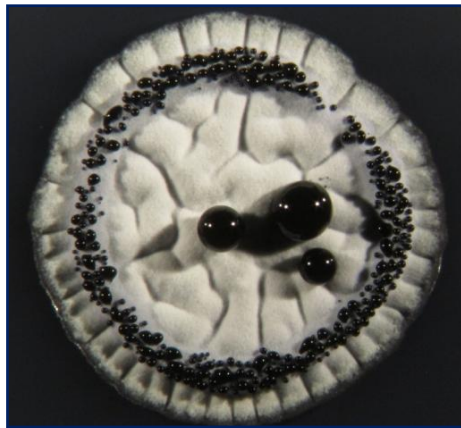




Importancia del sistema de dos
componentes *AbrA1/A2* de *Streptomyces
coelicolor* en la producción de antibióticos y
diferenciación mediante el estudio de los
mutantes carentes de sus genes



Sergio Antoraz Martín

Salamanca, 2013

Grado en Biología

Realizado en:

Instituto de Biología Funcional y Genómica

INTRODUCCIÓN 1

1. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES 1

1.1 Características generales 1

1.2 Mecanismo de acción de los sistemas de dos componentes 3

2. *Streptomyces*: LOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS 4

2.1 *S. coelicolor*: la especie más estudiada 5

2.2 Sistemas de dos componentes en *S. coelicolor* 6

3. ANTECEDENTES 7

OBJETIVOS 8

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: 9

1. COMPROBACIÓN DEL MUTANTE $\Delta abrA1$ DE *S. coelicolor*
MEDIANTE SOUTHERN BLOT 9

2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS MUTANTES 10

3. CUANTIFICACIÓN DE CDA 15

4. ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN 16

5. PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN MEDIO LÍQUIDO 17

CONCLUSIONES 20

MATERIALES Y MÉTODOS 21

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS 21

| | |
|--|-----------|
| 2. MEDIOS DE CULTIVO | 21 |
| 3. CONDICIONES DE CULTIVO | 22 |
| 4. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 22 |
| 4.1 Obtención de ADN genómico de <i>Streptomyces</i> | 22 |
| 4.2 Digestión del ADN | 22 |
| 4.3 Electroforesis en gel de agarosa | 23 |
| 4.4 Purificación de fragmentos de ADN | 23 |
| 4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 23 |
| 4.6 Hibridación de ácidos nucleicos: Southern blot | 23 |
| 5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS | 24 |
| 5.1 Bioensayo en medio sólido: producción de CDA | 24 |
| 5.2 Ensayo en medio líquido: cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina | 24 |
| 5.3 Curvas de crecimiento | 24 |
| <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 25 |

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

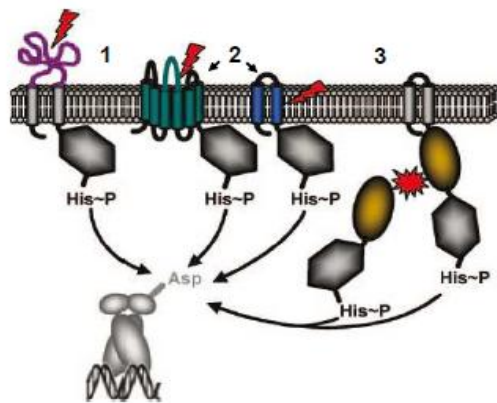
1.1. Características generales

Las células, tanto procariotas como eucariotas, han desarrollado distintos sistemas de señalización para reconocer, integrar y responder a las múltiples variaciones del ambiente. La principal vía de señalización en bacterias son los sistemas de dos componentes (TCSs, del inglés Two Components Systems), los cuales también se han identificado en archaeas y en eucariotas como levaduras, hongos, protozoos y plantas, aunque de forma menos abundante. Curiosamente no se han hallado en genomas animales ya secuenciados, por lo que se podría considerar que no están presentes en el reino animal.

Los sistemas de dos componentes están formados por una proteína sensora denominada histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) que efectúa la respuesta celular. Aunque normalmente cuando se habla de sistemas de dos componentes se hace referencia a HKs con su correspondiente pareja RR adyacente en el genoma, en algunos casos estos genes se encuentran sin pareja contigua en el genoma y se los denomina huérfanos.

Las HKs son por lo general proteínas de membrana homodiméricas. Cada monómero está formado por dos regiones diferenciadas: la región amino terminal, en la que se localiza el dominio sensor, y la región carboxilo terminal, que es donde reside la actividad quinasa de la proteína. La región amino terminal es variable, lo que indica la amplia diversidad de estímulos ambientales a los que pueden responder las distintas HKs. El dominio sensor localizado en esta región suele ser extracelular, y su función es el reconocimiento de la señal (Figura 1). La región carboxilo terminal consta a su vez de dos dominios: un dominio catalítico, responsable de la unión a ATP, y un dominio de dimerización y fosfotransferencia donde se localiza el residuo conservado de histidina necesario para su activación (Gao y Stock, 2009).

A



B

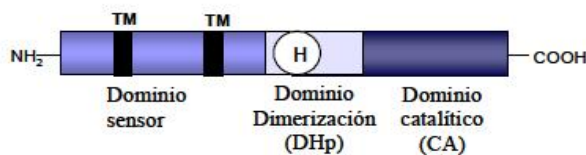


Figura 1: A: Representación de HKs: 1) sensoras de estímulos extracitoplasmáticos; 2) sensoras de estímulos ligados a la membrana; 3) sensoras citoplasmáticas. (Mascher, 2006). B: Esquema de un monómero de HK. TM: regiones transmembrana. H: Residuo conservado de histidina H.

Los RRs son proteínas con dos dominios, un dominio regulador en la región amino terminal y un dominio efector carboxilo terminal. El dominio regulador contiene una serie de aminoácidos conservados imprescindibles para la fosforilación del RR. La región más variable de la proteína es el dominio efector, que media la respuesta apropiada frente al estímulo específico de ese sistema (Figura 2). La mayoría de los dominios efectores tienen capacidad para unirse al DNA, actuando como reguladores transcripcionales; el resto tiene dominios efectores enzimáticos, de unión a RNA o de unión a proteínas (Galperin y Nikolskaya, 2007). También existen RRs que constan únicamente de un dominio regulador (Jenal y Galperin, 2009).

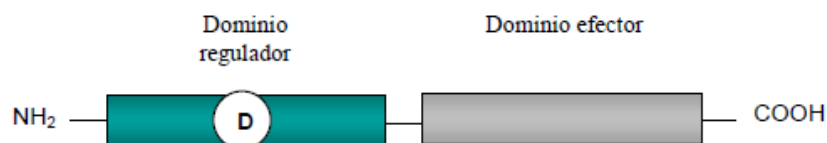


Figura 2: Representación esquemática de un RR. El residuo conservado de aspártico se representa con la letra D.

En general los RR pueden actuar como activadores o represores, o bien como ambos según la diana (Gao y Stock, 2009). La descripción estructural de los mismos no ayuda a definir qué genes son regulados por un determinado RR y puede tratarse desde un simple operón hasta cientos de genes.

1.2. Mecanismo de acción de los sistemas de dos componentes

El mecanismo de actuación de una ruta de señalización de dos componentes en general sería el siguiente: El dominio sensor de una HK detecta el estímulo, y como consecuencia de ese reconocimiento la HK se fosforila en un residuo conservado de His a partir de una molécula de ATP. Esta fosforilación por lo general se da en trans, es decir, un monómero de la HK fosforila al otro monómero y viceversa, pero también puede ocurrir en cis, cada monómero se autofosforila independientemente del otro (Casino *et al.*, 2009).

El grupo fosforil de la His fosforilada se transfiere al residuo Asp del dominio receptor del RR, catalizado por el propio RR. Esto provoca un cambio conformacional que hace que el dominio efector del RR sea activo, regulando por lo general la expresión génica (Figura 3 A). El tiempo de vida de los RR fosforilados varía de segundos a horas, estando relacionada esta variabilidad con el tipo de respuesta que producen.

Además de estas rutas de fosfotransferencia, que son las más abundantes en procariotas, existen otras más complejas en las que intervienen más proteínas y se dan múltiples pasos de fosfotransferencia ("Phosphorelay system") (Zhang y Shi, 2005). En estas rutas el grupo fosforil se transfiere a proteínas citoplasmáticas intermediarias denominadas histidina fosfotransferasas (HPt), que van a ser las encargadas de fosforilar el Asp del RR (Figura 3 B). Las HKs de estas rutas son quinasas híbridas, ya que poseen además del residuo de His, un residuo de Asp en la misma proteína. En este caso se transfiere el grupo fosforil desde el aspártico de la HK híbrida a la His fosforilable de la HPt, y estas proteínas finalmente van a fosforilar el Asp del RR, activándolo para que lleve a cabo su función (West y Stock, 2001).

La especificidad entre la HK y el RR de una determinada pareja es muy elevada. La especificidad HK-RR se debe a la secuencia primaria de ambas proteínas, debiéndose a unos pocos aminoácidos del dominio de fosforilación de la quinasa (Skerker *et al.*, 2008). No obstante se ha visto que, *in vivo*, puede darse una regulación cruzada entre dos sistemas muy similares cuando se eliminan las parejas correspondientes de una HK y un RR (Groban *et al.*, 2009).

