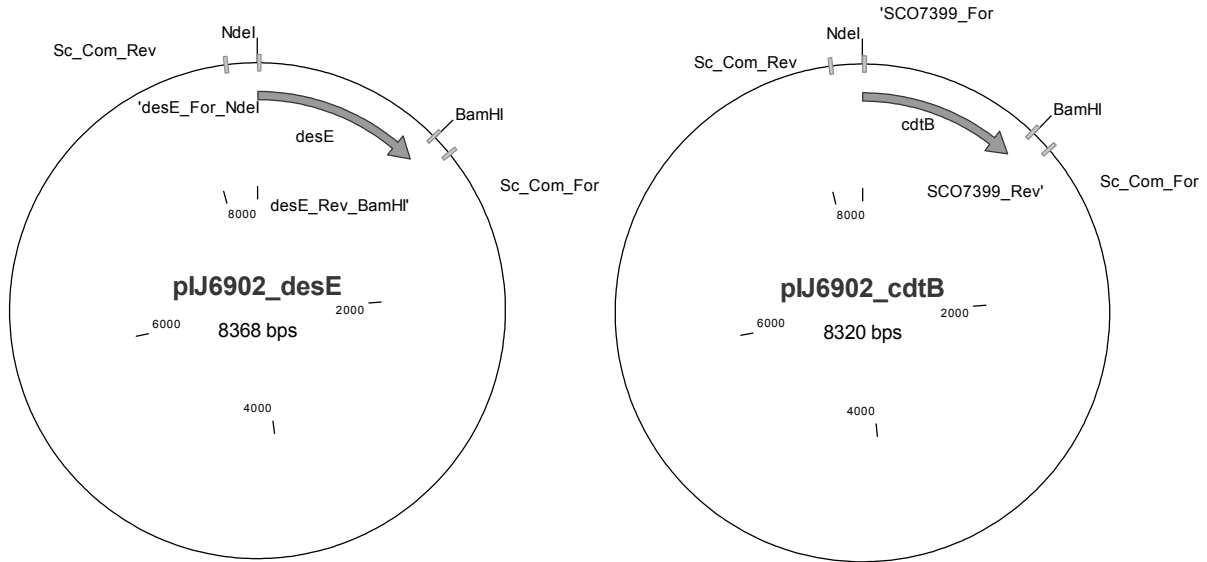


Figura 13. Mapas de las construcciones pIJ6902*desE* y pIJ6902*cdtB*. Los genes *desE* y *cdtB* se indican en flechas. Alrededor de los genes se indican los sitios de restricción *NdeI*, *BamHI* en ambos casos. Las regiones más externas a los genes *Sc_Com_For* y *Sc_Com_Rev*, representan los oligos para PCR de *screening*.

Para introducir las nuevas construcciones así como el vector vacío en *S. coelicolor*, evitando su potente sistema de restricción de ADN metilado, primeramente fue necesario introducir de manera individual los vectores pIJ6902, pIJ6902*desE* y pIJ6902*cdtB* en *E. coli* ET12567/pUZ8002, la cuál es incapaz de metilar el ADN. Las tres cepas resultantes se conjugaron posteriormente con distintas cepas de *S. coelicolor*, M145 (silvestre), TIPV1 y TIPV2, y las dobles mutantes TIPV3 y TIPV4 (Tabla 1). Las conjugaciones se incubaron en placas con medio SFM a 30°C hasta observar la formación de esporas. Como se mencionó anteriormente, se realizó una PCR de aquellas colonias con fenotipo positivo para confirmar la inserción de las construcciones mencionadas. Finalmente se logró obtener una colección de cepas deficientes en uno o varios componentes de tipo ABC involucrados con el transporte de sideróforos en *S. coelicolor*.

1.2 Caracterización de cepas de *S. coelicolor* mutadas en uno o más elementos de transporte de sideróforos

1.2.1 Recuperación de esporas

S. coelicolor fue cultivada rutinariamente a 30°C en medio sólido SFM (Harina de Soya y Manitol) (Kieser *et al*, 2000), hasta observar un polvo fino de color gris sobre la superficie de la placa, que corresponde con la esporulación de las colonias. Cuando se completó la esporulación de las distintas mutantes (que en algunos casos tardó hasta 15 días), se agregaron a la placa 5 mL de solución fisiológica (NaCl, 0.9%). Deslizándose suavemente el asa bacteriológica sobre la superficie de la placa, se desprendió la mayor cantidad posible de esporas, para luego recuperarlas en un tubo estéril de 15 mL. La suspensión de esporas se agitó en el vortex durante dos minutos para separar las esporas adheridas a pequeños trozos de agar, así como para conseguir una mejor dispersión de esporas en la fase líquida. Las muestras se centrifugaron a 2000 rcf durante 10 minutos usando un rotor de balancín. Inmediatamente después, se desechó el sobrenadante, y las esporas se resuspendieron nuevamente en aproximadamente 900 µL de solución fisiológica. La suspensión se transfirió a tubos estériles de 1.5 mL para finalmente agregar aproximadamente 500 µL de glicerol al 100% y obtener suspensiones de esporas al 30% de glicerol las cuales se mantuvieron congeladas a -70°C. Estas suspensiones constituyeron el banco maestro de esporas.

1.2.2 Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica se llevó a cabo en placas de medio R2YE. Cada placa se dividió en secciones del mismo tamaño sobre las cuáles se propagaron aproximadamente 10^6 esporas de las mutantes a analizar. Las placas se incubaron a 30°C y el fenotipo de las mutantes se registro durante 10 días.

1.2.3 Banco de Trabajo

Para fomentar la germinación de esporas y promover que alcanzaran el estado vegetativo, la suspensión de esporas del banco maestro se inoculó en medio GYB a una concentración final del 2%, este medio induce la dispersión del micelio y evita la formación de *pellets*. El cultivo se incubó a 30°C durante 48 h y finalmente se dividió en pequeñas alícuotas de 250 µL. A estas alícuotas se les denominó banco de trabajo y se mantuvieron congeladas a -70°C para conservar su viabilidad.

1.2.4 Preinóculos

Cada alícuota del banco de trabajo se inoculó en matraces de 250 mL que contenían 25 mL de medio GYB a los cuáles se les introdujo un resorte de acero inoxidable de aproximadamente 30 cm para prevenir la formación de *pellets* e incrementar la agitación para inducir la homogeneización de los cultivos, los cuáles se incubaron a 30°C y se agitaron a 300 rpm hasta obtener una OD₄₅₀ de 0.5. En este punto, los cultivos se centrifugaron a 2000 rcf durante 10 minutos usando un rotor de balancín. Después de tirar el sobrenadante, el *pellet* de células se lavó un par de veces con un volumen de medio GG1 usando las mismas condiciones.

