

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 862**

21 Número de solicitud: 202330352

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**05.05.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.11.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
Avda. del Hospicio, s/n  
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**CONTRERAS MORENO, Francisco Javier y  
MUÑOZ DORADO, José**

74 Agente/Representante:

**SAN MARTÍN ALARCIA, Esther**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Producción de mixoquelinas a partir de una cepa mutante de *Myxococcus xanthus***

57 Resumen:

Cepa mutante de *Myxococcus xanthus* capaz de producir mixoquelinas en grandes cantidades, procedimiento de obtención de dicha cepa y usos de la misma.

**ES 2 988 862 A1**

## DESCRIPCIÓN

### Producción de mixoquelinas a partir de una cepa mutante de *Myxococcus xanthus*

#### CAMPO TÉCNICO

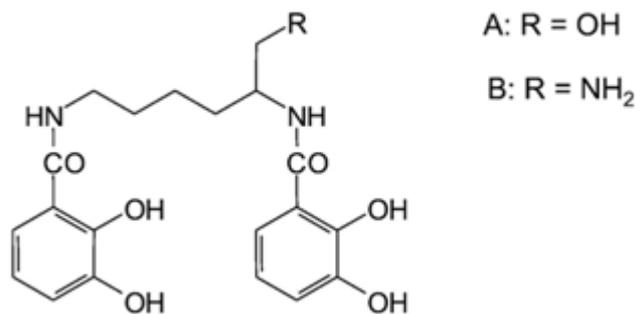
La presente invención se enmarca en el campo de la Biotecnología y de la Microbiología. En concreto, la invención está dirigida a la obtención, a partir de microorganismos modificados genéticamente, de compuestos orgánicos de interés industrial, en este caso, de un tipo de sideróforos como son las mixoquelinas.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

Los sideróforos son moléculas de pequeño tamaño y de naturaleza química variada secretadas por microorganismos. Presentan una gran afinidad por el ion hierro  $Fe^{3+}$ , la forma en la que se encuentra el hierro en condiciones óxicas. Este ion hierro  $Fe^{3+}$  tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por tanto se encuentra poco disponible en muchos medios naturales. Los sideróforos forman complejos con estos iones, quelándolos y haciéndolos así disponibles para los microorganismos, de forma que puedan abastecerse de las cantidades de este metal necesarias para vivir. Debe tenerse en cuenta que el hierro es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos.

Actualmente los sideróforos son utilizados en muy diversos campos, entre otros, en Medicina, donde se han utilizado como transportadores de fármacos en el organismo o para tratar enfermedades originadas por un exceso de hierro (1).

Las mixoquelinas son sideróforos que quelan el hierro del medio con una altísima afinidad. Estas sustancias son producidas por *Myxococcus xanthus*, de quien toma el nombre, y también por otros microorganismos. Fue descubierta por Kunze *et al.*, en 1989 (2) y existen dos tipos de ellas, la mixoquelina A y la mixoquelina B, las dos producidas por *M. xanthus*. La fórmula molecular de la mixoquelina A es  $C_{20}H_{24}N_2O_7$ , su nombre de acuerdo con IUPAC (3) es: N-[(5S)-5-[(2,3-dihidroxibenzoil)amino]-6-hidroxi-hexil]-2,3-dihidroxibenzamida. Mientras que la fórmula de la mixoquelina B es  $C_{20}H_{25}N_3O_6$ , y se la denomina N-[(5S)-6-amino-5-[(2,3-dihidroxibenzoil)amino]hexil]-2,3-dihidroxibenzamida. La fórmula general de las mixoquelinas, con la especificación de los radicales que diferencian a la A de la B, es la siguiente.



Como ocurre con otros sideróforos, las bacterias solamente producen mixoquelinas cuando se encuentran en presencia de bajas concentraciones de hierro, lo que a su vez afecta a la viabilidad y crecimiento de los microorganismos implicados en su producción. Además, los 5 niveles que se producen de estos sideróforos son relativamente bajos de cara a posibilitar su explotación a nivel industrial. Por ello, la producción de estos compuestos y su purificación resulta laboriosa y costosa. La producción actual es bastante escasa y está limitada a unas pocas empresas, lo que impide su comercialización en grandes cantidades.

En concreto, las mixoquelinas tienen multitud de aplicaciones en muy diversos campos, 10 entre los que destacan el campo de la salud, para el tratamiento del cáncer, donde se ha demostrado que es citotóxico para ciertas células cancerosas humanas, como células de cáncer de colon, pudiendo ser utilizado como antitumoral. También se ha demostrado que las mixoquelinas inhiben la actividad de la 5-lipoxigenasa humana implicada en la enfermedad de este mismo nombre, que causa artritis reumatoide, aterosclerosis, 15 enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes, rinitis alérgica, conjuntivitis, asma, erupciones cutáneas, eczema y coronariopatías.

Su uso también está siendo evaluado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la absorción de hierro, como en la hemocromatosis hereditaria, donde el hierro no se adquiere de forma eficiente por el organismo, o aquellas donde se da una absorción 20 exagerada de hierro porque el organismo no dispone de un mecanismo eficaz para su eliminación, ya que el exceso de hierro puede inducir un estado de estrés oxidativo celular persistente con daño tisular y, eventualmente, fallo multiorgánico. También se puede utilizar para tratar enfermedades relacionadas con el acumulo de hierro en ciertos órganos y síndromes mielodisplásicos y trastornos hemáticos con hematopoyesis ineficaz.

25 Se conoce su uso como antimicrobiano contra multitud de bacterias patógenas del género *Bacillus*, como *B. brevis* (DSM30), *B. cereus* (DSM621), *B. megaterium* (DSM32), *B. subtilis*

(DSM10), *B. thuringiensis* (DSM2046), y otras como *Micrococcus luteus* (GBF26), *Staphylococcus aureus* (GBF16), *Arthrobacter simplex* (DSM20130), *Brevibacterium linens* (DSM20425), *Corynebacterium fascians* (DSM20131), *Nocardia corallina* (ATCC13258) y *Escherichia coli* (DSM498). Estudios recientes apoyan la idea de utilizar sideróforos como  
5 antibióticos para tratar infecciones por estos microorganismos. En todos estos ejemplos, las mixoquelinas impedirían que los patógenos pudieran crecer al no disponer del hierro suficiente.

En el campo de la investigación, las mixoquelinas se pueden utilizar como quelante de alta eficiencia para la sobreexpresión de ciertos antibióticos en algunas bacterias o para estudiar  
10 el efecto de los sideróforos de patógenos sobre el sistema inmune humano.

Se plantean también como candidatas óptimas para sustituir al 2,2-dipiridilo, el agente secuestrador de hierro más utilizado en los laboratorios de investigación actualmente, que es mucho menos eficaz que las mixoquelinas.

Se han descrito muchas otras aplicaciones de este compuesto en áreas como la  
15 biorremediación, para tratar suelos y aguas contaminados con altas concentraciones de hierro; la agricultura, ya que resultan beneficiosos para las plantas; y la alimentación, como suplemento de hierro en pacientes con anemia o como aditivo con hierro en los productos alimenticios alternativos vegetarianos y veganos, donde puede adicionar hierro sin que sea de origen animal.

20 El proceso de síntesis de las mixoquelinas en *M. xanthus* es bien conocido, aunque se desconoce cómo se regula la expresión de estos genes.