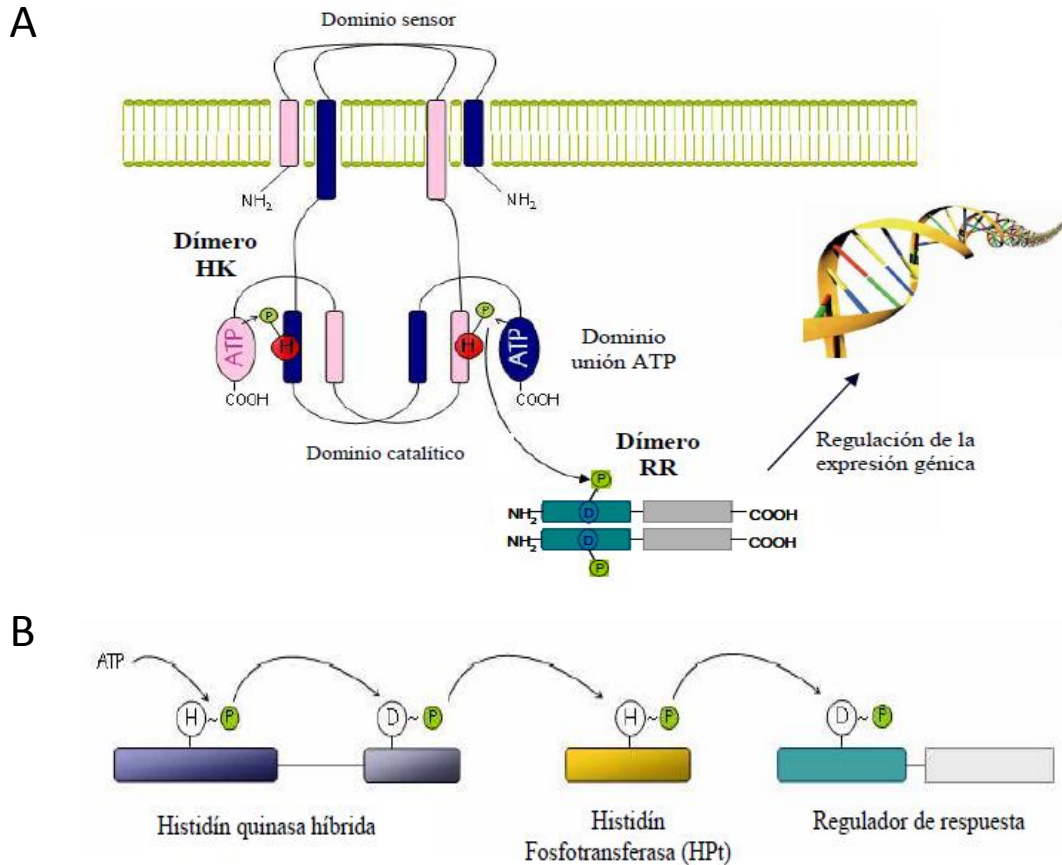


Figura 3: (A): Mecanismo de acción de un sistema de dos componentes típico. (B): Mecanismo de acción de una cascada de fosforilación de un sistema de múltiples componentes.

2. *Streptomyces*: LOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS

El género *Streptomyces* es uno de los grupos más numerosos y diversos de bacterias, con más de 500 especies descritas. Agrupa bacterias miceliares Gram positivas fundamentalmente aerobias con un complejo ciclo de vida que conlleva diferenciación morfológica. Su hábitat natural es el suelo, aunque en algunos casos también se han hallado en medios acuáticos (Moran *et al.*, 1995). Estos microorganismos tienen actividad saprofítica, por lo que juegan un importante papel en el medio ambiente como descomponedores de restos orgánicos principalmente vegetales (Hodgson, 2000; Chater *et al.*, 2010). Su capacidad descomponedora es posible gracias a la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares hidrolíticas (algunas de ellas con aplicaciones industriales).

El principal atractivo del género es su variada capacidad biosintética para sintetizar una gran colección de metabolitos secundarios con actividades biológicas de gran interés en medicina y

aplicaciones industriales tales como: antitumorales, antibióticas, inmunosupresoras, herbicidas e inhibidores enzimáticos (Thompson *et al.*, 2002; Challis y Hopwood, 2003). Otros de los productos del metabolismo secundario son, por ejemplo, sideróforos, pigmentos, y compuestos aromáticos (entre los que cabe destacar la geosmina, responsable del olor a tierra de *Streptomyces*) (Chater *et al.*, 2010).

Dentro de este grupo los que suscitan mayor interés en el campo de la medicina son los antibióticos. El género *Streptomyces* produce más del 50 % de los antibióticos naturales conocidos actualmente. Los genes que codifican la biosíntesis de los antibióticos se encuentran agrupados en “clusters” de unos 20-30 genes en los cuales también suelen incluirse genes implicados en resistencia, transporte y regulación (Bibb y Hesketh, 2009). La expresión de estos clusters suele estar sometida a una regulación compleja donde se distinguen niveles de regulación específica y niveles de regulación general en la que intervienen distintos tipos de reguladores entre los que los sistemas de dos componentes son los más importantes.

2.1. *S. coelicolor*: la especie más estudiada

S. coelicolor es la especie más representativa del género *Streptomyces*. Posee un cromosoma de 8,7 Mb en el que se han identificado 7.825 genes hipotéticos y un único origen de replicación (OriC) localizado en la región central (Bentley *et al.*, 2002). En él se han identificado al menos 23 clusters de genes relacionados con la biosíntesis de enzimas del metabolismo secundario. De ellos, únicamente se conocía la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina, y antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés: "Calcium dependent antibiotic") (Bentley *et al.*, 2002). Recientemente se ha descrito la producción de un compuesto con actividad antibiótica (abCPK) y de un pigmento amarillo (yCPK), ambos generados a partir de un cluster (*cpk*) de una poliquétido sintasa huérfana de tipo I (Gottelt *et al.*, 2010).

Estos antibióticos tienen distinta naturaleza química (Figura 4). La actinorrodina es un poliquétido aromático pigmentado que sirve como indicador de pH, siendo de color azul y soluble en agua en medio básico, y rojo e insoluble en medio ácido. La undecilprodigiosina es un pigmento rojo con estructura de tripirrol altamente hidrofóbica. El CDA es un lipopéptido cíclico.

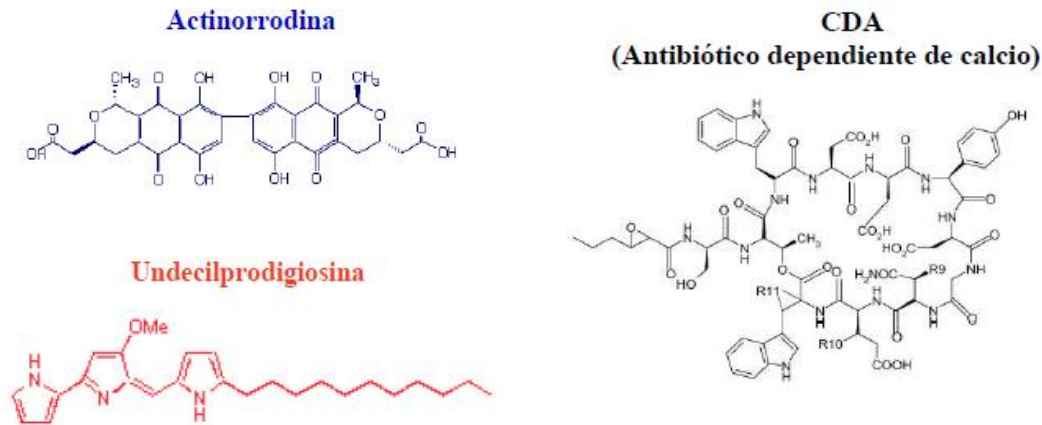


Figura 4: Estructura química de los antibióticos producidos por *S. coelicolor* A3 (2).

El papel principal de estos antibióticos es defender la colonia de competidores al tiempo que se desarrolla el micelio aéreo y se lisa el micelio de sustrato (Kieser *et al.*, 2000). Aunque su actividad biológica aún no es del todo conocida se sabe que todos son activos frente a bacterias Gram positivas.

Pese a su actividad antibacteriana estos antibióticos no tienen interés en clínica, sin embargo sí han resultado útiles en investigación por otras de sus características. La actinorrodina y la undecilprodigiosina gracias a su pigmentación confieren colores característicos a los cultivos de las cepas productoras. El CDA por su parte es activo frente a *Bacillus subtilis*, lo que permite detectarlo fácilmente mediante un bioensayo frente a dicho microorganismo. El hecho de que aporten una característica fenotípica fácilmente identificable ha sido de ayuda en estudios genéticos sobre la biosíntesis de antibióticos en distintas especies de *Streptomyces*.

2.2. Sistemas de dos componentes en *S. coelicolor*

En la secuencia genómica de *S. coelicolor* se han identificado 67 sistemas de dos componentes, 17 HKs y 13 RRs huérfanos (Hutchings *et al.*, 2004). Esto supone un 25 % más que en el resto de bacterias no patógenas de vida libre (Kim y Forst, 2001). La abundancia de TCS de *S. coelicolor* sugiere que es un microorganismo bien equipado para responder a múltiples condiciones ambientales a las que se enfrenta en su hábitat natural, el suelo.