1.2.5 Producción de desferroxaminas

Para promover la biosíntesis de desferroxaminas se utilizó el medio GG1 (Avignone-Rossa, comunicación personal), que en principio está diseñado para inducir el metabolismo secundario en *Streptomyces*, adicionado con 2,2-Dipyridyl, un quelante de hierro empleado para reducir la cantidad del metal en los cultivos (Tunca *et al*, 2007). Se inoculó 1 mL de preinóculo previamente obtenido (sección 5.2.4) en 50 mL de medio, que equivale a una OD₄₅₀ inicial aproximada de 0.1. Como se ha mencionado antes, se utilizaron matraces de 250 mL equipados con resortes de acero inoxidable para conseguir la homogeneización de los cultivos. Este medio se inoculó al 1% y se incubó a 30°C/300 rpm durante 7 días, tiempo suficiente para que *S. coelicolor* alcanzara el estado estacionario (Strauch *et al*, 1991).

1.3 Análisis por HPLC de los complejos FeIII-sideróforo

Los cultivos de *S. coelicolor* (50 mL) se filtraron con la finalidad de separar la biomasa de la fase acuosa (sobrenadante). Los sobrenadantes se concentraron al vacío o por liofilización hasta remover la mayor cantidad posible de agua. Los concentrados (sólidos) se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y después se centrifugaron a 16100 rcf durante 5 min para remover las partículas insolubles. A la fracción líquida obtenida en la etapa anterior se adicionaron 10 μ L de FeCl₃ 1M para formar los correspondientes complejos FeIII-sideróforo. Las partículas insolubles formadas al adicionar el FeCl₃ se separaron con otro proceso de centrifugación idéntico al anterior. Finalmente, las muestras se filtraron con una membrana de 0.22 μ m antes de ser inyectadas al HPLC (Barona-Gómez *et al*, 2006). El análisis de HPLC se llevó a cabo en un equipo Agilent 1200 equipado con una bomba binaria y un detector de arreglo de diodos. Las muestras se analizaron en una columna Supelco Discovery HSF5 (150 \times 4.6 mm, 5 μ m i. d., temperatura de la columna 20°C) y se eluyeron con una mezcla de carbonato de amonio 10 mM, pH 7.0 (solvente A) y metanol al 100% (solvente B) a flujo de 1 mL/min (Tabla 2). La presencia de complejos FeIII-sideróforo se detectó midiendo la absorbancia de los compuestos a una longitud de onda de 435 nm.

Tabla 2. Gradiente de solventes adecuado para la recuperación de ferroxaminas a partir de un extracto de cultivo de *S. coelicolor*

minutos	%Carbonato de Amonio 10 mM, pH 7.0 (Solvente A)	% Metanol (Solvente B)
0	90	10
10	90	10
18	0	100
28	0	100
36	90	10
40	90	10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1 Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* en *S. coelicolor*

1.1.1 Las proteínas DesE y CdtABC tienen un rol funcional importante

El cultivo de las distintas mutantes obtenidas en este estudio en medio rico SFM, nos permitió identificar diversos fenotipos. Cuando se analizó el desarrollo de la mutante TIPV1 (Tabla 1) en medio SFM, se observó a partir del tercer día de incubación a 30°C, una esporulación aparentemente precoz con respecto a la cepa silvestre M145 (Fig. 14A). Cuando *S. coelicolor* se somete a estrés nutricional, que en el caso de la mutante TIPV1 probablemente esté asociado con un déficit en la obtención de sideróforos (disminución en el suministro de hierro) provocado por la ausencia de la lipoproteína de unión DesE, se induce la formación de esporas, estructuras de color blanco (fase temprana) y color gris (fase tardía), capaces de sobrevivir durante largo tiempo en condiciones adversas (Chater, 2006). Por su parte, la aparente anticipación en la esporulación de la mutante TIPV2 (Tabla 1) con respecto a la cepa silvestre M145, cuando ambas cepas se cultivaron en medio SFM, sugiere que la falta de los elementos de transporte de sideróforos codificados por el operón *cdt*, también representa un estrés nutricional (Fig. 14A y B).

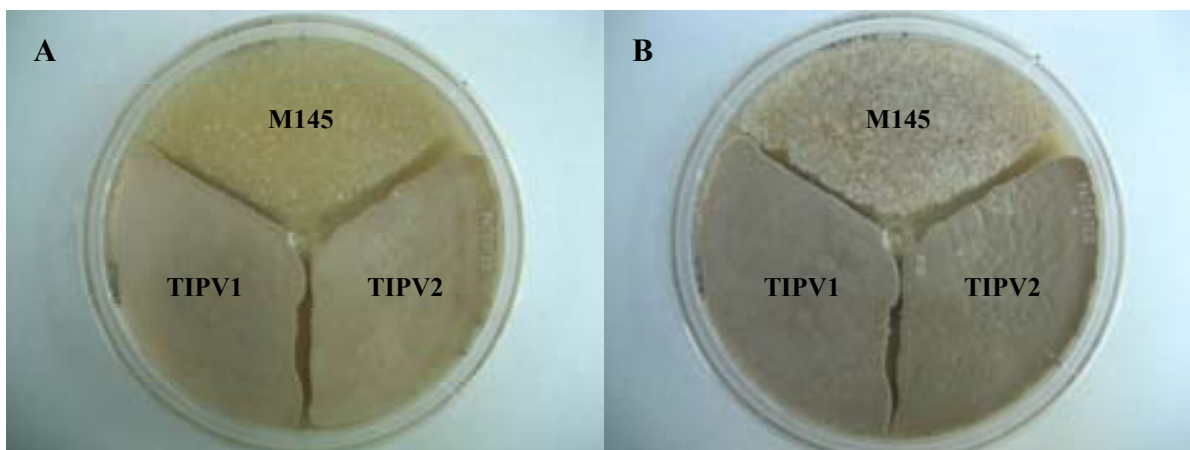


Figura 14. Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* de *S. coelicolor* en medio SFM. La ausencia de DesE y CdtABC en las mutantes TIPV1 y TIPV2, respectivamente, probablemente crean un ambiente de estrés nutricional que aparentemente anticipa la diferenciación morfológica, con respecto a la cepa silvestre M145. A) Desde el tercer día de incubación a 30°C, se observó una pigmentación gris sobre la superficie de las cepas TIPV1 y TIPV2, que no se presentó en la cepa M145. Esta pigmentación se asocia con la formación de esporas. B) Al cuarto día, el aumento en la pigmentación sobre las cepas TIPV1 y TIPV2 sugiere una esporulación avanzada, mientras que la cepa M145 apenas comenzaba a diferenciarse.