En la actualidad, se han propuesto dos estrategias para tratar de aumentar la producción de esta molécula. Por un lado, se ha planteado la delección del gen que codifica el represor que actúa como factor de transcripción de los genes implicados en su síntesis como una posible  
25 alternativa para obtener mayores cantidades de este compuesto. Una bacteria con dicho gen delecionado produciría cantidades grandes de sideróforos en medios convencionales, independientemente de la cantidad de hierro que haya en ellos. Sin embargo, existen numerosas dificultades para obtener un mutante de este tipo, al menos en *M. xanthus*, al no conocerse hasta la fecha los reguladores implicados.

30 Un estudio previo (4) propuso la existencia de dos genes principales como candidatos a ser el regulador Fur encargado de la represión de la biosíntesis de la mixoquelina. En dicho estudio solamente se consiguió mutar uno de los dos genes, descartándose ese como

regulador. Así, dedujeron que tendría que ser el otro gen el regulador pero sin demostrarlo experimentalmente. El gen propuesto sería el identificado en el genoma de *M. xanthus* con el identificador genómico MXAN\_3702. Sin embargo, este gen había sido descrito como un gen vital, cuya delección provocaba muerte celular, razón por la cual no se ha obtenido un mutante de este tipo hasta el momento. Por ese motivo, tampoco se había podido demostrar que efectivamente se tratara del regulador de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de las mixoquelinas.

Otra estrategia consistiría en expresar en un sistema heterólogo los genes implicados en la biosíntesis de las mixoquelinas. Sin embargo, en la biosíntesis de las mixoquelinas de *M. xanthus* intervienen 8 genes de gran tamaño, por lo que es muy difícil obtener cepas modificadas genéticamente capaces a su vez de producir una gran cantidad de estos sideróforos. Se han llevado a cabo pruebas en este sentido tratando de clonar los genes responsables de la biosíntesis de las mixoquelinas en bacterias como *Pseudoalteromonas piscicida* para producir un compuesto alternativo llamado “pseudomixoquelina” (5). Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un organismo modificado genéticamente que efectivamente sobreproduzca este tipo de sideróforos utilizando esta estrategia.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente memoria describe una cepa mutante de *Myxococcus xanthus*, que presenta una delección en el gen que codifica el factor de transcripción responsable de reprimir la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de la biosíntesis de los sideróforos mixoquelinas. Este gen regulador, identificado previamente como MXAN\_3702, no se había podido mutar anteriormente y tampoco se había podido demostrar que ejerciera esta función.

En la presente memoria se describe cómo se ha conseguido obtener un mutante donde dicho gen está delecionado, y así comprobar que efectivamente funciona reprimiendo la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de las dos mixoquelinas. Como consecuencia de ello, el mutante de *M. xanthus* es capaz de producir mixoquelinas en grandes cantidades.

El identificador genómico MXAN\_3702 codifica un regulador de tipo Fur (“*Ferric Uptake Regulator*” o Regulador de la captación de hierro) (6). Por este motivo, al gen de la invención se le ha denominado como “***furA***”.

Los reguladores de tipo Fur aparecen en forma activa, y por tanto reprimen la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de mixoquelina, cuando se une a  $Fe^{2+}$ , forma en la que normalmente el hierro que es captado por los sideróforos, ya que una vez se introduce al citoplasma, es reducido a  $Fe^{2+}$ , siendo éste es el que activa al represor Fur. Por el contrario, en ausencia de hierro, no se une al metal, se inactiva, y permite que se expresen esos genes que se encuentran bajo su control.

En el contexto de la presente invención, **FurA** se define como la proteína con la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO: 1**, siendo esta la siguiente:

MARTRGDFEGFLMSNSHSHHHDDHDKDEGLARYMAQHGLKSTRQRSLIIDTFFAVGGHLS  
 10 VEELWNVKREQDTKVSVAIVYRTMKLLSECGLAHARNFGDGQTRYEAAAGRDHHDHLVCT  
 RCGTIIEFENERIEALQDAVARKHGFKVTSHKMELYGLCRDCQRAGSAASEA

FurA también está definido por la molécula de ácido nucleico que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

15 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración  
 20 del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FurA.

25 Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia nucleotídica aquí nombrada como la **SEQ ID NO: 2** y que corresponde con el **gen furA**:

ATGGCGCGGACCCGCGGCGACTTTGAAGGATTTCTCATGAGCAACAGTCACAGCCATC  
 ACCACGACGACCACGACAAGGACGAGGGGCTTGCCCGCTACATGGCCCAGCACGGCC  
 TGAAGAGCACGCGGCAGCGCAGCCTCATCATCGACACGTTCTTCGCGGTGGGAGGCC  
 30 ACCTGTCGGTGGAGGAGCTGTGGAACAAGGTGCGTGAACAGGACACCAAGGTGTCCGT

CGCCACCGTTTACCGGACCATGAAGCTGCTCAGCGAGTGTGGCCTGGCCCACGCGCG  
 CAACTTCGGGGACGGGCAGACGCGCTACGAGGCGGCCGCGGGGCGCGACCACCATG  
 ACCACCTGGTCTGTACGCGCTGCGGCACCATCATCGAGTTCGAGAACGAGCGCATCGA  
 GGCGCTTCAGGACGCCGTGGCCCGCAAGCACGGCTTCAAGGTGACGTGCGACAAGAT  
 5 GGAGCTGTACGGCCTGTGTGCTGACTGTCAGCGGGCCGGGTGCGCCGCCTCGGAGGC  
 CTGA

El mutante de *M. xanthus* obtenido por la delección del gen *furA*, lo denominaremos en la presente memoria como  **$\Delta furA$** . Este mutante  $\Delta furA$  es capaz de producir muchos más sideróforos que la cepa silvestre de *M. xanthus*. Por tanto, los sobrenadantes de los medios  
 10 de cultivo en los que ha crecido este mutante se encuentran muy enriquecidos en mixoquelinas.

Se propone así un método de producción de los sideróforos mixoquelinas a partir del cultivo de esta cepa de *M. xanthus* modificada genéticamente.

Por tanto, un primer **aspecto** de la invención se refiere a la cepa mutante de *Myxococcus*  
 15 *xanthus* o cepa  $\Delta furA$ , obtenida mediante delección del gen *furA*, cuyo identificador genómico es MXAN\_3702 y cuya secuencia es la nombrada como SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el mutante es obtenido a partir de la cepa silvestre *M. xanthus* DK1622.

Un segundo **aspecto** de la invención se refiere al procedimiento de obtención de la mutante de *M. xanthus* que comprende las siguientes etapas:

20 a) electroporar una cepa silvestre de *M. xanthus* con un plásmido que contiene la región aguas arriba y abajo del gen *furA*, y

b) delecionar el gen *furA* del genoma de *M. xanthus* mediante doble recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma de *M. xanthus*.

Preferiblemente, el plásmido del paso a) se construye a partir del vector pBJ113 y los  
 25 oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 que anillan con la región aguas arriba del gen *furA* y los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que anillan con la región aguas abajo del gen *furA*, digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* y *BamHI* y *EcoRI* respectivamente.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el plásmido del paso a) es  
 30 clonado en *Escherichia coli*.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el procedimiento además comprende:

c) seleccionar la cepa mutante de *M. xanthus* que presenta delección del gen *furA*.

Un tercer **aspecto** de la invención se refiere al uso de la cepa mutante de *M. xanthus* para la  
5 producción de mixoquelinas.