Hasta la fecha se han estudiado experimentalmente varios de estos sistemas y se ha comprobado que la mayoría de ellos actúan directa o indirectamente sobre la producción de antibióticos (Tabla 1).

Tabla 1: Sistemas de dos componentes estudiados en *S. coelicolor*

| Sistema regulador | Proceso regulado (Directa o indirectamente) | Referencia |
|--------------------|---|--|
| AbsA1/A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Adamidis <i>et al.</i> , 1990) |
| AfsQ1/Q2 | Producción de antibióticos y diferenciación en <i>S. coelicolor</i> | (Ishizuka <i>et al.</i> , 1992) |
| CutRS | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Chang <i>et al.</i> , 1996) |
| CseB/CseC | Homeostasis de pared celular en <i>S. coelicolor</i> | (Paget <i>et al.</i> , 1999) |
| ChiS/ChiR | Producción de una quitinasa en <i>S. thermoviolaceus</i> y <i>S. coelicolor</i> | (Tsujiho <i>et al.</i> , 1999) |
| KdpDE | Presión osmótica en <i>E. coli</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | (Wood, 1999; Steyn <i>et al.</i> , 2003) |
| PhoP/R | Transporte de fosfato y producción de antibióticos en <i>S. lividans</i> y <i>S. coelicolor</i> | (Sola-Landa <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2007) |
| EcrA1/A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Li <i>et al.</i> , 2004) |
| OsaAB | Osmoadaptación y producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Bishop <i>et al.</i> , 2004) |
| VanR/VanS | Resistencia a vancomicina en <i>S. coelicolor</i> | (Hong <i>et al.</i> , 2004) |
| RagKR | Esporulación independiente de SapB en <i>S. coelicolor</i> | (San Paolo <i>et al.</i> , 2006) |
| RapA1/A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Lu y Shen, 2007) |
| OhkA | Metabolismo secundario y diferenciación morfológica en <i>S. coelicolor</i> . | (Lu <i>et al.</i> , 2011) |
| AbrC1/C2/C3 | Producción de antibióticos y diferenciación morfológica en <i>S. coelicolor</i> | (Yepes <i>et al.</i> , 2011) |
| AbrA1/A2 | Producción de antibióticos y diferenciación morfológica en <i>S. coelicolor</i> | (Yepes <i>et al.</i> , 2011) |
| SCO5784 | Metabolismo primario y secundario en <i>S. coelicolor</i> | (Rozas <i>et al.</i> , 2012) |
| DraR-K | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Yu <i>et al.</i> , 2012) |

3. ANTECEDENTES

Uno de los retos más interesantes en *Streptomyces* es llegar a conocer las rutas de señalización que producen la síntesis de antibióticos, con vistas a su explotación industrial. Sin embargo, la compleja regulación de las rutas biosintéticas, reflejo del amplio rango de estímulos a los que este grupo puede responder, supone un importante obstáculo.

En estudios previos realizados por el grupo en el que me he incorporado se investigó el papel de varios sistemas de dos componentes con un alto porcentaje de similitud con los genes del sistema AbsA1/AbsA2, regulador negativo de la síntesis de antibióticos (Yepes, 2006). Uno de

ellos, el sistema *AbrA1/A2* (*SCO1744/45*) es un regulador pleiotrópico negativo de la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA (Yepes *et al.*, 2011). Curiosamente, los genes *abrA1/A2* forman parte de un operón junto a otros dos genes que lo preceden y que codifican un sistema de transporte ABC (*SCO1742/43*), que muestra similitud de secuencia con transportadores involucrados en resistencia a antibióticos.

En estudios anteriores se estudiaron los fenotipos del mutante doble $\Delta 1744/45::accIV$ (también denominado $\Delta abrA1/A2$ ó $\Delta 11$), observándose una mayor producción de actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA y un desarrollo morfológico precoz con respecto al tipo silvestre. Para determinar la importancia de la HK y del RR en el sistema de dos componentes, se obtuvieron mutantes de delección simple de cada uno de los genes del sistema (Tesis Doctoral Sergio Rico en realización). Los mutantes nulos se consiguieron reemplazando cada gen (o la pareja de genes en el caso del mutante doble) por un "cassette" de resistencia a apramicina generado mediante PCR (técnica REDIRECT (Gust B, 2002)). Tanto el mutante doble como el mutante sencillo $\Delta 1745$ ($\Delta abrA2$) habían sido verificados mediante Southern Blot. Sin embargo, el mutante $\Delta 1744$ ($\Delta abrA1$, desprovisto de la HK) todavía no estaba comprobado y su estudio constituye una parte de este trabajo.

OBJETIVOS

Comprobar que el mutante del gen *SCO1744* (*abrA1*) es correcto y estudiar el efecto que las mutaciones en los genes *SCO1744* (*abrA1*) y *SCO1745* (*abrA2*) de *Streptomyces coelicolor* ejercen sobre la producción de antibióticos y la diferenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPROBACIÓN DEL MUTANTE $\Delta abrA1$ DE *S. coelicolor* MEDIANTE SOUTHERN BLOT

Para comprobar que el reemplazamiento del gen *abrA1* por el "cassette" de resistencia a apramicina se habían realizado correctamente se analizaron tres clones seleccionados de la mutación realizada con anterioridad en el laboratorio. Se obtuvo su ADN genómico y se digirió con las enzimas *Xho* I y *Hind* III conjuntamente, y también con la enzima *Pst* I. Además se realizó el mismo proceso con la cepa control *S. coelicolor* M145

A continuación se muestra un esquema del fragmento del genoma donde se localiza el gen *abrA1* en la cepa silvestre o en su lugar el "cassette" de resistencia a apramicina en el reemplazamiento realizado en el mutante $\Delta abrA1$. Aparecen marcados los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas, de manera que al hibridar con la sonda S (un fragmento del gen *abrA2* amplificado por PCR y marcado con digoxigenina) se puedan observar diferencias de tamaño entre los fragmentos de ADN de las cepas silvestre y mutante. A la derecha de este esquema se muestra una imagen con el tamaño estimado mediante digestiones "in silico" empleando el programa "Gene Construction Kit", y el resultado real del Southern (Figura 5).

Como se puede observar, en ambas digestiones el resultado del corte dió bandas de ADN del tamaño esperado, por lo que el mutante $\Delta abrA1$ se determinó correcto.

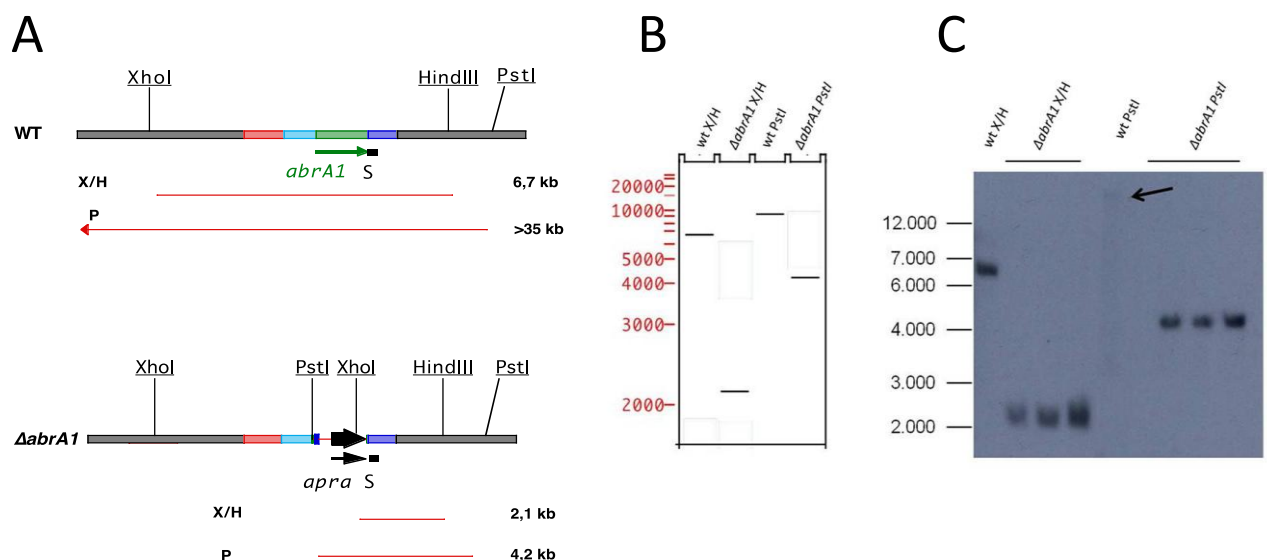


Figura 5: Análisis por Southern-blot del mutante $\Delta abrA1$. A: Esquema del entorno genómico del gen *abrA1*. Se muestran los puntos de corte de las enzimas usadas, el punto de hibridación de la sonda y la longitud estimada del fragmento. B: Patrón estimado mediante digestión "in silico". C: resultado del Southern

2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS MUTANTES

Como se explicó en la introducción, el sistema de dos componentes AbrA1/A2 ejerce una regulación global negativa que no sólo afecta a la producción de metabolitos secundarios, sino que también tiene control sobre el desarrollo morfológico.