Para analizar con mayor detalle estas observaciones, la mutante TIPV1 se cultivó en medio definido R2YE, útil en la detección de pigmentos rojo (prodigininas) y azul (actinorodina), compuestos asociados con el metabolismo secundario de *S. coelicolor*. Al segundo día de incubación a 30°C en estas condiciones, la cepa M145 fue la única que mostró una acumulación de pigmento rojo sobre su superficie (Fig. 15A), mientras que la biosíntesis de prodigininas sobre la superficie de la cepa TIPV1 pudo observarse hasta el tercer día (Fig. 15B). Posiblemente, la disminución en la adquisición de hierro relacionada con la falta de la proteína de unión DesE, perjudica considerablemente el desarrollo de la cepa TIPV1 y retarda su transición al metabolismo secundario a diferencia de la cepa M145. Con respecto a la mutante TIPV2, pudo observarse una esporulación precoz sobre su superficie, en comparación con las cepas M145 y TIPV1 (Fig. 15C). Aparentemente, la cepa TIPV2 tardó más tiempo en sintetizar prodigininas con respecto a las cepas M145 y TIPV1, indicando que la falta de una maquinaria completa de transporte codificada por el operón *cdt*, probablemente provoca un daño mayor en el desarrollo

de *S. coelicolor*, que retrasa la expresión de su metabolismo secundario y anticipa la formación de esporas para permanecer viable (Fig. 15C).

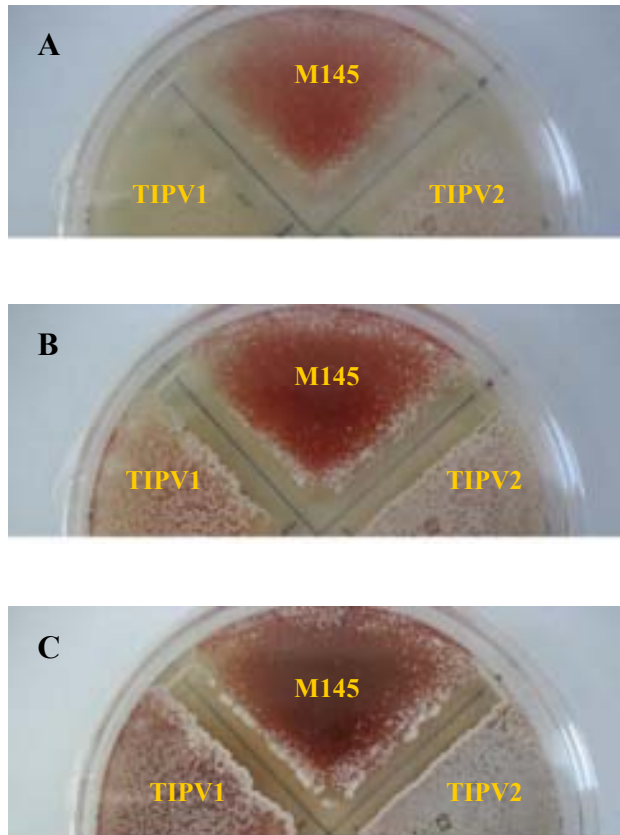


Figura 15. Efecto de la inactivación de los genes *desE* y *cdtABC* de *S. coelicolor* en medio R2YE. Las mutaciones $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$ aparentemente retardan la diferenciación fisiológica de *S. coelicolor*. A) Al segundo día de incubación, únicamente la cepa M145 fue capaz de sintetizar prodigininas. B) Hasta el tercer día pudo apreciarse una ligera síntesis de prodigininas sobre la superficie de la cepa TIPV1. C) Al quinto, la cepa TIPV2 prácticamente carecía de pigmentación rojiza, en contraste, fue posible apreciar la formación de esporas sobre su superficie, señalando que la falta del operón *cdt* tiene un mayor perjuicio en *S. coelicolor* que la ausencia de *desE*.

1.2 Efecto de la combinación de distintas mutaciones en algunos elementos de transporte de ferroxaminas en *S. coelicolor*

Para analizar el funcionamiento de DesE y CdtB en el transporte de ferroxaminas, fue preciso conjugar la mutante W3 con las mutantes TIPV1 y TIPV2 (Tabla 1). Para ello, cantidades equivalentes de esporas de las mutantes W3, TIPV1 y TIPV2 se inocularon por separado en 500 μL de medio 2xYT y se sometieron a un choque térmico a 50°C durante 10 minutos. Después de algunos segundos, la mutante W3 se mezcló con las mutantes TIPV1 y TIPV2, respectivamente. Posteriormente se prepararon diluciones de cada mezcla hasta 10^{-4} y se inocularon 100 μL de cada dilución en placas de medio SFM sin antibiótico adicionadas con MgCl_2 10 mM. Después de incubar estas placas a 30°C entre 16 y 20 h, se agregaron 2.5 mL de agar suave adicionado con

0.75 mg de viomicina y 1.25 mg de apramicina a cada una y continuaron incubándose a la misma temperatura. Finalmente, las conjugantes positivas adquirieron resistencia a viomicina y apramicina.

Cabe mencionar que la mutación $\Delta cchABCDEFGHIJK$ en la cepa W3 impide la biosíntesis de coeliquelina, así como la adquisición de sideróforos a través del transportador CchCDE (Barona-Gómez *et al*, 2006). Por lo tanto, la capacidad de síntesis de desferroxaminas debería permanecer inalterada en las mutantes generadas tras la conjugación de la cepa W3 con las cepas TIPV1 y TIPV2, es decir, TIPV3 y TIPV4, respectivamente (Tabla 1). Además debería evitarse el reconocimiento de la coeliquelina por DesE o CdtB, y también debería evitarse la adquisición de los complejos sideróforo-DesE o sideróforo-CdtB, a través del transportador CchCDE.

Cuando se comparó el desarrollo de las mutantes TIPV3 y TIPV4 en medio R2YE, se observó que los fenotipos asociados con la ausencia de *desE* y *cdtABC* se conservaban. Al cuarto día de incubación a 30°C, aparentemente la cepa TIPV3 (Fig. 16A) anticipó la biosíntesis de pigmentos con respecto a la cepa TIPV4, la cual incluso había comenzado a diferenciar morfológicamente hacia la formación de esporas, detectadas por la superficie blanca que se observó en los bordes de la colonia (Fig. 16B). Esta observación apoya la idea de que la ausencia del operón completo *cdt* (cepa TIPV4) probablemente afecta en mayor medida la adquisición de hierro en *S. coelicolor* que la sola ausencia del gen *desE* (TIPV3). Sin duda, la observación más relevante fue que la mutante TIPV4 conservó su viabilidad (Fig. 16B), a pesar de no contar con ninguno de los transportadores de sideróforos identificados hasta el momento en *S. coelicolor*, CchCDE y CdtAC. Este suceso advierte la existencia de un transportador adicional de sideróforos en *S. coelicolor*, el cual aún no ha sido caracterizado.