Un cuarto **aspecto** de la invención se refiere al procedimiento de obtención de mixoquelinas utilizando la cepa mutante de *M. xanthus* que comprende las siguientes etapas:

a) crecer la cepa mutante de *M. xanthus* en medio líquido, y

b) extraer las mixoquelinas del sobrenadante.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el crecimiento de la cepa mutante de *M. xanthus* se lleva a cabo a temperatura de 30°C.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Comprobación de la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de PCR y vector PBJ113 digeridos. En la primera calle el marcador de peso molecular, los tamaños de  
15 los fragmentos vienen expresados en pb a la izquierda. En la segunda calle el vector PBJ113 linealizado con un tamaño de 5000 pb. En la tercera y cuarta calle los fragmentos aguas arriba y aguas abajo del gen de interés, de 800 y 796 pb respectivamente (valores indicados a la derecha).

**Figura 2.** Comprobación de la electroforesis en gel de agarosa del plásmido candidato. En  
20 la primera calle el marcador de peso molecular, los tamaños de los fragmentos vienen expresados en pb a la izquierda (izquierda). En la segunda calle el plásmido candidato circular y en la tercera el vector PBJ113 circular a modo de control.

**Figura 3.** Comprobación de la electroforesis en gel de agarosa del plásmido candidato. En  
25 expresados en pb a la izquierda (izquierda). En la segunda calle los fragmentos del plásmido digerido con *HindIII* y *BamHI*, 5796 y 800 pb. En la tercera calle el producto de PCR del fragmento aguas arriba a modo de control, 800 pb. En la cuarta calle los fragmentos del plásmido digerido con *BamHI* y *EcoRI*, 5800 y 796 pb. En la quinta calle el producto de PCR del fragmento aguas abajo a modo de control, 796 pb. En la sexta calle los fragmentos del  
30 plásmido digerido con *HindIII* y *EcoRI*, 5000 y 1596 pb. En la séptima calle el vector PBJ113

digerido con *HindIII* y *EcoRI* a modo de control, 5000 pb. A la derecha los tamaños aproximados de los fragmentos.

**Figura 4.** Comprobación de la electroforesis en gel de agarosa de los intermediarios candidato. En la primera calle el marcador de peso molecular, los tamaños de los 5 fragmentos vienen expresados en pb a la izquierda. En las calles marcada del 1 al 8 los diferentes candidatos. Todos ellos dan dos fragmentos principalmente de 2115 y 1596 pb (derecha). Mientras que el control de la cepa silvestre DK1622 (WT) solamente da un fragmento de 2115 pb ya que no posee incorporado el plásmido.

**Figura 5.** Comprobación de la electroforesis en gel de agarosa de mutantes candidatos. En 10 la primera calle tenemos el marcador de peso molecular, los tamaños de los fragmentos vienen expresados en pb a la izquierda (izquierda). En las calles marcada del 1 al 10 los diferentes candidatos. Las cepas silvestres dan un fragmento de 2115 pb, mientras que las cepas mutantes, 8 y 10, dan fragmentos de 1596 pb. En la muestra 7 se obtuvo mezcla de silvestre y mutante. A la derecha los tamaños aproximados de los fragmentos.

15 **Figura 6:** Producción de mixoquelinas del mutante  $\Delta furA$  respecto a la cepa silvestre de *M. xanthus* DK1622 (WT) en presencia (+Fe) y ausencia (-Fe) de hierro. La intensidad del color azul indica los niveles de expresión de uno de los genes responsables de la biosíntesis de las mixoquelinas.

**Figura 7:** Ensayo de producción de mixoquelinas en medio CAS-Blue de la cepa silvestre 20 (WT) y del mutante ( $\Delta furA$ ). El color naranja alrededor de las bacterias se debe a la producción de mixoquelinas.

**Figura 8:** Cantidad de mixoquelinas producidas, medida mediante densidad óptica a 450 nm por número de bacterias, tanto en la cepa silvestre (WT) como en el mutante ( $\Delta furA$ ).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 25 **Construcción del mutante**

El mutante  $\Delta furA$  de la invención se generó mediante la delección del gen *furA* en la cepa silvestre de *M. xanthus* DK1622, por electroporación de un plásmido con la región aguas arriba y abajo del gen. Posteriormente, mediante una doble recombinación homóloga entre dichos fragmentos y el genoma, se generó un mutante con delección en el gen *furA*. A 30 continuación, se describe el proceso detalladamente:

En primer lugar, se diseñaron 4 oligonucleótidos (**Tabla 1**) que anillaran en la región aguas arriba y aguas abajo del gen, conservando el codón de inicio y el de terminación.

Para posteriormente unir estos fragmentos entre sí e introducirlos en el vector pBJ113 (7) se le adicionó una secuencia de diana de restricción a dichos oligonucleótidos (secuencia 5 subrayada en los 4 oligonucleótidos de la **Tabla 1**).

**Tabla 1.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la construcción del plásmido.

SEQ ID NO	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Utilización
3	MXAN3702BamHI	GGT <u>GGATCC</u> CATGCCTCGGGCGCACTTGG	Amplificación de la región aguas arriba de <i>furA</i>
4	MXAN3702HindIII	CGA <u>AAGCTT</u> CCTTGACGGTGGCCTCCAGG	
5	MXAN3702BamHI	TCG <u>GGATCC</u> TGATCTCCATGTCCC GCGTG	Amplificación de la región aguas abajo de <i>furA</i>
6	MXAN3702EcoRI	CGC <u>GAATTC</u> ATCCTTGCGCAGTGCGGCAA	

Ambas regiones se amplificaron mediante PCR utilizando el termociclador *MJ Mini Personal Thermal Cycle* de *BioRad*. Para realizar este proceso se emplearon 10-200 ng de ADN molde de la cepa DK1622 de *M. xanthus*, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (100 µM), 0,5 µl de Polimerasa *PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase* (5 unidades/µl), 4 µl de Mezcla de dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*) (10 mM), 25 µl de Tampón *GC PrimeSTAR* (2X), 5 µl de Dimetilsulfóxido y H<sub>2</sub>O *MilliQ* hasta completar 50 µl de volumen final.

Una vez realizada la mezcla, se sometió a 30 ciclos de amplificación en las siguientes 15 condiciones (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Condiciones de la PCR para la amplificación de los fragmentos empleados en la construcción del plásmido.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
DESNATURALIZACIÓN	98	10

<i>AMPLIFICACIÓN (X30)</i>		
• <i>Desnaturalización</i>	98	0,5
• <i>Hibridación</i>	54-64*	0,5
• <i>Elongación</i>	72	1/Kb
<i>ELONGACIÓN</i>	72	12

\*La temperatura de hibridación estaba condicionada en cada caso por la secuencia (cantidad de adeninas, timinas, citosinas y guaninas) de los oligonucleótidos. Para determinar la temperatura se empleó la siguiente fórmula:

$$5 \quad [2x(A+T)+4x(C+G)]-4$$

Por lo que se utilizó 64°C para el fragmento de aguas arriba y 60°C para el fragmento de aguas abajo.

Una vez obtenidos los dos fragmentos de ADN amplificados, se procedió a su purificación con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Para ello, se mezcló el ADN con 10 500 µl de tampón de unión, para que, posteriormente, el ADN se una a la columna de afinidad del tubo de centrifuga de filtrado. Se sometió a centrifugación a 15.000 rpm durante 1 minuto para dejar unido solamente el ADN. Después, se realizaron dos lavados, uno con 500 µl y otro con 200 µl de tampón de lavado del kit. Finalmente, se adicionaron 60 µl de tampón de elución para separar el ADN de la columna y así recuperarlo.