Para comprobar el papel que juega cada uno de estos genes individualmente, el primer paso consistió en un análisis fenotípico en medio sólido centrado en observar posibles diferencias de los mutantes sencillos $\Delta abrA1$ ($\Delta 1744$) y $\Delta abrA2$ ($\Delta 1745$) con respecto a la cepa silvestre y al mutante doble $\Delta 111$ ($\Delta 1744/45$). El color de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina, unido a la diferencia de color y textura que adquieren las colonias de *S. coelicolor* al desarrollar el micelio aéreo (blanco y esponjoso) o esporular (grisáceo), permite apreciar en cultivos de superficie si dichos procesos están afectados. Los medios en los que se encontraron diferencias fueron NA, LB, NMMP, R2YE e YEPD. También se llevó a cabo el estudio en medio SFM, aunque no se hallaron diferencias entre las distintas cepas empleadas.

El análisis se llevó a cabo partiendo de una suspensión de esporas de cada cepa, a partir de las cuales se sembraron 10^5 esporas de cada una de las cepas en gotas de 5 μ L, obteniéndose parches de micelio con el mismo diámetro. El seguimiento de las colonias tuvo lugar cada 24 horas hasta que cesaron de producirse cambios en las colonias.

Con la finalidad de facilitar la lectura se nombraron las cepas según la siguiente nomenclatura: M145 (cepa silvestre), $\Delta 111$ (mutante doble), $\Delta abrA1$ (carente de gen que codifica la HK) y $\Delta abrA2$ (desprovisto del gen que codifica el RR).

El comportamiento de las distintas cepas no fue igual en todos los medios. En medio LB se observó que al quinto día de cultivo tanto el mutante $\Delta abrA1$ como el $\Delta abrA2$ presentaban un aumento en la producción de actinorrodina (mayor intensidad en el color azul) con respecto a la cepa silvestre. Este incremento en la síntesis era semejante al mostrado por el mutante doble (Figura 6). En este medio por lo tanto se requiere de ambos componentes, HK y RR, para que tenga lugar la regulación negativa característica del sistema. La eliminación de cualquiera de ellos produce una desregulación total de la síntesis de actinorrodina.

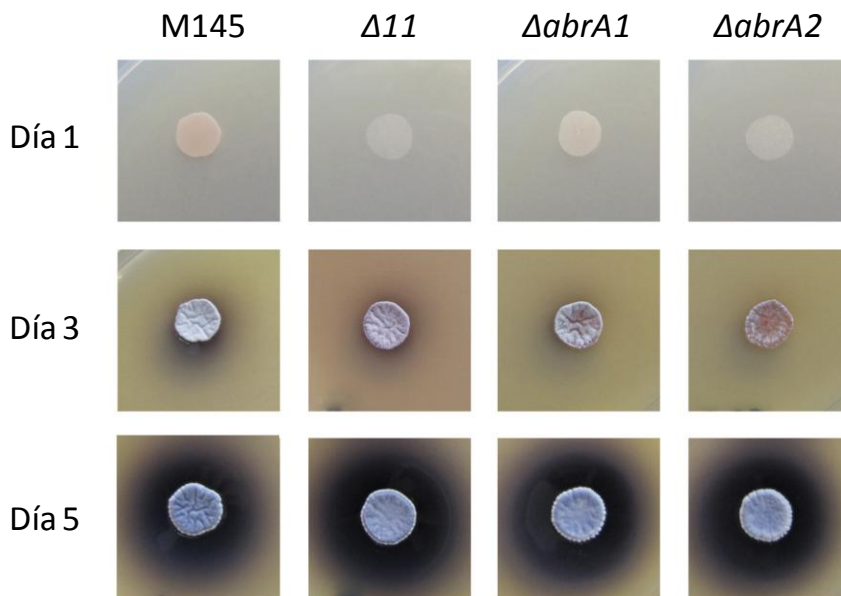


Figura 6: Progresión de crecimiento en gota (10^5 esporas) de las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en medio LB. Se muestran los tiempos más significativos.

En NA y R2YE la cepa mutante $\Delta abrA2$ presentaba una mayor producción de actinorrodina con respecto al $\Delta abrA1$. Comparando estos fenotipos con los mostrados por las cepas M145 y $\Delta 11$, podemos ver que la cantidad de actinorrodina producida por el mutante $\Delta abrA2$ es equiparable a la del mutante doble $\Delta 11$, mientras que la cepa $\Delta abrA1$ presentaba un fenotipo similar al silvestre (figuras 7A y 7B).

Los diferentes fenotipos presentados por los dos mutantes sencillos en estos dos medios (NA y R2YE) podrían deberse a la existencia de una regulación cruzada en la cual una HK ajena al sistema estudiado fosforile al RR codificado por el gen *abrA2* en ausencia de la HK *AbrA1*. Esto podría producir que el mutante $\Delta abrA1$ presentara un fenotipo similar al silvestre al tener una proteína *AbrA2* plenamente funcional. Por su parte, el mutante $\Delta abrA2$ que carece de RR no podría llevar a cabo la regulación negativa característica de este sistema, mostrando una producción de actinorrodina similar al mutante doble $\Delta 11$. Por lo tanto, la regulación de la producción en estos medios sería dependiente de la presencia o ausencia del RR *AbrA2* el cual podría responder tanto a la señalización de su propia HK o a otra ajena al sistema cuando fuera necesario. Se han descrito casos *in vivo* de regulación cruzada con sistemas similares cuando se elimina uno de los componentes de un sistema (Groban *et al.*, 2009).

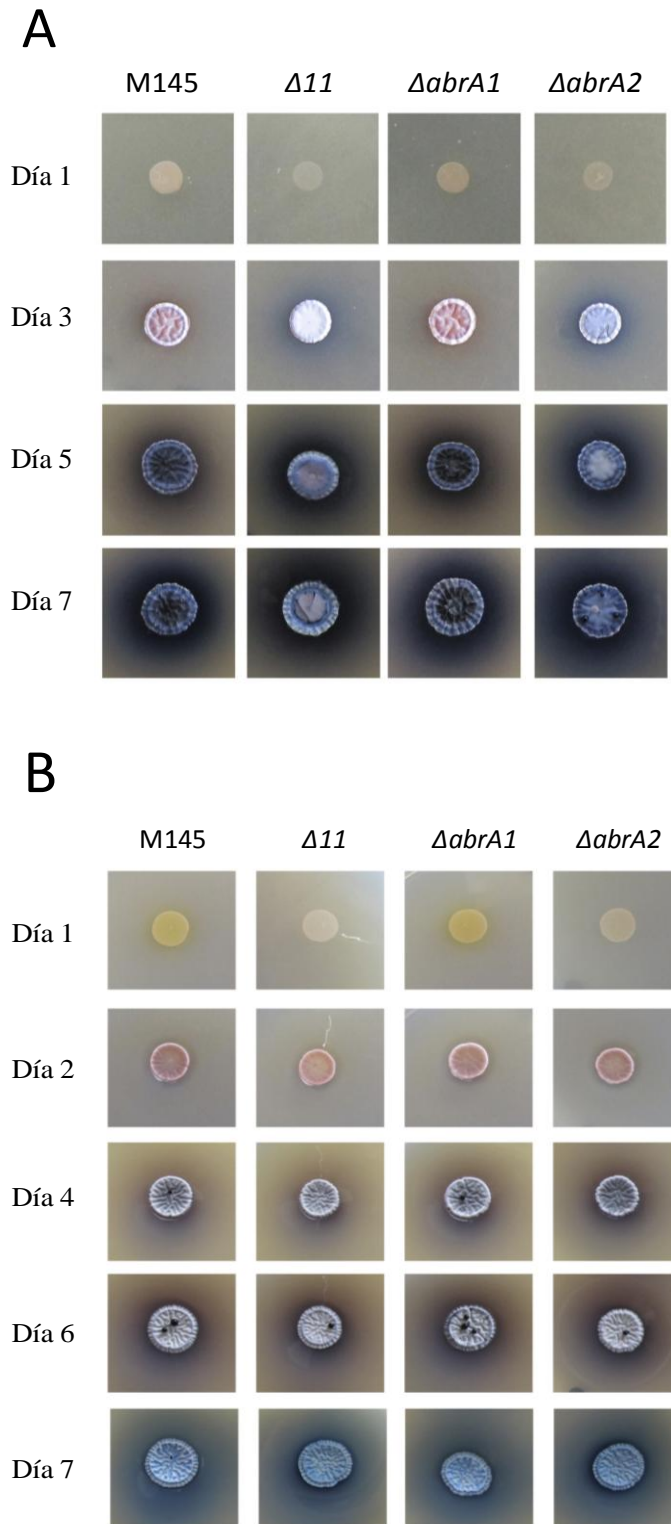


Figura 7: Progresión de crecimiento en gota (10^5 esporas) de las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en medios R2YE (A) y NA (B). El día 7 en medio NA se adicionó KOH 1M para resaltar el color de la actinorrodina. Se muestran los tiempos más significativos.

Otra característica que podemos observar en el medio NA es una pigmentación amarilla en las cepas wt y $\Delta abrA1$ al primer día de crecimiento (Figura 8). Este color amarillo podría deberse al pigmento yCPK, producido por el *cluster cpk*. Este *cluster* también es responsable de la biosíntesis de un antibiótico incoloro cuya actividad ha sido descrita recientemente, el abCPK (Gottelt *et al.*, 2010). El hecho de que estos compuestos sí se produzcan en las cepas M145 y $\Delta abrA1$ pero no en el $\Delta 111$ ni en el $\Delta abrA2$, indicaría que en medio NA este sistema actúa como regulador positivo de este *cluster*, al contrario de lo que ocurre para la actinorrodina donde regula negativamente.