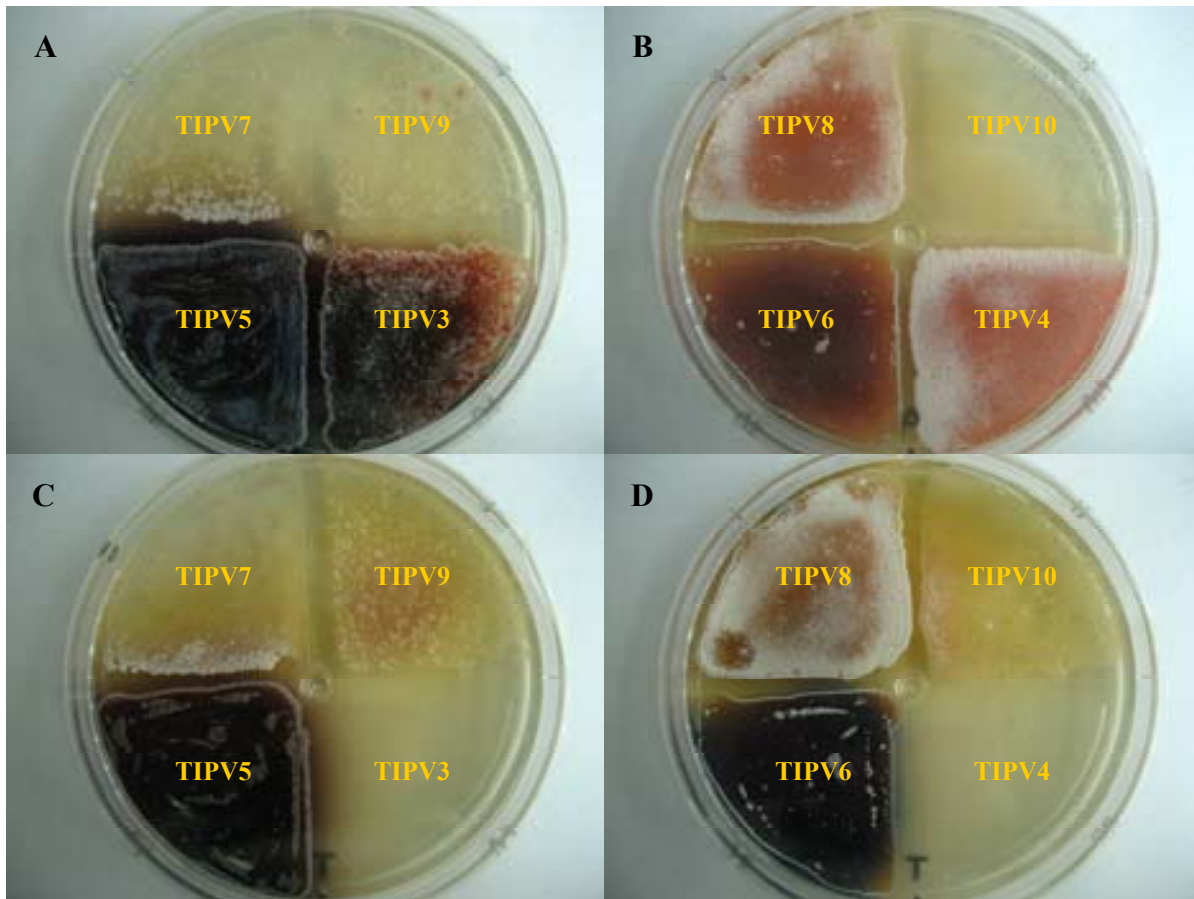


Figura 16. Efecto de las inactivaciones $\Delta desE$ y $\Delta cdtABC$, así como de la sobreexpresión de los genes *desE* y *cdtB*, en un contexto W3. A, B) En cultivos adicionados con apramicina, aparentemente la cepa TIPV3 mostró un mejor desarrollo fisiológico que la cepa TIPV4. Interesantemente, esta última no perdió la viabilidad. C) La sobreexpresión del gen *cdtB* en la cepa TIPV5 no aporta gran beneficio a su desarrollo con respecto a la cepa no inducida. D) La sobreexpresión del gen *desE*, promueve un mejor desarrollo de la TIPV6.

1.3 Efecto de la expresión de *desE* y *cdtB*

Los genes *desE* y *cdtB* se clonaron en el vector pIJ6902, bajo el control del promotor inducible *tipA* para poder manipular la expresión de ambos genes en *S. coelicolor* mediante la adición de tioestrepton al medio de cultivo. Cuando la cepa TIPV5 (Tabla 1) se cultivó en medio R2YE adicionado con apramicina, aparentemente su desarrollo fisiológico en función de la biosíntesis de pigmentos mejoró con respecto a la cepa TIPV3 (Fig. 16A). Probablemente, la

expresión basal del promotor *tipA* induce la biosíntesis de un número reducido de proteínas de unión CdtB en la cepa TIPV5 que seguramente interactúan de manera eficaz con los elementos de transporte CdtAC y contribuyen a facilitar el transporte de ferroxaminas para suministrar de hierro a la bacteria, mejorando su desarrollo fisiológico con respecto a la cepa TIPV3. Este evento revela la importancia de la interacción CdtB-CdtAC en el transporte de ferroxaminas en *S. coelicolor*. En contraste, la cepa TIPV7 (Tabla 1) mostró un deterioro significativo en la biosíntesis de pigmentos con respecto a la cepa TIPV3 (Fig. 16A). Posiblemente, la proteína de unión DesE en la cepa TIPV7, tiene una limitación para interactuar con el transportador CdtAC, que probablemente afecta la adquisición de ferroxaminas. El limitado desarrollo de la cepa TIPV7 advierte la posibilidad de que el vector pIJ6902*desE* le confiere una carga metabólica inusual, similar a lo que podría ocurrir en la cepa TIPV9 (Tabla 1; Fig. 16A), donde únicamente se insertó el vector control.