15 A continuación, se digirieron los productos de ambas PCRs con las enzimas de restricción correspondientes, *HindIII* y *BamHI* el fragmento de aguas arriba y *BamHI* y *EcoRI* el fragmento de aguas abajo. También, se digirió el vector PBJ113 con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, que es el vector plasmídico donde se insertarán dichos fragmentos más adelante. Para realizar esta serie de digestiones se mezclaron por 5 µg de ADN, 10 µl de Tampón 20 *FastDigest* (10X) de Thermo scientific, 3 µl de Enzima de restricción *FastDigest* de Thermo scientific y H<sub>2</sub>O *MilliQ* hasta completar 100 µl de volumen final.

La mezcla se dejó incubando durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, se volvieron a purificar, tanto los fragmentos digeridos como el vector PBJ113, con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Posteriormente, se comprobaron mediante electroforesis 25 con tampón TAE en un gel de agarosa al 0,7% de *Pronadisa*. A continuación, se reveló incubándolo con una solución que contenía *GelRed* de *Biotium*.

En la **Figura 1**, podemos ver el tamaño de dichas muestras.

Después, se realizó la ligación entre el vector y los dos fragmentos con la enzima *T4-DNA ligase*. Para ello, se utilizaron 20 ng de vector y 40 ng de cada inserto. Se realizó la mezcla junto con 2 µl de tampón de ligación 10X y se completó con H<sub>2</sub>O *MilliQ* hasta un volumen final de 19 µl. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos y posteriormente en hielo 10 minutos. Finalmente, se añadió 1 µl de ligasa a la mezcla y se dejó toda la noche incubando a 16°C para la correcta ligación del ADN.

Al día siguiente, se introdujo la mezcla de ligación en la cepa TOP10 de *Escherichia coli* mediante choque térmico.

10 Para ello, se utilizaron 30 µl de células competentes de la cepa TOP10, junto con 10 ng de mezcla de ligación a transformar en un tubo de vidrio estéril y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después, la mezcla se sometió a un choque térmico que consistió en pasarla rápidamente a un baño a 42°C durante 2 minutos. Seguidamente, se añadió a la mezcla 0,4 ml de medio líquido LB y se incubó a 200 rpm durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se sembró  
15 100 µl del cultivo en una placa de medio LB con kanamicina 25 µg/ml, para que solamente crezcan las bacterias que hayan incorporado el plásmido ya que el vector posee el gen de resistencia a kanamicina, y X-gal 40 µg/ml para la selección blanco-azul de las colonias. Las placas se dejaron incubando a 37°C hasta el día siguiente.

Si picaron 16 colonias y se extrajeron los plásmidos mediante el kit *High Pure Plasmid Isolation Kit*. Para ello, las células de *E. coli* portadoras del plásmido se recogieron con asa de siembra y se transfirieron a un tubo eppendorf. Luego, se resuspendieron en 250 µl del tampón de resuspensión con ARNasa para eliminar el ARN y, a continuación, con 250 µl de tampón de lisis, que utiliza NaOH y SDS para lisar las células, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 350 µl de tampón de unión, el cual permite al  
25 ADN unirse a la columna de afinidad que poseen los tubos de centrifuga de filtrado y, además, permite que en frío las proteínas y restos celulares formen un precipitado floculante. Por esto, se incubaron 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El ADN plasmídico presente en el sobrenadante se transfirió a los tubos de centrifuga de filtrado, donde se realizaron dos lavados con 500 µl de cada una de  
30 las dos soluciones de lavado que proporciona el kit. Finalmente, se añadieron 60 µl de tampón de elución para que el ADN se separara de la columna de afinidad y así se recuperara en este tampón.

Los plásmidos extraídos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (en las mismas condiciones descritas anteriormente). En la **Figura 2**, se observa la correcta obtención del plásmido ya que este posee un mayor tamaño que el vector sin los dos insertos.

5 Además, se realizó una segunda comprobación del plásmido, en la que se utilizaron las mismas enzimas de digestión que fueron empleadas para la ligación, de tal forma que los fragmentos liberados correspondan con los insertos. En la **Figura 3**, se muestra dicha liberación de cada fragmento de forma individual y conjunta.

Una vez obtenido y verificado el plásmido, se introdujo en la cepa silvestre DK1622 de *M.*  
10 *xanthus* mediante electroporación.

Previamente se dializó 1 µg del plásmido con agua destilada mediante una membrana de diálisis (0,025 µm de tamaño de poro de *Merck*) durante 30 minutos. Por otro lado, se prepararon células electrocompetentes de la mixobacteria. Para ello, se partió de un cultivo en CTT líquido de *M. xanthus* DK1622 en fase exponencial. El medio CTT tenía los  
15 siguientes componentes y concentraciones: Bacto-casitona (10 g/l), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2 g/l), tampón Tris-HCl 1 M pH 7,6 (10 ml/l) y Tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,6 (10 ml/l).

Se centrifugó 1,5 ml de dicho cultivo a 10.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspendió en 1 ml agua *HPLC* estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Tras dos ciclos más de lavado y centrifugado, las  
20 células precipitadas se resuspendieron en un volumen de 40 µl de agua *HPLC* y ya estuvieron listas para llevar a cabo la electroporación.

Para la electroporación, en primer lugar, se mezcló el plásmido dializado y las células electrocompetentes. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (*Gene Pulser Cuvette* 0,1 cm de *BioRad*) con dos láminas metálicas de 1 mm de separación, donde se  
25 sometió a un choque eléctrico bajo las siguientes condiciones: Voltaje: 650 V; Capacitancia: 25 µF; Resistencia: 200 Ω.

Tras la electroporación, rápidamente se recuperaron las células electroporadas resuspendiéndolas en 1 ml de medio CTT y se transfirió a un matraz con 1,5 ml de medio CTT. Este matraz se incubó a 30°C a 300 rpm de agitación durante 6 horas para permitir la  
30 integración del plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga y permitir a las células la expresión de los genes de resistencia a antibióticos presentes en él. Por último, el cultivo se sembró mediante sobrecapa de 5 ml de CTT semisólido (0,8% de agar) en dos

placas de CTT sólido con kanamicina a 80 µg/ml, una con 250 µl de cultivo y la otra con los restantes 2,25 ml. Dichas placas se mantuvieron a 30°C durante una semana, cuando aparecieron las colonias.

Estas colonias se picaron y sembraron en placas de CTT sólido con kanamicina a 80 µg/ml para asegurar que solo crecen las células que hayan incorporado el plásmido en el genoma mediante recombinación homóloga por alguno de los dos insertos del plásmido, puesto que *M. xanthus* no puede albergar plásmidos ya que no tiene la maquinaria proteica necesaria para su replicación. A estas cepas que con el plásmido insertado se les denomina intermediarios.

10 Estos intermediarios se comprobaron mediante PCR. Primero, se extrajo el ADN genómico mediante el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Para ello, se partió de 1 ml de cultivo de aproximadamente 1 de densidad óptica a 600 nm y se centrifugó durante 3 minutos a 15.000 rpm. Las células se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis y se dejaron incubando 5 minutos a 80°C para lisar las células. A continuación, se adicionaron 3 µl de la  
15 solución de ARNasa y se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C para degradar el ARN. Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteínas y las muestras se incubaron 5 minutos en hielo. Se centrifugaron las muestras 3 minutos a 15.000 rpm y el sobrenadante, que contiene el ADN, se precipitó con 2-propanol y se sometió a un lavado con etanol al 70%. Finalmente, se rehidrató el ADN con 50 µl de la solución de  
20 rehidratación de ADN y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se resuspendió en la propia solución y se conservó a -20°C hasta su uso.