Figura 8: Coloración de las cepas M145, $\Delta 111$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en medio AN tras un día de crecimiento.

En los medios YEPD y NMMP ambos mutantes, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$, presentaban una producción de actinorrodina semejante. La cantidad de antibiótico producida por los mutantes sencillos era superior a la cepa silvestre, pero menor que el mutante doble $\Delta 111$ (Figura 9 A y 9 B). Tanto en medio NMMP como en YEPD pudo apreciarse también una ligera aceleración en la diferenciación en las cepas $\Delta 111$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ con respecto al silvestre. Además en medio NMMP se puede observar una mayor rotura del medio por parte de todos los mutantes que no se da en la cepa M145. Una posible explicación es que el sistema $\Delta abrA1/A2$ en medio NMMP actúa también como un regulador negativo de la producción de agarasas, resultando la delección de uno o ambos genes del sistema en una mayor producción de esta enzima y una mayor rotura del medio.

Por lo tanto, el mutante $\Delta abrA1$ presenta un incremento en la producción de actinorrodina con respecto a la cepa silvestre en los medios YEPD y NMMP mientras que en NA y R2YE muestra una producción similar al silvestre. El incremento de producción de antibiótico en YEPD y NMMP es similar al del otro mutante sencillo, sin llegar en ambos casos a los niveles de los obtenidos con el $\Delta 111$. Esto indica de nuevo la posibilidad de regulación cruzada pero que en este caso sería menos eficiente. Por un lado, en el mutante $\Delta abrA1$ carente de la HK del sistema, el RR $\Delta abrA2$ estaría siendo regulado de forma parcial por otra HK, existiendo todavía algo de represión que origina un nivel medio de producción de actinorrodina. Y por otro lado, en el mutante $\Delta abrA2$ carente del RR del sistema, la HK $\Delta abrA1$ estaría reprimiendo también de forma parcial la

producción de actinorrodina a través probablemente de un RR ajeno al sistema en estudio. Solo se consigue una desrepresión total de la producción de actinorrodina cuando se eliminan los dos genes del sistema, mutante $\Delta 11$, y se evitan por tanto los eventos de regulación cruzada.

Estos resultados muestran que la producción de antibióticos en las distintas cepas claramente es dependiente de medio. Además la regulación de *Streptomyces* se presenta más compleja de lo que inicialmente se pensaba, como parece indicar el diferente comportamiento de las distintas cepas entre los distintos medios.

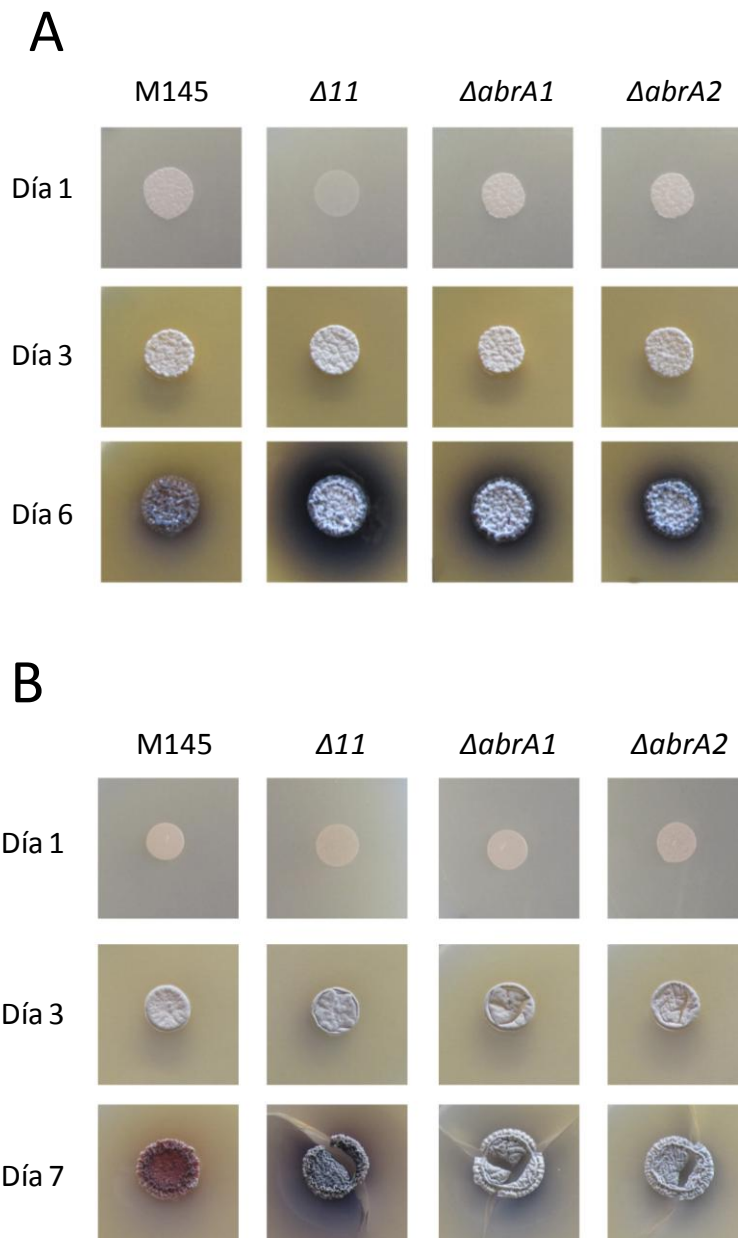


Figura 9: Progresión de crecimiento en gota (10^5 esporas) de las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en medios YEPD (A) y NMMP (B). Se muestran los tiempos más representativos.

Por otra parte, la producción de undecilprodigiosina se observó a tiempos más tempranos, como viene a ser habitual. En medio NA no parece haber diferencias observables entre las distintas cepas. Por su parte en medio R2YE las cepas M145 y $\Delta abrA1$ presentan una mayor producción que el mutante $\Delta abrA2$ y el mutante doble. Otro medio donde se encuentran diferencias es en NMMP dónde vemos en tiempos más largos que tanto los mutantes sencillos como el mutante doble parecen producir una cantidad menor de undecilprodigiosina.

3. CUANTIFICACIÓN DE CDA

Como se comentó en antecedentes, las diferencias en producción de antibióticos entre las cepas silvestre y $\Delta 11$ no se limitaban solo a actinorrodina, sino que también se habían detectado en la producción de CDA y undecilprodigiosina. Las diferencias de producción de CDA en todas las cepas se cuantificaron en un bioensayo midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*, indicativo de la cantidad de CDA producido. Los mutantes sencillos $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ mostraron un aumento significativo de la producción de CDA con respecto a la cepa silvestre (Figura 10). Este incremento en la producción es superior incluso al presentado por el mutante doble $\Delta 11$, lo que parece evidenciar de nuevo que al eliminar cualquiera de los componentes del sistemas se produce una compleja regulación cruzada con otros sistemas semejantes que influyen en la producción de antibióticos de diferentes maneras.

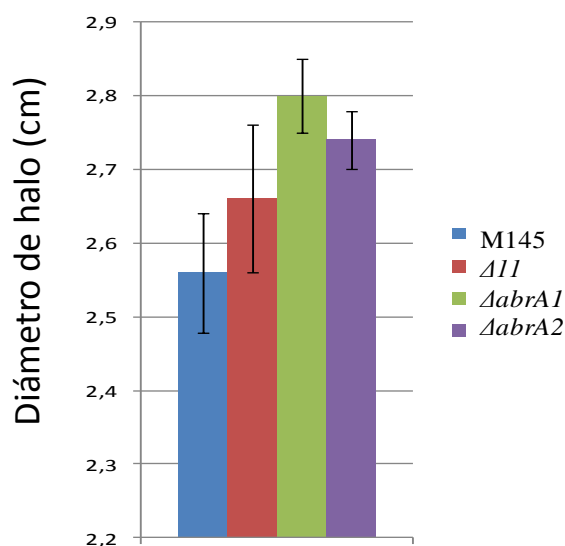


Figura 10: Cuantificación de la producción de CDA en las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en el bioensayo realizado con *B. subtilis* como microorganismo sensible.

4. ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN:

Otra característica fenotípica que encontramos en la mayoría de estos medios sólidos es un menor crecimiento del mutante $\Delta abrA2$ con respecto a la cepa silvestre durante el primer día de crecimiento. Esta diferencia de crecimiento, que no se veía en días sucesivos, era compartida por el mutante $\Delta 11$, observándose más claramente en medio R2YE (Figura 11 A). Para comprobar si estos mutantes sufrían algún tipo de retraso en la germinación, se hicieron cultivos sobre un cubre inclinado en medio R2YE y se analizaron mediante microscopía óptica. Los resultados obtenidos indican que en este medio, tanto el mutante $\Delta abrA2$ como el $\Delta 11$ comenzaban a germinar aproximadamente hora y media más tarde que el mutante $\Delta abrA1$ y la cepa M145 (Figura 11 B). Al cabo de un día las diferencias microscópicas eran inapreciables.