Por otra parte, cuando la cepa TIPV6 (Tabla 1) se cultivó en medio R2YE adicionado con apramicina, no solo conservó su viabilidad a pesar de la ausencia de los elementos de transporte CchCDE y CdtAC, suceso que confirma la existencia de un cuarto sistema de transporte de ferroxaminas en *S. coelicolor*, sino que la biosíntesis de pigmentos se vio favorecido con relación a la cepa TIPV4 (Fig. 16B). Esta observación sugiere que la proteína de unión DesE es capaz de transportar ferroxaminas a través del cuarto transportador repercutiendo favorablemente en el desarrollo de la cepa TIPV6. Sin embargo, el aparente retraso en la biosíntesis de pigmentos en la cepa TIPV6 (Fig. 16B) con respecto a la cepa TIPV5 (Fig. 16A), sugiere que probablemente la interacción entre la proteína de unión DesE y el cuarto sistema de transporte en la cepa TIPV6, sea menos eficiente que la interacción que existe entre el sistema CdtAC y la proteína de unión CdtB en la cepa TIPV5. Por otro lado, la presencia de la proteína de unión CdtB en la cepa TIPV8 (Tabla 1) no facilitó la biosíntesis de pigmentos como se observó en la cepa TIPV6 (Fig. 16B). Es probable que el cuarto sistema de transporte que se ha mencionado anteriormente, no reconozca a la proteína de unión CdtB con la misma eficiencia que podría reconocer la proteína de unión DesE, perjudicando en mayor medida la adquisición de hierro y por lo tanto el desarrollo de la cepa TIPV8 con relación a la cepa TIPV6. Cuando se insertó el vector control en la cepa TIPV10 (Tabla 1), su desarrollo se vio afectado con respecto a la cepa TIPV4 (Fig. 16B), señalando que la ausencia de cualquier proteína de unión en el vector pIJ6902 no favorece en

ningún sentido la promoción del desarrollo fisiológico de la bacteria, por el contrario genera una carga metabólica que dificulta su desarrollo en términos de la biosíntesis de pigmentos.

Al analizar el desarrollo de la cepa TIPV5 después de haber adicionado tioestrepton al medio de cultivo (Fig. 16C) para inducir la sobreexpresión del gen *cdtB*, no se observó una gran diferencia con respecto al desarrollo mostrado por la misma cepa en medio adicionado con apramicina (Fig. 16A), sugiriendo que la eficiencia del transporte de ferroxaminas cuando se encuentran activos la proteína de unión CdtB y el transportador CdtAC es tal, que no es necesario inducir la sobreexpresión del gen *cdtB* para favorecer la adquisición de hierro en la cepa TIPV5. Sin embargo, cuando la cepa TIPV6 se cultiva en presencia de tioestrepton (Fig. 16D), su desarrollo mejora considerablemente con respecto a la misma cepa cultivada en medio adicionado con apramicina (Fig. 16B). En este caso, la sobreexpresión del gen *desE* si favorece el suministro de hierro dependiente de la proteína de unión DesE y el tercer sistema de transporte del cuál se ha hecho mención anteriormente. Aunque se ha mencionado que la interacción entre estos elementos no es la más eficiente según estos resultados, si es posible inducir el transporte de ferroxaminas cuando se sobreexpresa la proteína de unión DesE en la cepa TIPV6 (Fig. 16D).

Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que DesE no comparte el mismo grado de trascendencia que CdtB, debido a que (i) el transporte de ferroxaminas dependiente de DesE es menos eficiente que el que depende de CdtB, o (ii) que probablemente DesE exhiba cierta especificidad por alguna ferroxamina en particular.

1.4 Acumulación diferencial de DFOE y DFOB producidas por distintas cepas de *S. coelicolor*

La disminución de hierro induce la biosíntesis de sideróforos en cultivos de *S. coelicolor* (Imbert *et al*, 1995); y su detección analítica solo es posible después de añadir FeCl₃ a los sobrenadantes. El FeCl₃ es capturado por los sideróforos, dando lugar a la formación de complejos FeIII-sideróforo, los cuáles adquieren una coloración rojiza. Basta con observar el cambio de coloración en la muestra después de adicionar el FeCl₃, para determinar la presencia de sideróforos. Este análisis cualitativo es de gran utilidad para analizar por HPLC únicamente

aquellas muestras que contienen sideróforos, así se ahorra tiempo y recursos (Fig. 17). Esto resulta importante ya que muchas veces es difícil conseguir el equilibrio adecuado entre la cantidad de hierro mínima que permita a las células crecer correctamente, y aquella que induzca la expresión de los genes encargados de la biosíntesis de sideróforos. Un análisis cualitativo como éste, también permite saber si las condiciones de cultivo son adecuadas para promover eficientemente la producción de sideróforos.

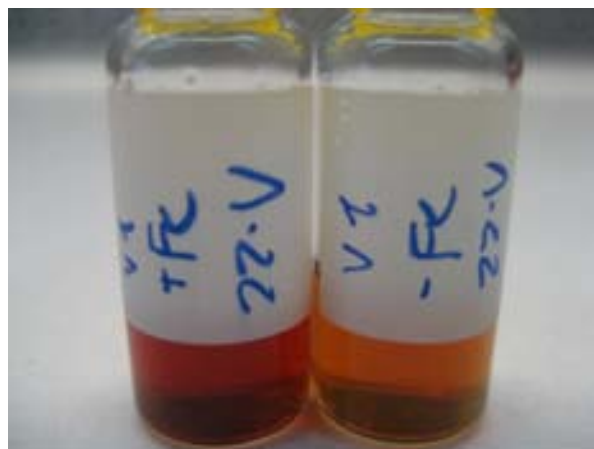


Figura 17. La reducción de hierro induce la biosíntesis de sideróforos en cultivos de *S. coelicolor*. Los complejos FeIII-sideróforos pueden ser detectados cualitativamente mediante la coloración rojiza que adquieren tras la adición de FeCl₃ a los extractos de cultivos de *S. coelicolor*.

Sin embargo, solo el análisis cuantitativo, permitió conocer la cantidad real de desferroxaminas acumuladas en el sobrenadante de las distintas mutantes construidas en este estudio (Fig. 18). Con base en su proporción se puede describir el funcionamiento de algunas proteínas relacionadas con el transporte de hierro en *S. coelicolor*.

Las cepas donde se inactivó la proteína DesE (TIPV1 y TIPV3) acumularon una mayor cantidad de DFOE que DFOB (Fig. 18 y 19), sugiriendo que la proteína de unión DesE muestra una ligera especificidad por DFOE, y por lo tanto, la falta de DesE dificulta el transporte de DFOE al interior de la célula a pesar de la presencia de la proteína de unión CdtB (cepa TIPV3). En contraste, las copias adicionales de DesE presentes en la mutante TIPV6 ayudaron a disminuir la proporción DFOE/DFOB con respecto a las mutantes TIPV1 y TIPV3 e incluso con respecto a

la cepa silvestre M145 (Fig. 18 y 19), estableciendo la posibilidad de que la inducción de DesE favorezca la captura de una mayor cantidad de DFOE y sea capaz de transportarla a través del cuarto sistema de transporte que ha sido mencionado con anterioridad (secciones 6.2 y 6.3).