Una vez extraído el ADN cromosómico de los candidatos intermediarios, se les realizó una PCR de comprobación (en las mismas condiciones anteriores) utilizando los oligonucleótidos de los extremos de los fragmentos, MXAN3702HindIII y MXAN3702EcoRI (**Tabla 1**). De tal  
25 forma que se amplificaron principalmente 2 fragmentos, ambos insertos del plásmido, 1596 pb, y el fragmento que alberga la región aguas arriba, el gen *furA* y la región aguas abajo, 2115 pb. A diferencia de la amplificación en la cepa silvestre DK1622, que solamente dará el fragmento correspondiente a 2115 pb ya que no posee el plásmido insertado en el cromosoma. En la **Figura 4**, se observan 8 candidatos analizados mediante electroforesis  
30 en gel de agarosa 0,7%, todos ellos correctos.

Posteriormente, para que tenga lugar una segunda recombinación homóloga y así se elimine el plásmido y el gen de interés, estos intermediarios se cultivaron en medio líquido sin kanamicina durante 24 horas para evitar la presión selectiva y que las cepas que sufran

una segunda recombinación homóloga puedan sobrevivir. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron mediante sobrecapa semisólida en placas de CTT con galactosa 1%, para así dificultar el crecimiento de las células que posean el plásmido, puesto que conservan el gen de la galactoquinasa presente en el vector PBJ113. La  
5 recombinación homóloga puede tener lugar en cualquiera de los dos fragmentos. Por lo tanto, si la recombinación se da en el mismo lugar en el que se insertó al cromosoma, la cepa revertirá a silvestre. Pero, si esta tiene lugar en el sitio distintos al de la primera recombinación, se obtiene el mutante de delección en fase. Para distinguir qué cepas eran silvestres o cuáles mutantes, se comprobaron mediante PCR. Previamente, nos  
10 aseguramos de que las colonias candidatas solamente crecían en medio con galactosa y no en medio con kanamicina, para descartar así la posible contaminación con cepas intermediarias.

Se extrajo el ADN cromosómico, siguiendo el método mencionado anteriormente, y se realizó una PCR utilizando de nuevo los oligonucleótidos de los extremos de los fragmentos,  
15 MXAN3702HindIII y MXAN3702EcoRI (**Tabla 1**). De tal forma que las cepas que hayan revertido a silvestre darán un fragmento que albergue los dos insertos y el gen *furA*, 2115 pb, y las cepas mutantes solamente darán un fragmento correspondiente al tamaño de los dos insertos sin el gen, 1596 pb. El análisis de los candidatos se puede observar en la **Figura 5**.

## 20 **Análisis de la producción de mixoquelinas**

Se decidió continuar con el candidato 8 como mutante  $\Delta furA$  (**Figura 5**).

Para estudiar la producción de sideróforos de este mutante, se construyó una fusión entre el gen *mxgG* (relacionado con la biosíntesis de las mixoquelinas) y el gen reportero *lacZ* de *E. coli*, sobre el mutante  $\Delta furA$ . Así se pudo observar mediante ensayo en placa de CTT con X-  
25 gal y con/sin hierro adicionado, el color azul producido como consecuencia indirecta de la expresión del gen *mxgG*. En la **Figura 6**, se observa como la colonia de esta construcción  $\Delta furA$ - *mxgG**lacZ* produce descontroladamente un color azul independiente de la presencia de hierro, mientras que la fusión entre el gen *mxgG* y *lacZ* en la cepa silvestre DK1622 solamente se induce, a niveles mucho menores que el mutante, en medio sin hierro  
30 adicionado.

Por otra parte, también se estudió la producción de sideróforos del mutante  $\Delta furA$  mediante ensayo en medio CAS-Blue, el cual tiene una tonalidad azul y se torna a naranja en

presencia de sideróforos. En la **Figura 7**, podemos observar como el mutante *ΔfurA* produce un halo naranja de mayor tamaño, 16,74 mm, que la cepa silvestre DK1622, 9,26 mm.

Además, ha sido analizada la producción de mixoquelinas del silvestre DK1622 y del mutante *ΔfurA* mediante espectrofotometría. Para ello, se inocularon las cepas en matraces de 40 ml de CTT líquido ajustando los cultivos a 0.015 de densidad óptica a 600nm a tiempo 0 horas. Se dejaron incubando los matraces a 30°C en agitación de 300 rpm durante 24 horas. Después, se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm: 0,27 para la cepa silvestre DK1622 y 0,165 para el mutante *ΔfurA*. Se retiraron las células de los cultivos haciéndolos pasar estos por un filtro, dejando así solamente el sobrenadante que contiene las mixoquelinas. Los sobrenadantes de ambos cultivos se midieron a densidad óptica de 450 nm, dando como resultado 0,08 y 0,154 para la cepa DK1622 y *ΔfurA*, respectivamente. Se ajustó la densidad óptica de las mixoquelinas a 450 nm por 10<sup>10</sup> bacterias. Dando como resultado 9,18 para la cepa silvestre DK1622 y 36,41 para el mutante *ΔfurA* (**Figura 8**).

Por lo tanto, este mutante produce constantemente sideróforos en los sobrenadantes en los que crece, a niveles muy superiores con respecto a la cepa silvestre DK1622. Aun creciendo más lento que la bacteria silvestre, permite obtener grandes cantidades de mixoquelinas, del orden de 4 veces más que la bacteria silvestre (**Figura 8**).

#### Referencias

1. Jayasinghe, S., Siriwardhana, A., y Karunaratne, V. (2015). Natural iron sequestering agents: their roles in nature and therapeutic potential. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 8-12. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/6444>.
2. Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G., y Reichenbach, H. (1989) Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot (Tokyo)*. 42, 14-7. doi: 10.7164/antibiotics.42.14. PMID: 2493439.
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myxochelin-A#section=IUPAC-Name&fullscreen=true>
4. Altmeyer, M. (2011). Iron regulation in the Myxobacterium *Myxococcus xanthus* DK1622. Tesis doctoral de la Universidad de Saarlandes.

5. Korp, J., Winand, L., Sester, A., y Nett, M. (2018). Engineering pseudochelin production in *Myxococcus xanthus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84(22):e01789-18. doi: 10.1128/AEM.01789-18. PMID: 30217842; PMCID: PMC6210110.
6. Pérez, J., Contreras-Moreno, F. J., Muñoz-Dorado, J., y Moraleda-Muñoz, A. (2022).  
5 Development versus predation: Transcriptomic changes during the lifecycle of *Myxococcus xanthus*. *Frontiers in Microbiology* 13, DOI=10.3389/fmicb.2022.1004476.
7. Julien, B., Kaiser, A. D., y Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9098–9103.