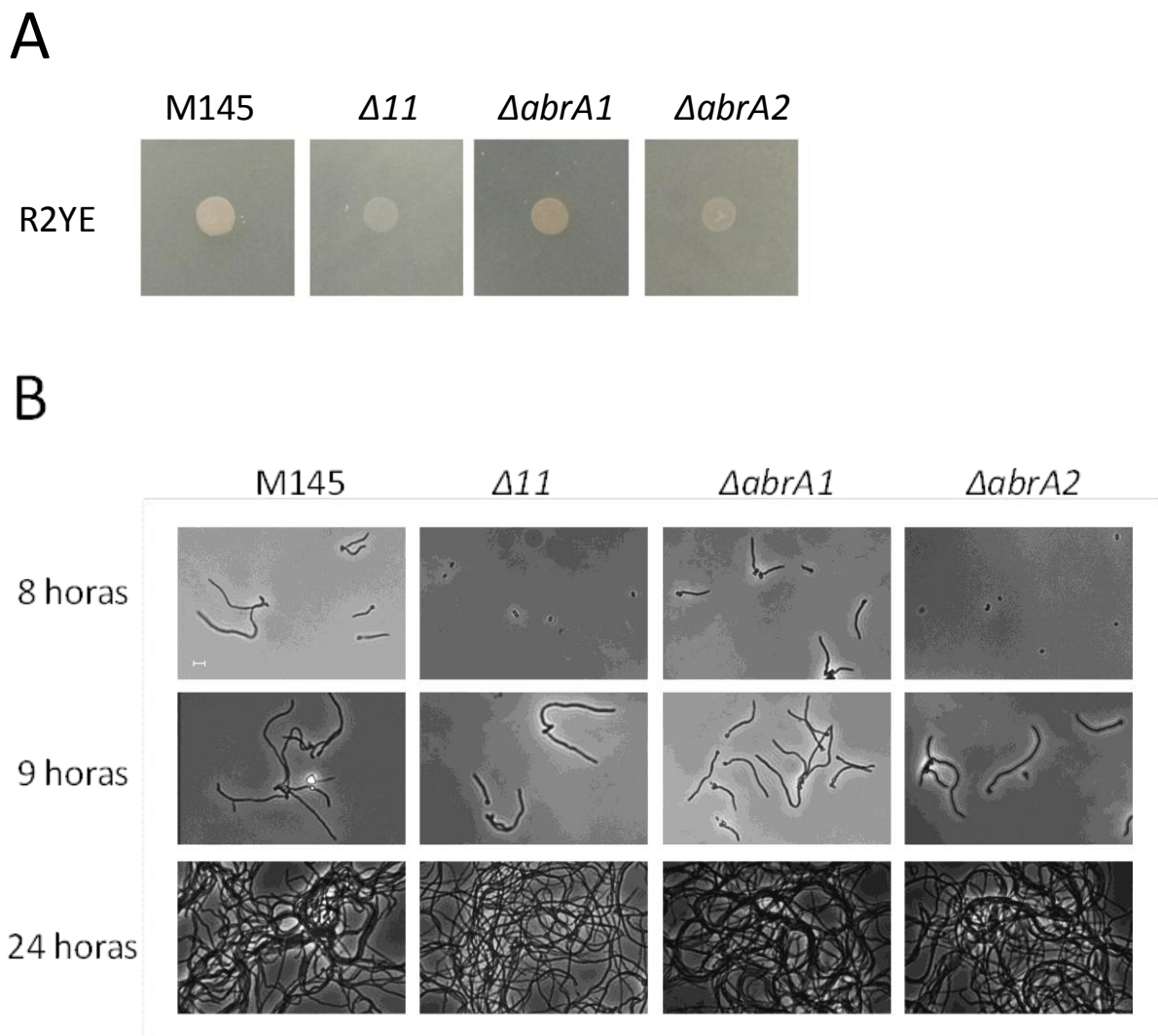


Figura 11: A: Siembra en gota (10^5 esporas) en R2YE tras un día de crecimiento. B: Análisis microscópico de las diferentes cepas en medio R2YE a las 8, 9 y 24 horas de crecimiento. La barra corresponde a $10\ \mu\text{m}$.

5. PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN MEDIO LÍQUIDO

Tras observar las diferencias de producción de forma cualitativa y evidenciarse diferencias en la producción de actinorrodina, se procedió a la cuantificación tanto de este antibiótico como de undecilprodigiosina en medio líquido siguiendo el protocolo de cuantificación descrito por Kieser (Kieser *et al.*, 2000) y detallado "Materiales y métodos". Los medios elegidos para llevar a cabo la cuantificación fueron NB y NMMP líquido, dos medios en los que previamente se habían detectado diferencias de producción entre el mutante doble $\Delta 11$ y la cepa silvestre (Yepes *et al.*, 2011).

Los datos obtenidos de la cuantificación de undecilprodigiosina en NMMP no resultaron estadísticamente relevantes, por lo que sólo se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación en medio NB. En la Figura 12 se muestra el gráfico resultante de la cuantificación a las 60 horas de crecimiento, tiempo en el que se vieron las mayores diferencias de producción. La producción de undecilprodigiosina normalmente tiene lugar en tiempos más cortos que la de actinorrodina. En él se puede observar como los mutantes $\Delta 11$ y el $\Delta abrA1$ aumentaban significativamente la producción con respecto al silvestre, situándose la producción del $\Delta abrA1$ en un punto intermedio entre las cepas M145 y $\Delta 11$. Por el contrario, el mutante $\Delta abrA2$ presentaba una ligera reducción de la producción de undecilprodigiosina con respecto a la cepa silvestre.

Como conclusión se podría decir que los resultados de producción de undecilprodigiosina en este medio se corresponden con los observados en estudios anteriores del mutante $\Delta 11$, a la vez que evidencian nuevamente una regulación cruzada con otros hipotéticos sistemas de dos componentes en el caso de los mutantes sencillos.

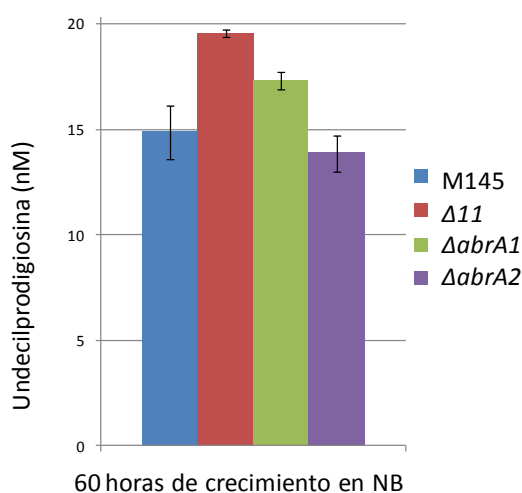


Figura 12: Cuantificación de undecilprodigiosina producida por las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en medio NB a las 60 horas de crecimiento. Las barras de error corresponden al error típico de la media.

Para la cuantificación de las diferencias en la producción de actinorrodina se emplearon muestras de los mismos cultivos de NB y NMMP líquido. En ambos medios las distintas cepas producían actinorrodina, aunque la producción en medio NMMP líquido comenzó varios días después que en NB. Tras un seguimiento a lo largo del tiempo, se destacan en la gráfica (Figura 13) los tiempos a los que presentaban mayores diferencias, 76 horas en NB y 136 horas en NMMP.

Se puede apreciar cómo en medio NB el mutante doble $\Delta 11$ presentaba una menor producción de actinorrodina, lo cual concuerda con los resultados de investigaciones previas (Yepes *et al.*, 2011). En este medio los mutantes sencillos $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ mostraban una producción similar entre ellos, siendo en ambos casos superior a la producción de actinorrodina de la cepa silvestre. Por su parte en medio NMMP los mutantes $\Delta abrA1$, $\Delta abrA2$ y $\Delta 11$ presentaban un incremento notable en la producción con respecto al silvestre.

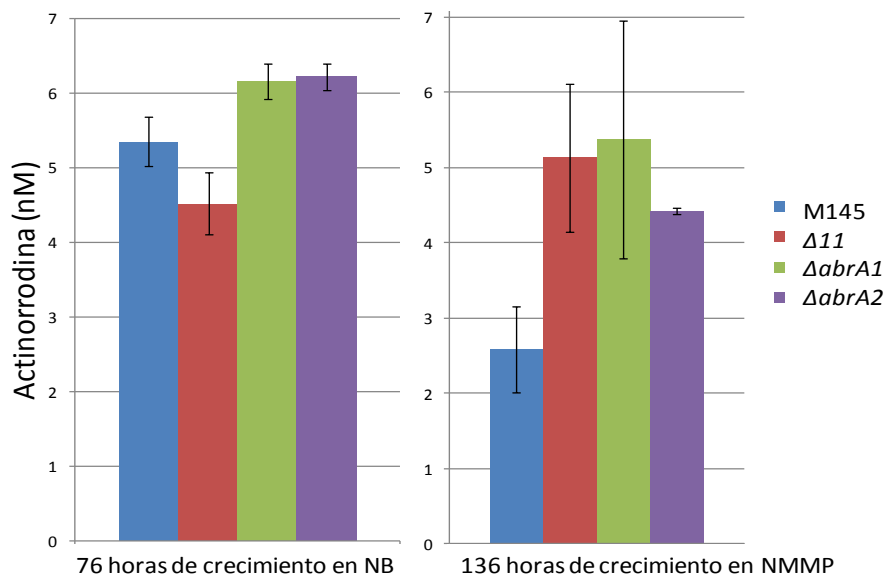


Figura 13: Cuantificación de actinorrodina producida en medio NB a las 76 horas (izquierda) y en NMMP a las 136 horas (derecha). Las barras de error corresponden al error típico de la media.