Cuando se inactivó el operón *cdtABC*, se observó una ligera acumulación de DFOE y DFOB en los sobrenadantes de las cepas TIPV2, TIPV4 y TIPV6, con respecto a la cepa silvestre M145 (Fig. 18), sugiriendo que el sistema CdtABC es capaz de transportar tanto la DFOE como la DFOB. Esta observación resalta una vez más la importancia del sistema CdtABC en la adquisición de hierro en *S. coelicolor*. Adicionalmente, se observó que la sobreexpresión de CdtB en la cepa TIPV5, ayuda a disminuir significativamente la acumulación de DFOE y DFOB en el sobrenadante en relación con el resto de las cepas analizadas (Fig. 18), señalando determinadamente que la proteína de unión CdtB es el elemento responsable de que el sistema CdtAC sea capaz de transportar DFOE y DFOB, y corroborando la eficiencia de reconocimiento entre CdtB y el transportador CdtAC.

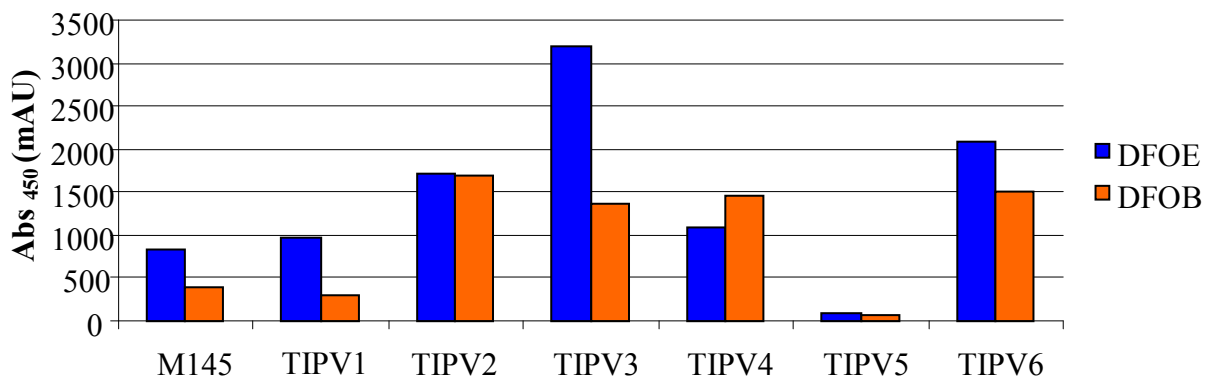


Figura 18. Acumulación de desferroxaminas en distintas cepas de *S. coelicolor*. La ausencia de la proteína de unión DesE en las cepas TIPV1 y TIPV3 ocasionó una mayor proporción DFOE/DFOB con respecto a la cepa silvestre M145. En contraste, la falta del sistema CdtABC en las cepas TIPV2, TIPV4 y TIPV6, no solo genera un incremento en la acumulación de ambas desferroxaminas con respecto a la cepa M145, sino que también reduce la proporción DFOE/DFOB.

El hecho de que la DFOE pueda ser asimilada en ausencia DesE (cepa TIPV5), descarta la posibilidad de que los elementos de transporte promuevan la obtención específica de sideróforos codificados en su mismo operón. La viabilidad de todas las cepas donde fueron inactivados los transportadores codificados por el cluster *cch* y el operón *cdt* simultáneamente, muy probablemente se deba a la existencia de un sistema de tipo ABC en *S. coelicolor* que aún no ha sido caracterizado.

Sobresalientemente, la mutante TIPV4 es la primera cepa de *S. coelicolor* donde se invierte la proporción natural de acumulación de desferroxaminas mostrada por la cepa silvestre (Figs. 18 y 19). Como ha sido mencionado en la sección 1.3.1, la biosíntesis de una proporción equimolar de DFOE:DFOB por la cepa M145, requiere 5 monohidroxamatos hidroxisuccinilcadaverina, de los cuales 3 son oligomerizados para formar la DFOE (Fig. 2). Este suceso señala que independientemente del transporte, existe una tendencia natural hacia la biosíntesis y por lo tanto, la acumulación de una mayor cantidad de DFOE que de DFOB. El hecho de que la mutante TIPV4 muestre una mayor acumulación de DFOB con respecto a la DFOE, definitivamente representa una ventaja tecnológica en términos de la purificación de DFOB a nivel industrial (Fig. 19).

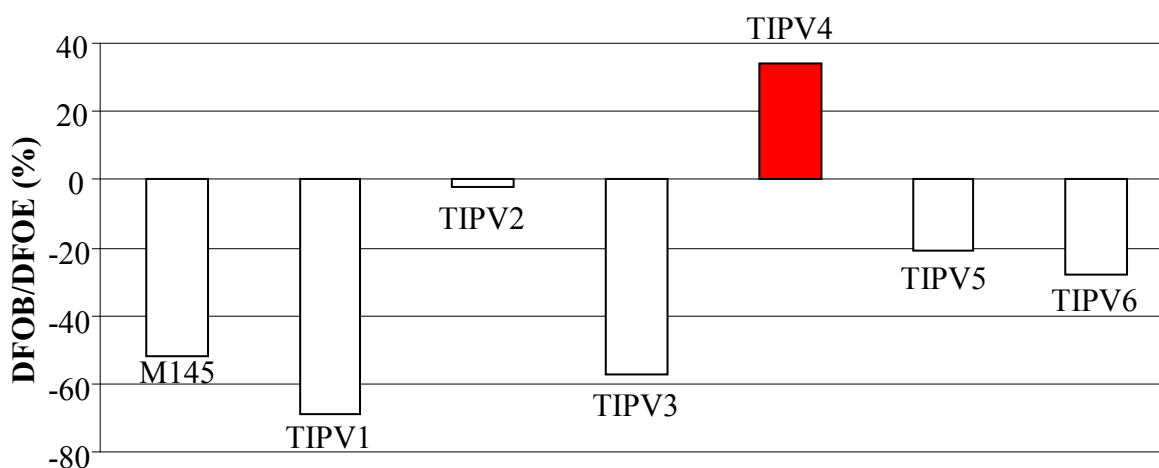


Figura 19. Relación entre la acumulación de DFOB con respecto a la acumulación de DFOE en distintas cepas de *S. coelicolor*. La cepa TIPV4 generó un incremento en la acumulación de DFOB con relación a la acumulación DFOE superior al 30%, convirtiéndose en la primera cepa de *S. coelicolor* que logra invertir la proporción natural de acumulación de desferroxaminas mostrada por la cepa silvestre M145.