## REIVINDICACIONES

1. Cepa mutante de *Myxococcus xanthus* obtenida mediante delección del gen *furA* de secuencia SEQ ID NO: 2.
2. La cepa según la reivindicación anterior caracterizada por que el mutante es  
5 obtenido a partir de la cepa silvestre *M. xanthus* DK1622.
3. Procedimiento de obtención de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1- 2 que comprende las siguientes etapas:
  - a) electroporar una cepa silvestre de *M. xanthus* con un plásmido que contiene la región aguas arriba y abajo del gen *furA*, y  
10
  - b) deleccionar el gen *furA* del genoma de *M. xanthus* mediante doble recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma de *M. xanthus*.
4. El procedimiento de obtención según la reivindicación anterior caracterizado por que el plásmido del paso a) se construye a partir del vector pBJ113 y los oligonucleótidos de  
15 secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 que anillan con la región aguas arriba del gen *furA* y los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que anillan con la región aguas abajo del gen *furA*, digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* y *BamHI* y *EcoRI* respectivamente.
5. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 3 – 4  
20 caracterizado por que el plásmido del paso a) es clonado en *Escherichia coli*.
6. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 3 – 5 caracterizado por que además comprende:
  - c) seleccionar la cepa mutante de *M. xanthus* que presenta delección del gen *furA*.
7. Uso de la cepa mutante de *M. xanthus* según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 2  
25 para la producción de mixoquelinas.
8. Procedimiento de obtención de mixoquelinas utilizando la cepa mutante de *M. xanthus* según cualquiera de las reivindicaciones 1- 2 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
  - a) crecer la cepa mutante de *M. xanthus* en medio líquido, y

b) extraer las mixoquelinas del sobrenadante.

9. Procedimiento de obtención de mixoquelinas según la reivindicación anterior caracterizado por que el crecimiento de la cepa mutante de *M. xanthus* se lleva a cabo a 5 temperatura de 30°C.