Estos resultados muestran de nuevo cómo el efecto de las mutaciones en el sistema de dos componentes *AbrA1/A2* es dependiente de medio en la producción de actinorrodina. De esta manera, mientras que la delección de ambos genes en el mutante $\Delta 11$ produce un incremento en la producción de actinorrodina en el medio NMMP, en medio NB se produce una cantidad menor de este antibiótico. Por otra parte, la delección de únicamente uno de los dos genes del sistema en los mutantes $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ aumenta la síntesis de actinorrodina en ambos medios. El fenotipo presentado por los mutantes sencillos, principalmente el encontrado en medio NB que es totalmente opuesto al del mutante doble, puede deberse como hemos dicho anteriormente a que en ausencia de

uno de los componentes del sistema se puede dar una regulación cruzada con otros sistemas de dos componentes similares (Groban *et al.*, 2009).

Con el fin de descartar que las diferencias en producción se debiesen a una alteración en la tasa de crecimiento de los mutantes, se hizo una curva de crecimiento en ambos medios (Figura 14). La curva reveló que las diferencias no podían atribuirse a un crecimiento alterado de las cepas mutantes porque sus respectivas curvas de crecimiento en ambos medios eran equivalentes entre sí.

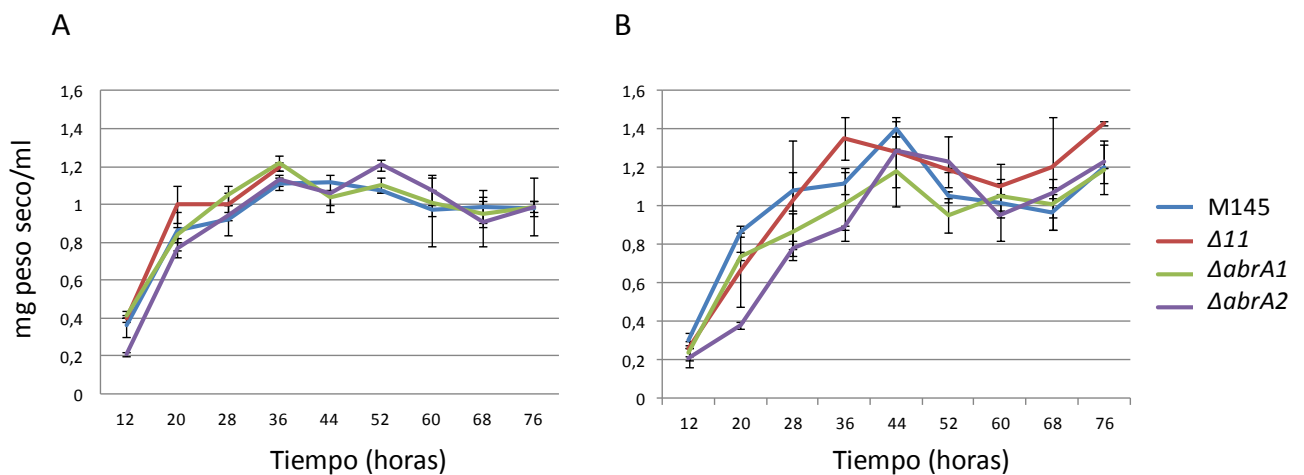


Figura 14: Curvas de crecimiento de las cepas M145, $\Delta 11$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en NB (A) y NMMP (B). Las barras de error corresponden al error típico de la media.

En resumen, en estos últimos apartados se muestra que los resultados de la cuantificación de los tres antibióticos producidos por las cepas ensayadas (ACT, CDA y RED) corroboraron lo observado previamente en los distintos medios sólidos. Independientemente de que el sistema AbrA1/A2 active o inhiba la expresión de determinados genes, puede ser considerado en último término un regulador negativo de la producción de antibióticos. La eliminación de tan sólo uno de los genes que conforman el sistema da lugar a distintos fenotipos dependiendo del medio de cultivo. Esta variación dependiendo del medio probablemente sea debida a interacciones con otros sistemas de dos componentes que se producen cuando falta la pareja correspondiente de cualquiera de los dos componentes del sistema. La distinta composición del medio a su vez produce que se active o no la HK correspondiente.

CONCLUSIONES:

1. El mutante *ΔabrA1* demostró ser correcto al comprobarse mediante Southern Blot.
2. La delección del gen del regulador de respuesta AbrA2 produce un aumento en la biosíntesis de actinorrodina, aunque la magnitud de este aumento es dependiente del medio de crecimiento. También se incrementa la producción de CDA. La cuantificación de undecilprodigiosina en medio NB no muestra grandes diferencias con respecto a la cepa silvestre.
3. La delección del gen de la histidina quinasa AbrA1 puede producir un aumento en la producción de actinorrodina en algunos medios, mientras que en otros su carencia no produce un fenotipo apreciable. La producción de CDA y undecilprodigiosina se incrementan al deleccionarse este gen en los medios utilizados.
4. Se observa un retraso en la germinación del mutante *ΔabrA2* con respecto al M145 y el *ΔabrA1*. Este retraso se observó también en el mutante *Δ11*.
5. En medio NA se observó una pigmentación amarilla relacionada con el *cluster cpk* en la cepa silvestre y el mutante *ΔabrA1*. No se observó en el mutante *Δ11* y *ΔabrA2*. Por lo tanto para este *cluster* el sistema AbrA1/A2 actuaría como un regulador positivo en este medio.
6. El comportamiento de los mutantes sencillos depende totalmente del medio.
7. Los fenotipos presentados por los mutantes sencillos no se ajustan en muchas ocasiones a los presentados por la cepa silvestre o el mutante doble *Δ11*. Por lo tanto parece haber evidencias de una regulación cruzada con otros sistemas de dos componentes cuando se elimina sólo uno de los dos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo se detallan en la siguiente tabla:

| CEPA | GENOTIPO | REFERENCIA |
|---|--|--|
| <i>S. coelicolor</i> M145 | Protótrofo, SCP1- SCP2- | (Kieser <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>S. coelicolor</i> Δ SCO1744/1745 | Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145: Δ SCO1744/1745 | (Yepes, 2006) |
| <i>S. coelicolor</i> Δ SCO1744 | Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145: Δ SCO1744 | Tesis Doctoral Sergio Rico (en realización). |
| <i>S. coelicolor</i> Δ SCO1745 | Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145: Δ SCO1745 | Tesis Doctoral Sergio Rico (en realización). |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Cepa silvestre | CECT 4522 |

2. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio **SFM** (Kieser *et al.*, 2000): manitol 20 g/l, harina de soja 20 g/l, agar 2%.
- Medio **NA** (Hopwood *et al.*, 1985): extracto de levadura 2 g/l, extracto de carne 1 g/l, peptona 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2%.
- Medio **R2YE** (Kieser *et al.*, 2000): sacarosa 103 g/l, K₂SO₄ 0,25 g/l, Cl₂Mg.6H₂O 10 g/l, glucosa 10 g/l, casaminoácidos 0,1 g/l, elementos traza* 2 ml, extracto de levadura 5 g/l, TES 5,73 g/l, agar 2%, pH 7.2. Justo antes de utilizarlo, añadir por cada 100 ml: KH₂PO₄ 0,5 %, 1 ml; CaCl₂.2 H₂O 5 M, 0,4 ml; L-prolina 20%, 1,5 ml. *Elementos traza (en un litro de agua): ZnCl₂ 40 mg, FeCl₃.6H₂O 200 mg, CuCl₂.2H₂O 10 mg, MnCl₂.4H₂O 10 mg, Na₂B₄O₇.10H₂O 10 mg y (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 10 mg.
- Medio **YEPD** (Rose, 1990): extracto de levadura 10 g/l, glucosa 10 g/l, peptona 20 g/l, agar 2%.

-Medio **NMMP** (Hopwood *et al.*, 1985): (NH₄)SO₄ 2g/l, MgSO₄.7 H₂O 0,6 g/l, casaminoácidos 5 g/l, elementos traza* 1 ml/l, pH 7,2. Después de autoclavar, añadir: NaH₂PO/Na₂HPO 0,1 M pH 6,8 45 ml/l, glucosa 40% 12,5 g/l. Este medio se empleo tanto en forma liquida como solida añadiendo agar 2 %. *Elementos traza: ZnSO₄.7H₂O 1g/L, FeSO₄.7H₂O 1g/L, MnCl₂.4H₂O 1g/L, CaCl₂ 1g/L.

- Medio **LB** (Sambrook *et al.*, 1989): bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar 2%. pH 7,5.

3. CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos sólidos de *Streptomyces* se incubaron en placas Petri en estufa a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de vidrio indentados ocupando 1/5 del volumen total del matraz con medio de cultivo. El inóculo se hizo en todos los casos con suspensiones de esporas cuantificadas. La concentración de esporas por matraz fue de 4x10⁶ e/ml. La incubación se realizó a 30 °C en un incubador orbital.

4. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. Obtención de ADN genómico de *Streptomyces*:

El ADN genómico (ADNg) de *Streptomyces* se obtuvo siguiendo el método modificado descrito por Kieser (Hopwood *et al.*, 1985). Se partió de 1 g de micelio que se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis: lizozima 2 mg/ml, sacarosa 0,3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl 25 mM, RNasa 50 µg/ml pH 8,0. Tras incubar a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron 5 ml de SDS 2%. Se agitó al vórtex y se añadieron 5 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) equilibrado. Se recuperó la fase acuosa tras la centrifugación. Este paso de fenolización se repitió hasta que la interfase quedó limpia (aproximadamente tres veces). A continuación se añadió 0,1 volumen de AcNa 3M pH 4,8 y 0,8 vol. de isopropanol para precipitar. Este precipitado se lavó con etanol al 70%.

4.2. Digestión del ADN

La digestión con endonucleasas de restricción permitió la caracterización física de fragmentos de ADN. La utilización de estas enzimas se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras (Fermentas, Promega y Roche).

4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue del 0,8% (p/v). La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (80-100 V) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM). Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta gracias al bromuro de etidio presente en el gel (0,5 µg/ml). Los tamaños de los fragmentos de ADN se estimaron por comparación con el marcador de referencia "1Kb Plus Ladder" (Invitrogen).

4.4. Purificación de fragmentos de ADN

El aislamiento y purificación de fragmentos específicos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó recortando el bloque de agarosa en el que estaba incluida la banda de interés después de haber realizado una electroforesis. A continuación dicho fragmento se trató con "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada para la obtención de la sonda de ADN empleada en el Southern. Los oligonucleótidos empleados fueron el AY 047 (TTTTTTCATATGAACGACCTCTTCGGGCGGG9) y el AY 070 (GGACGCGGTGGACGGGATCC). La primera etapa fue de 3 min a 98 °C; posteriormente se llevaron a cabo 30 ciclos de 30 s a 98 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C; y por último 7 min a 72 °C. Se obtuvo así el fragmento amplificado de 238 nucleótidos.

Las condiciones de PCR para el resto de las amplificaciones fueron una primera etapa de 3 min a 98 °C; seguido de 30 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 58 °C y 30 s a 72 °C; y por último 10 min a 72 °C.

4.6. Hibridación de ácidos nucleicos: Southern blot

Para analizar el ADN genómico por Southern-blot se utilizaron geles de agarosa al 0,8% en los que se cargaron 3 µg de muestra de ADN_g previamente digerido con las enzimas de restricción adecuadas. Tras la electroforesis, el ADN se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente (Hybond-N+, Amersham) según el protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Las sondas se marcaron por *random priming* con dUTP-Digoxigenina según las instrucciones del DIG *High prime DNA labeling and detection starter kitII* (Roche). Tras la hibridación se detectó la sonda utilizando un conjugado de anticuerpo antidigoxigenina con fosfatasa alcalina y

posteriormente la señal se detectó empleando un sustrato de la fosfatasa alcalina quimioluminiscente siguiendo las instrucciones del mismo kit utilizado para el marcaje.

5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

5.1. Bioensayo en medio sólido: producción de CDA

Las esporas se inocularon como gotas de 5 μ l conteniendo (10^5 esporas) sobre medio sólido NA y se incubaron a 30 °C durante 2 días. A continuación se cubrió la placa con 5 ml de agar nutritivo blando + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 60 mM que contenía 200 μ l de *Bacillus subtilis* ($\text{DO}_{600} = 0,25$) como microorganismo sensible y se incubó de nuevo a 30 °C 24 horas aproximadamente. Como control negativo se hizo una réplica del experimento añadiendo una cobertera de agar blando sin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ya que el calcio induce la actividad de este antibiótico.

5.2. Ensayo en medio líquido: cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina

Para cuantificar la producción de antibióticos en medio líquido se empleó un volumen de 100 ml de medio en matraces de 500 ml los cuales se inocularon por duplicado con una concentración final de 4×10^6 esporas/ml por cada cepa. De cada matraz a distintos tiempos y se cuantificaron los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina mediante colorimetría siguiendo un protocolo modificado del descrito por Kieser (Kieser *et al.*, 2000).

Para cuantificar la cantidad total de actinorrodina, las muestras fueron tratadas con 10 ml de KOH (1 N). Se incubaron las muestras toda la noche a 4 °C, se centrifugó la mezcla (12.000 rpm, 10 minutos) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 640 nm. Para medir la undecilprodigiosina el precipitado de células se lavó dos veces con HCl 0,5 M, y se resuspendió en HCl-metanol 0,5 N. Tras incubar 2 horas, se centrifugó y se midió la absorbancia a 530 nm. A continuación, conociendo el coeficiente de extinción molar para ambos compuestos en dichos solventes, (actinorrodina $\epsilon_{640} = 25320$, y undecilprodigiosina $\epsilon_{530} = 100500$) y aplicando la ley de Lambert-Beer se obtuvieron los datos de la concentración de los dos antibióticos para cada muestra.

5.3. Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento de las diferentes cepas se hicieron mediante cuantificación del peso seco del micelio. Para ello se utilizaron muestras de los mismos cultivos empleados para la cuantificación de antibióticos. En cada tiempo se filtraron 5 ml de cultivo y se estimó el peso seco equivalente.

BIBLIOGRAFÍA

Adamidis, T., Riggle, P., y Champness, W. (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol* *172*, 2962-2969.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* *417*, 141-147.

Bibb, M., y Hesketh, A. (2009). Chapter 4. Analyzing the regulation of antibiotic production in streptomycetes. *Methods Enzymol* *458*, 93-116.

Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., y Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res* *14*, 893-900.

Casino, P., Rubio, V., y Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* *139*, 325-336.

Challis, G.L., y Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100 Suppl 2*, 14555-14561.

Chang, H.M., Chen, M.Y., Shieh, Y.T., Bibb, M.J., y Chen, C.W. (1996). The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol* *21*, 1075-1085.

Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T., y Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* *34*, 171-198.

Galperin, M.Y., y Nikolskaya, A.N. (2007). Identification of sensory and signal-transducing domains in two-component signaling systems. *Methods Enzymol* *422*, 47-74.

Gao, R., y Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* *63*, 133-154.

Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M., y Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* *156*, 2343-2353.

Groban, E.S., Clarke, E.J., Salis, H.M., Miller, S.M., y Voigt, C.A. (2009). Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol* *390*, 380-393.

Gust B, K.T.a.C.K.F. (2002). REDIRECT technology: PCR-targeting system en *Streptomyces coelicolor*.

Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* 42, 47-238.

Hong, H.J., Hutchings, M.I., Neu, J.M., Wright, G.D., Paget, M.S., y Buttner, M.J. (2004). Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. *Mol Microbiol* 52, 1107-1121.

Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., y Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. John Innes Foundation: Norwich, UK.

Hutchings, M.I., Hoskisson, P.A., Chandra, G., y Buttner, M.J. (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 150, 2795-2806.

Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., y Beppu, T. (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* 174, 7585-7594.

Jenal, U., y Galperin, M.Y. (2009). Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol* 12, 152-160.

Kieser, T., Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., y Buttner, M.J. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation: Norwich, UK.

Kim, D., y Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* 147, 1197-1212.

Li, Y.Q., Chen, P.L., Chen, S.F., Wu, D., y Zheng, J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci* 5, 173-179.

Lu, C., y Shen, Y. (2007). A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)* 60, 649-653.

Lu, Y., He, J., Zhu, H., Yu, Z., Wang, R., Chen, Y., Dang, F., Zhang, W., Yang, S., y Jiang, W. (2011). An orphan histidine kinase, OhkA, regulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 193, 3020-3032.

Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 264, 133-144.

Moran, M.A., Rutherford, L.T., y Hodson, R.E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol* 61, 3695-3700.

Paget, M.S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., y Buttner, M.J. (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 181, 204-211.

Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., y Martín, J.F. (2007). Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant. *Proteomics* 7, 2410-2429.

Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.: New York.

Rozas, D., Gullón, S., y Mellado, R.P. (2012). A Novel Two-Component System Involved in the Transition to Secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PloS one* 7, e31760.

Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N. Y.

San Paolo, S., Huang, J., Cohen, S.N., y Thompson, C.J. (2006). *rag* genes: novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 61, 1167-1186.

Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M., y Laub, M.T. (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133, 1043-1054.

Sola-Landa, A., Moura, R.S., y Martín, J.F. (2003). The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6133-6138.

Steyn, A.J., Joseph, J., y Bloom, B.R. (2003). Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol* 47, 1075-1089.

Thompson, C.J., Fink, D., y Nguyen, L.D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* 3, REVIEWS1020.

Tsujibo, H., Hatano, N., Okamoto, T., Endo, H., Miyamoto, K., y Inamori, Y. (1999). Synthesis of chitinase in *Streptomyces thermoviolaceus* is regulated by a two-component sensor-regulator system. *FEMS Microbiol Lett* 181, 83-90.

West, A.H., y Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26, 369-376.

Wood, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 230-262.

Yepes, A. (2006). Estudio de sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces*. Grado de Salamanca, Salamanca, Salamanca.

Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R.I., y Díaz, M. (2011). Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. PLoS One 6, e19980.

Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S., Tan, H., Lu, Y., y Jiang, W. (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. Molecular microbiology 85, 535-556.

Zhang, W., y Shi, L. (2005). Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. Microbiology 151, 2159-2173.