1.5 Análisis de la redundancia de sistemas de transporte de hierro en *S. coelicolor*

Todos estos resultados confirman el fenómeno de redundancia en el transporte de sideróforos en *S. coelicolor*, donde una proteína de unión puede reconocer más de un sideróforo, siempre y cuando sean de naturaleza semejante, debido a que la interacción sideróforo-proteína de unión, ocurre principalmente por el reconocimiento de los átomos del sideróforo encargados de coordinar el hierro. La redundancia también se da a nivel de la interacción proteína de unión-transportador, donde un solo transportador puede capturar más de una proteína de unión. Esta redundancia parece haber otorgado a *S. coelicolor* la ventaja evolutiva de sintetizar tres sideróforos distintos e igual número de proteínas de unión capaces de transportar gran variedad de sideróforos en presencia de solo unos cuantos sistemas de transporte, esto sin lugar a duda representa una ventaja en la naturaleza, donde la competencia por la obtención de nutrientes (hierro) es elevada debido a la gran diversidad de especies que cohabitan un mismo nicho ecológico (Haas *et al.*, 2008).

En 2006, Bunet y colaboradores analizaron el genoma de *S. coelicolor* en búsqueda de sistemas de transporte de sideróforos encontrando resultados consistentes con estas observaciones. Además del *cluster cchABCDEFGHIJK* (SCO0499-0489) (Lautru *et al.*, 2005), y los operones *desEFABCD* (SCO2780-2785) (Barona-Gómez *et al.*, 2006) y *cdtABC* (SCO7398-7400) (Bunet *et al.*, 2006); identificaron un pequeño operón constituido por los genes SCO1787, 1786 y 1785 que codifican para dos posibles permeasas y una ATPasa respectivamente, los cuáles muestran alta identidad de secuencia con los genes *cchCDE* y *cdtAC*, tomando en cuenta que *cdtA* codifica para una proteína con dos dominios permeasa (Bunet *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún análisis que describa el modo de acción del operón SCO1787-1785. Los resultados aquí mostrados sugieren que las proteínas codificadas por este operón podrían estar actuando de manera conjunta con la única proteína de unión activa (DesE) en las mutantes TIPV4 y TIPV6. Aparentemente, la proteína de unión codificada por *desE* puede transportar desferroxaminas valiéndose de proteínas de tipo ABC codificadas por genes cuya ubicación en el genoma se encuentra relativamente alejada de *desE*. Esta idea contradice el principio de especificidad y confirma que la adquisición de hierro en *S. coelicolor* y algunos otros organismos, incluyendo bacterias Gram negativas, está sujeta a un fenómeno de redundancia en

el transporte de sideróforos, que permite a un solo transportador ABC el reconocimiento de distintas proteínas de unión, y por lo tanto, el transporte de distintos sideróforos de naturaleza también distinta sin importar el distanciamiento en el cromosoma de los genes que codifican para ambos elementos de transporte (Moore & Helmann, 2005; Cuív *et al*, 2007).

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El metabolismo de hierro en *S. coelicolor* está sujeto a un complejo sistema de transporte de sideróforos, donde las lipoproteínas de unión DesE y CdtB juegan un papel fundamental. DesE asegura el transporte ininterrumpido de la DFOE, mientras que CdtB interviene en el reconocimiento tanto de la DFOE como de la DFOB. Esta última observación es consistente con el hecho de que la presencia de copias adicionales de CdtB, restablece el correcto desarrollo morfológico y fisiológico de algunas cepas. Aparentemente existe un cuarto sistema de transporte de sideróforos en *S. coelicolor*, capaz de reconocer la proteína de unión DesE con mayor eficiencia que CdtB. Con base en esto, el contexto genómico que mejor promueve la acumulación de DFOB sobre DFOE y que más se asemeja a una cepa industrial de *S. coelicolor* para la purificación de DFOB, es $\Delta cchABCDEFGHIJK \Delta cdtABC$ (cepa TIPV4) (Fig. 19). Sin embargo es necesario reducir aún más la cantidad de DFOE que permanece en el sobrenadante de esta cepa para conseguir una mutante de *Streptomyces* productora de DFOB que evite el proceso de purificación. Una alternativa sería restablecer el *cluster cdt* y sobreexpresar DesE, la cuál parece asociarse preferentemente con la DFOE.

Debido a que los fines de este proyecto obedecen a la obtención de una cepa potencialmente industrial, es deseable remover los marcadores de resistencia de la cepa TIPV4. La metodología para lograr una cepa no marcada, denominada *scar*, involucra una doble recombinación homóloga alrededor de los marcadores de resistencia *vio* y *apra* en la cepa TIPV4. Este proceso eliminaría los marcadores del cromosoma de *S. coelicolor*, dejando en su lugar una secuencia de apenas 81 pb y por lo tanto una cepa compatible con su uso industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Aisen, P., Enns, C. & Wessling-Resnick, M. 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 940-959.

Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A., Derrick, P. & Challis, G. 2004. Identification of a *cluster* of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16282-16283.

Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F., Leblond, P., Pernodet, J. & Challis, G. 2006. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* **152**, 3355-3366.

Bax, R. 2001. How to evaluate and predict the ecological impact of antibiotics: the pharmaceutical industry view from research and development. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **7**, 46-48.

Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A. & 40 other authors. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.

Braich, N. & Codd, R. 2008. Immobilised metal affinity chromatography for the capture of hydroxamate-containing siderophores and other Fe(III)-binding metabolites directly from bacterial culture supernatants. *Analyst* **133**, 877-880.

Bunet, R., Brock, A., Rexer, H. & Takano, E. 2006. Identification of genes involved in siderophore transport in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett.* **262**, 57-64.

Challis, G. & Ravel, J. 2000. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiology Letters* **187**, 111-114.

Challis, G. & Naismith, J. 2004. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **14**, 748-756.

Challis, G. 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of non ribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **6**, 601-611.