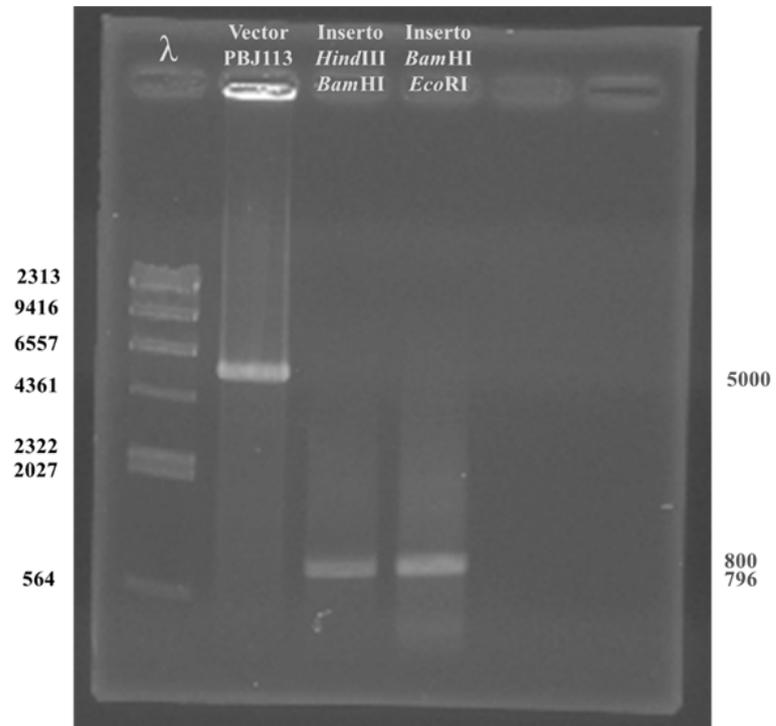


FIG. 1

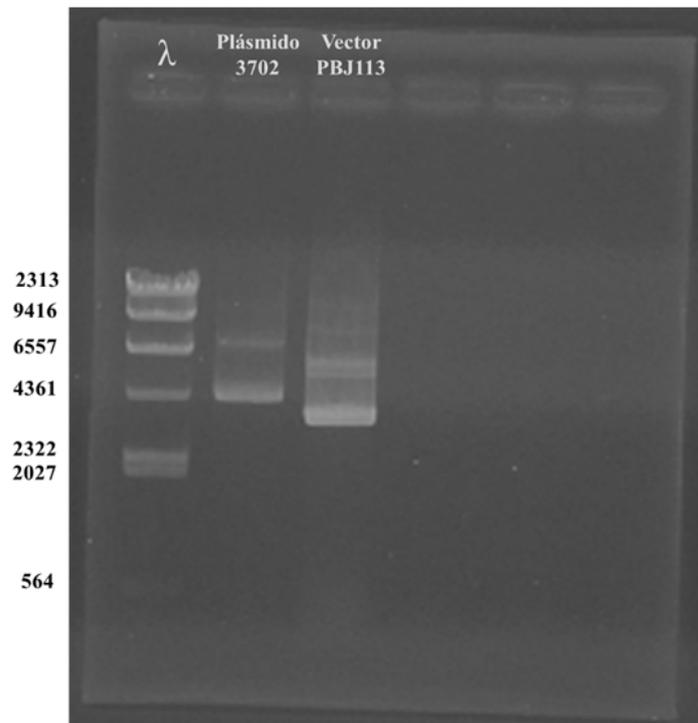


FIG. 2

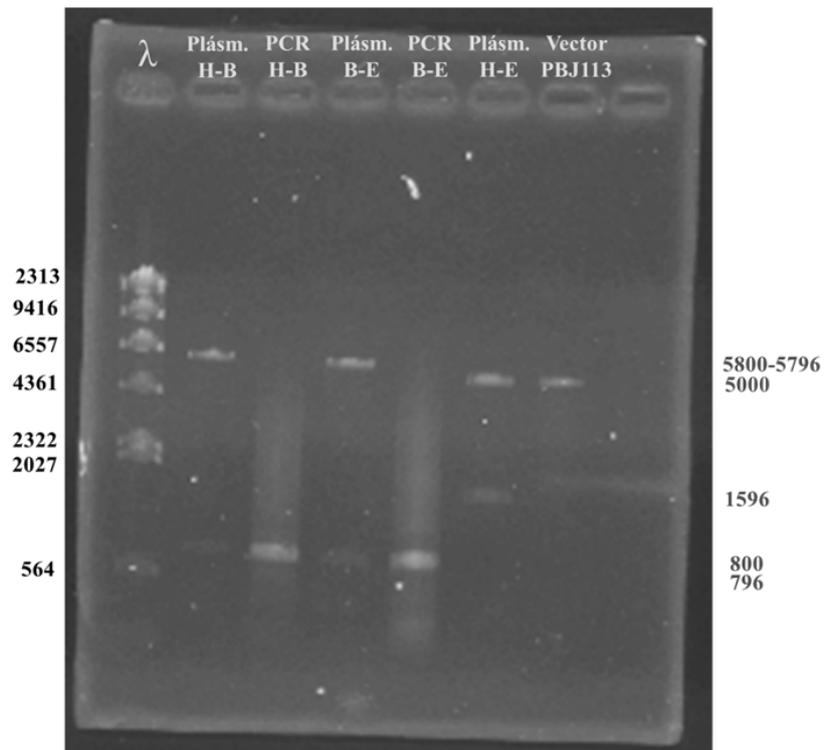


FIG. 3

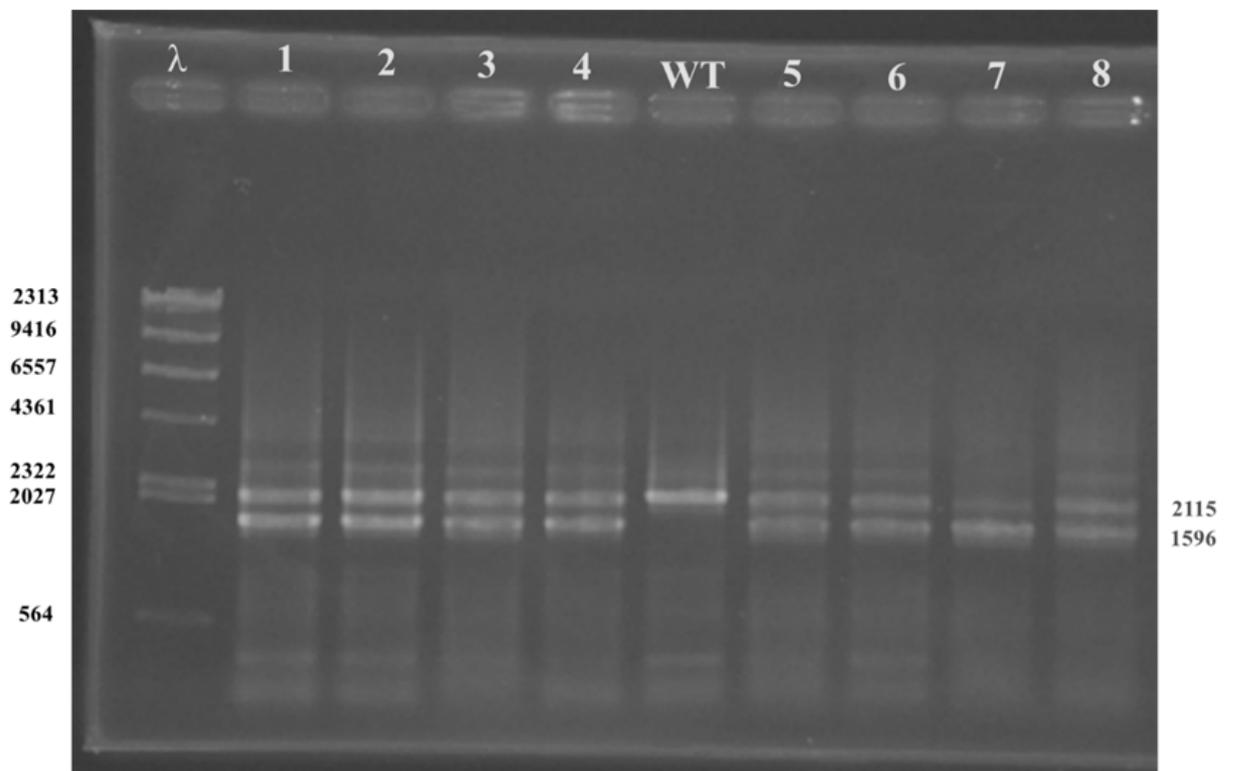


FIG. 4

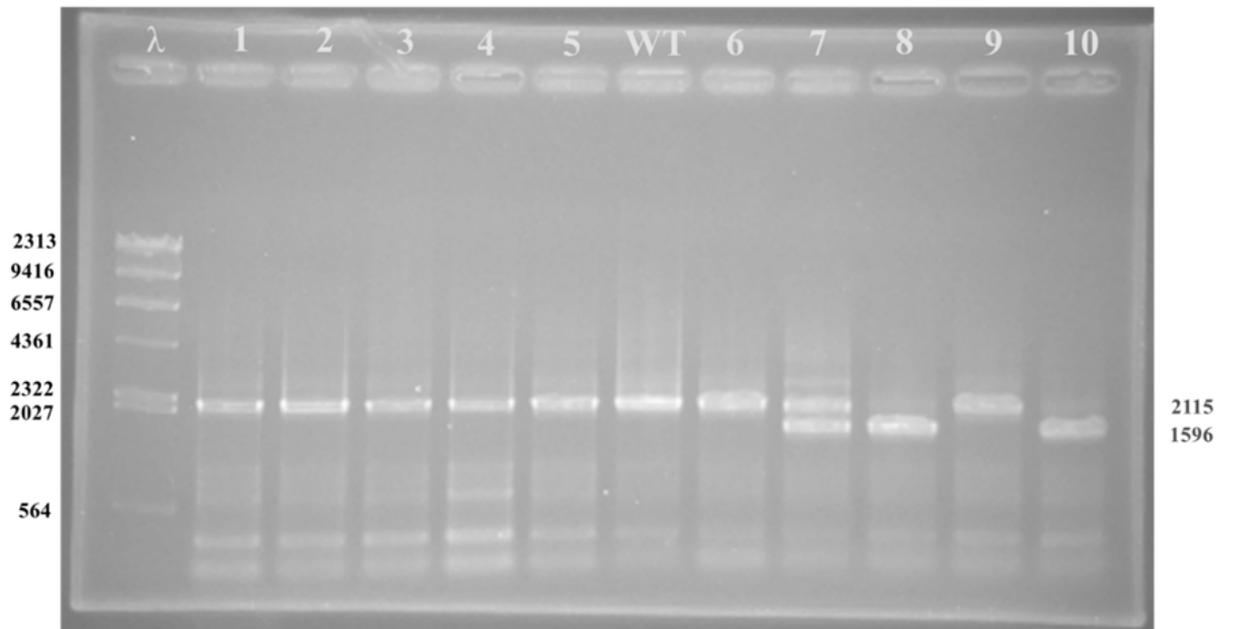


FIG. 5

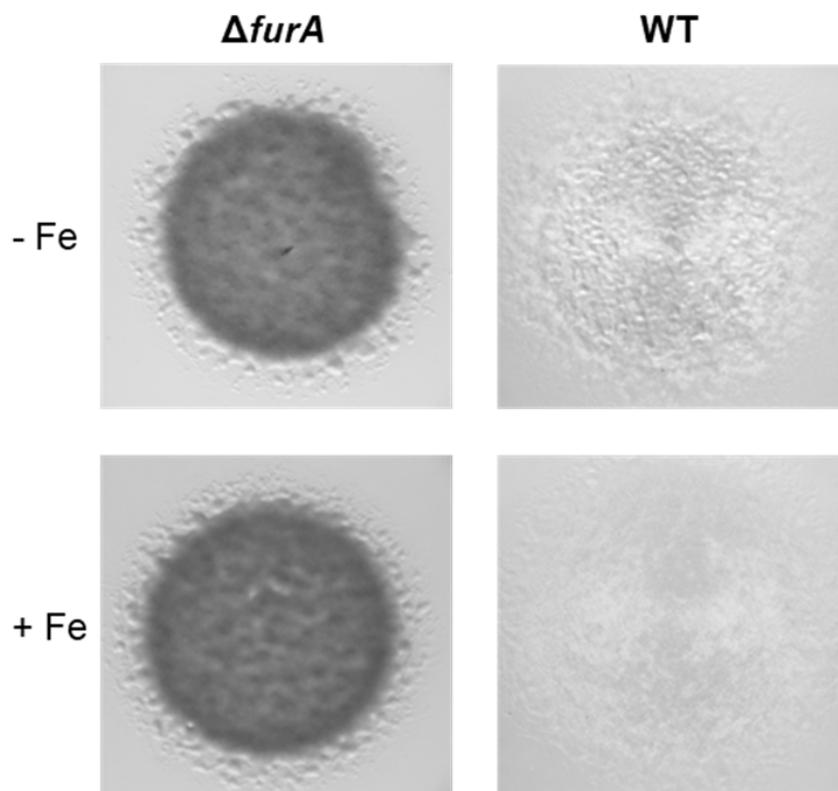


FIG. 6

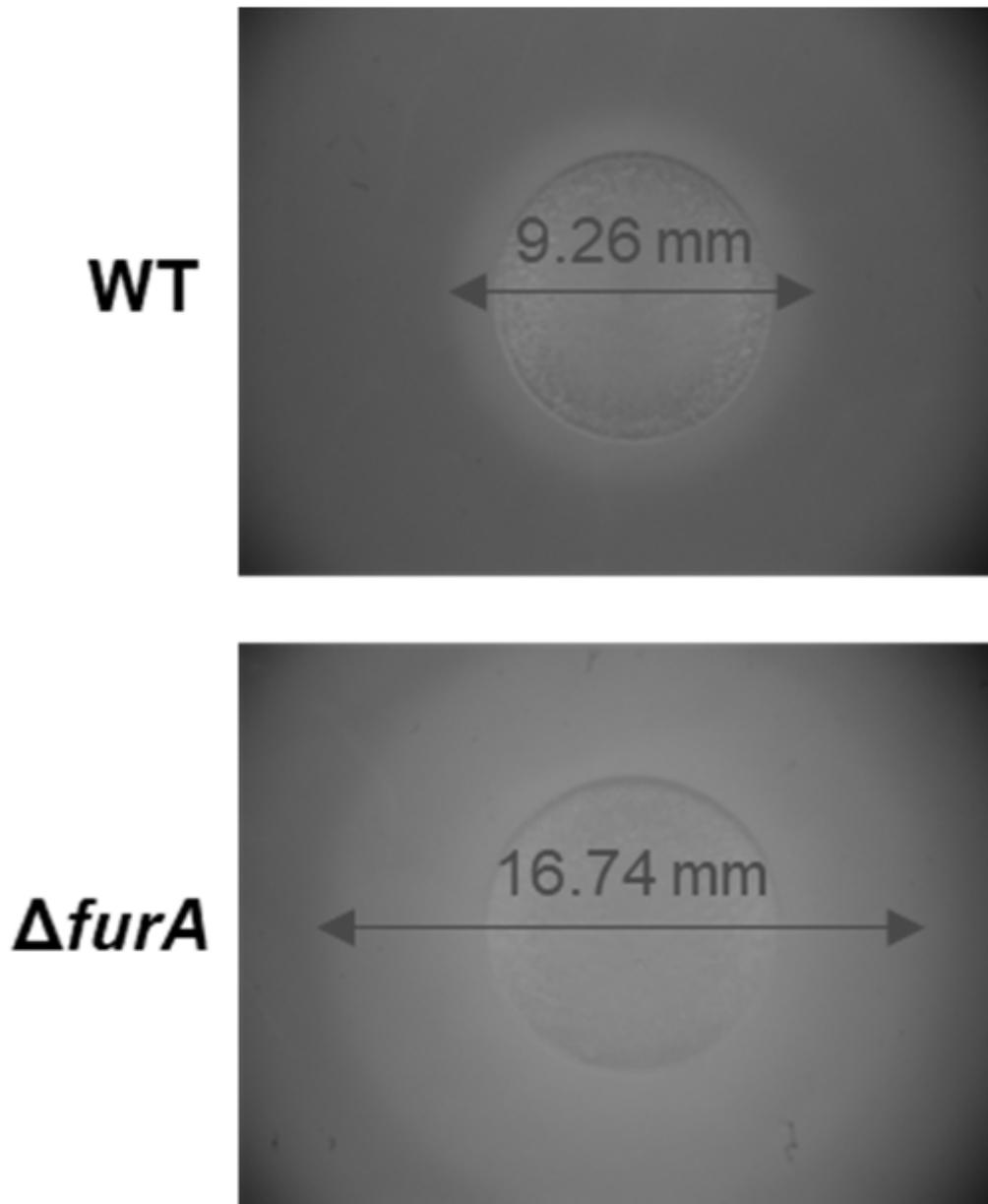


FIG. 7

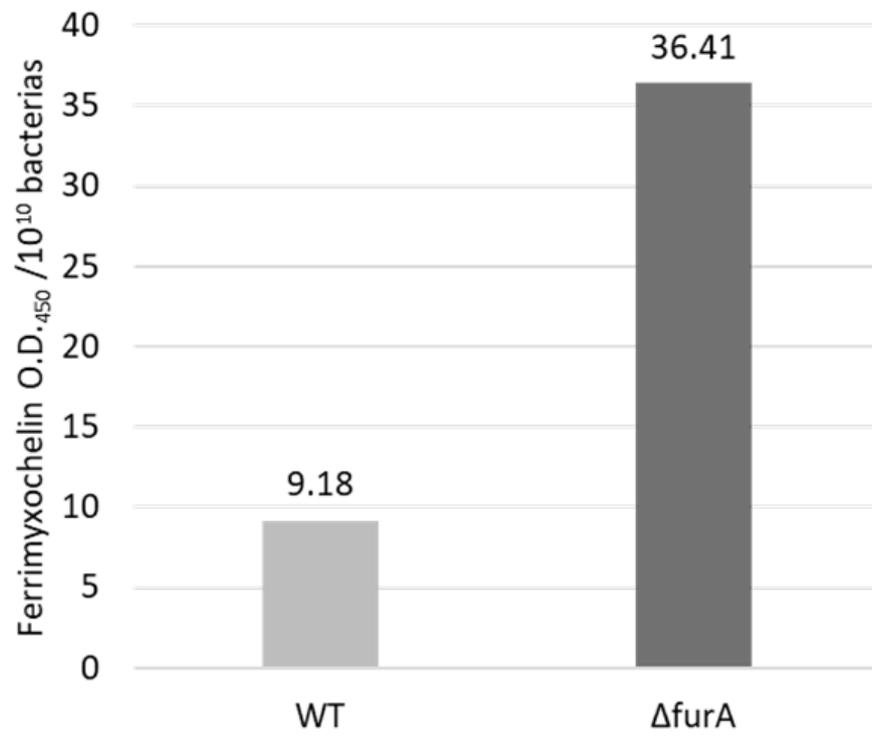


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202330352

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.05.2023

②③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **C07K14/195** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ALTMAYER, M. "Iron regulation in the Myxobacterium Myxococcus xanthus DK1622.". Tesis Doctoral. Universidad del Sarre [en línea] 2011, [recuperado el 26-02-2024], Recuperado de <a href="https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/22752">https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/22752</a> , <DOI:10.22028/D291-22696>, todo el documento.	1-9
A	WO 2010094587 A1 (HENKEL AG & CO KGAA <i>et al.</i> ) 26/08/2010, todo el documento.	1-9
A	GOLDMAN, B. S. <i>et al.</i> "Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2006), Vol. 103, Nº 41, páginas 15200 - 15205, ISSN 0027-8424 (Print), <DOI: pubmed:17015832>, todo el documento.	1-9
A	US 6833447 B1 (GOLDMAN BARRY, S. <i>et al.</i> ) 21/12/2004, todo el documento. En particular SEQ ID NO: 495	1-9
A	SESTER, A. <i>et al.</i> "Myxochelin- and pseudo-chelin-derived lipoxygenase inhibitors from a genetically engineered <i>Myxococcus xanthus</i> strain." Journal of Natural Products, (2019), Vol. 82, Nº 9, páginas 2544 - 2549, ISSN 1520-6025 (Electronic), <DOI: doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00403>, todo el documento.	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.03.2024

Examinador  
M. Hernandez Cuellar

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY, EMBL-EBI SEQUENCE DATABASES