- Chaston, T. & Richardson, D.** 2003. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity and toxicity. *American Journal of Hematology* **73**, 200-210.
- Chater, K.** 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**, 761-768.
- Chen, J., Sharma, S., Quijcho, F. & Davidson, L.** 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding-cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:1525–1530.
- Chipperfield, J. & Ratledge, C.** 2000. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *BioMetals* **13**, 165-168.
- Clarke, T., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L. & Vogel, H.** 2002. X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13966-13972.
- Codd, R.** 2008. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coordination Chemistry Reviews* **252**, 1387-1408.
- Crosa, J. & Walsh, C.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 223-249.
- Cuiv, P., Keogh, D., Clarke, P. & O'Connell, M.** 2007. FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane. *Journal of Bacteriology* **189**, 284-287.
- Datsenko, K. & Wanner, B.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* **12**, 6640-6645.
- Davidson, A., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J.** 2008. Structure, function and evolution of ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 317-364.
- Dayani, P., Bishop, M., Black, K. & Zeltzer, P.** 2004. Desferrioxamine (DFO)-mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. *Journal of Neuro-Oncology* **67**, 367-377.
- Demain, A.** 1988. Contribution of genetics to the production and discovery of microbial pharmaceuticals. *Pure & Appl. Chem.* **60**, 833-836.
- Demain, A.** 2000. Microbial biotechnology. *Tibtech* **18**, 26-31.

- Demain, A. & Adrio, J.** 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* **38**, 41-55.
- Flores, F., Barreiro, C., Coque, J. & Martín, J.** 2005. Functional analysis of two divalent metal-dependent regulatory genes *dmdR1* and *dmdR2* in *Streptomyces coelicolor* and proteome changes in deletion mutants. *FEBS Journal* **272**, 725-735.
- Flores, F. & Martín, J.** 2004. Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different ADN-protein complexes with iron boxes. *Biochemical Journal* **380**, 497-503.
- Franza, T., Mahé, B. & Expert, D.** 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology* **55**, 261-275.
- Gaumann, E., Prelog, V., Bickel, H. & Vischer, E.** 1964. Process for the manufacture of desferrioxamines. Ciba Corporation. Switzerland. *Unites States Patent* **3,158,552**.
- Gust, B., Kieser, T. & Chater, K.** 2002. PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. *John Innes Centre*, Norwich Research Park.
- Haas, H., Eisendle, M. & Turgeon, G.** 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopatol.* **46**, 149-187.
- Harwani, S., Roginsky, A., Vallejo, Y. & Castignetti, D.** 1997. Further characterization and proposed pathway of deferrioxamine B catabolism. *BioMetals* **10**, 205-213.
- Imbert, M., Béchet, M. & Blondeau, R.** 1995. Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces*. *Current Microbiology* **31**, 129-133.
- Kadi, N., Oves-Costales, D., Barona-Gómez, F. & Challis, G.** 2007. A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nature Chemical Biology* **3**, 652-656.
- Keri, V., Czovek, Z. & Mezo, A.** 2005. Multistage process for the preparation of highly pure deferroxamine mesylate salt. Biogal Gyogyszergyár Rt. Debrecen, HU. *Unites States Patent* **6,858,414**.
- Kieser, H., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K. & Hopwood, D.** 2000. Practical *Streptomyces* genetics. *Norwich*.
- Lautru, S., Deeth, R., Bailey, L. & Challis, G.** 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology* **1**, 265-269.

- Linton, K. & Higgins, C.** 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Eur. J. Physiol.* **453**, 555-567.
- Locher, K., Lee, A. & Rees, D.** 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091-1098.
- MacNeil, D., Gewain, K., Ruby, C., Dezeny, G., Gibbons, P. & MacNeil, T.** 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **1**, 61-68.
- Moore, C. & Helmann, J.** 2005. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 188-195.
- Müller, G. & Raymond, K.** 1984. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of Bacteriology* **160**, 304-312.
- Pierwola, A., Krupinski, T., Zalupski, P., Chiarelli, M. & Castignetti, D.** 2004. Degradation pathway and generation of monohydroxamic acids from the trihydroxamate siderophore deferrioxamine B. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 831-836.
- Pinkett, H., Lee, A., Lum, P., Locher, K. & Rees, D.** 2007. An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315**, 373-377.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual.
- Sebulsky, M. & Heinrichs, D.** 2001. Identification and characterization of *fhuD1* and *fhuD2*, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **183**, 4994-5000.
- Sebulsky, M., Shilton, B., Speziali, C. & Heinrichs, D.** 2003. The role of FhuD2 in iron(III)-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus* – Demonstration that FhuD2 binds iron (III)-hydroxamates but with minimal conformational change and implication of mutations on transport. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 49890-49900.
- Schupp, T., Toupet, C. & Divers, M.** 1988. Cloning and expression of two genes of *Streptomyces pilosus* involved in the biosynthesis of the siderophore desferrioxamine B. *Gene* **64**, 179-188.
- Stefansson, A.** 2007. Iron(III) hydrolysis and solubility at 25°C. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 6117-6123.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H. & Bibb, M.** 1991. The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **2**, 289-298.

- Telford, J. & Raymond, K.** 1998. Coordination chemistry of the amonabactins, bis (catecholate) siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *Inorganic Chemistry* **37**, 4578-4583.
- Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. & Martín J.** 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 Journal* **274**, 1110-1122.
- Warshawsky, A., Warshawsky, R., Youdim, M. & Ben-Shachar, D.** 2005. Pharmaceutical compositions comprising iron chelators for the treatment of neurodegenerative disorders and some novel iron chelators. Yeda Research and Development Co. Ltd. & Technion Research and Development Foundation Ltd. IL. *United States Patent* **6,855,711**.
- Winkelmann, G., Busch, B., Hartmann, A., Kirchhof, G., Sübmuth, R. & Jung, G.** 1999. Degradation of desferrioxamines by *Azospirillum irakense*: assignment of metabolites by HPLC/electrospray mass spectrometry. *BioMetals* **12**, 255-264.
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H., Hosona, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. & Ueda, T.** 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* **151**, 2899-2905.

ANEXO

Medio GG1

	g/L
Glucosa	15
Glicerol	15
Peptona de Soya	15
NaCl	3
CaCO ₃	1

Medio GYB

	g/L
Glucosa	33
Extracto de levadura	15

Medio LB

	g/L
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10

Medio R2YE

	g/L
Sacarosa	128.75
K ₂ SO ₄	0.31
MgCl ₂ *6H ₂ O	12.65
Glucosa	12.5
Casaminoacidos	.125
Agar	27.5

Antes de usar, fundir el medio y adicionar las siguientes soluciones estériles en este orden:

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	10 mL
CaCl ₂ (2.78%)	80 mL
L-Prolina (20%)	14 mL
Buffer TES (5.73%, pH 7.2)	100 mL
NaOH (1 N)	5 mL
Extracto de Levadura (10%)	50 mL
Elementos traza ^a	2 mL
^a Solución de elementos traza	L ⁻¹
ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ *6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ *2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ *4H ₂ O	10mg
Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	10 mg

Medio SFM

	g/L
Manitol	20
Harina de Soya	20
Agar	20

Medio 2xYT

	g/L
Triptona	16
Extracto de Levadura	10
NaCl	5