
TRABAJO FIN DE MÁSTER

Empleo de cepas de *Streptomyces coelicolor* mutadas en el sistema de dos componentes AbrA para la expresión heteróloga de rutas de antibióticos

Sergio Antoraz Martín

Salamanca, 2014

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. ANTIBIÓTICOS: CONCEPTOS GENERALES	3
2. <i>Streptomyces</i> : LOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS	3
3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN <i>Streptomyces</i>	4
4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES	5
4.1 Características generales	5
4.2 Mecanismo de acción de los sistemas de dos componentes	6
5. <i>S. coelicolor</i> : LA ESPECIE MÁS ESTUDIADA	7
5.1 Características generales	7
5.2 Sistemas de dos componentes en <i>S. coelicolor</i>	8
6. ANTIBIÓTICOS PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA	9
6.1 Tetracenomicina C	10
6.2 Eloramicina	10
6.3 Estaurosporina	10
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	14
2. VECTORES UTILIZADOS	14
3. CEPAS DE <i>Streptomyces</i> GENERADAS	16
4. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS	17

4.1 Medios de cultivo	17
4.2 Aditivos para medios de cultivo	17
4.3 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas	18
5. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	18
5.1 Aislamiento de DNA	18
5.2 PCR	19
5.3 Electroforésis en gel de agarosa	19
5.4 Purificación de fragmentos de DNA	19
5.5 Aislamiento de RNA	19
5.6 qRT-PCR	20
5.7 Oligonucleótidos utilizados	20
6. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS	21
6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	21
6.2 Transformación de <i>Streptomyces</i>	21
7. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS	22
8. ANÁLISIS POR UPLC	22
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$	23
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>abrA1</i> Y <i>abrA2</i> EN LAS CEPAS COMPLEMENTADAS MEDIANTE qRT-PCR	25
INTRODUCCIÓN DE DISTINTAS RUTAS DE ANTIBIÓTICOS EN <i>S. coelicolor</i> PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA	26
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE TETRACENOMICINA C	27
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ELORAMICINA	30
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESTAUROSPORINA	31
<u>CONCLUSIONES</u>	35
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	36



INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



INTRODUCCIÓN

1. ANTIBIÓTICOS: CONCEPTOS GENERALES

Los antibióticos son compuestos de bajo peso molecular producidos generalmente por microorganismos que a bajas concentraciones son capaces de inhibir el crecimiento o matar a otros microorganismos. Se emplean frecuentemente en medicina para combatir enfermedades infecciosas y en investigación, donde son herramientas de gran utilidad, pero su uso también está extendido en agricultura y ganadería (Demain, 2014).

Los antibióticos son en general productos de complejas rutas biosintéticas que presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas (Becker, 2013). Son productos del metabolismo secundario, por lo que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor. No obstante, estos compuestos suelen conferir ventajas ecológicas y por lo tanto una mayor competitividad (Diminic *et al.*, 2014).

Aunque pueden ser sintetizados por algas, plantas superiores y hongos, la gran mayoría de los usados en clínica son producidos por bacterias (Demain, 2014). Dentro de este grupo cabe destacar un género por encima de los demás debido al número y la diversidad de los antibióticos que produce: *Streptomyces*.

El desarrollo de resistencias a los antibióticos por parte de distintos microorganismos patógenos se ha convertido en una grave amenaza para la salud. Aunque actualmente se están desarrollando diferentes alternativas para combatir enfermedades infecciosas (Mandal *et al.*, 2014; Nigam *et al.*, 2014), la aplicación de antibióticos sigue siendo la principal solución para combatir infecciones. Por ello no sólo se hace necesario investigar nuevos compuestos con actividades antibióticas, sino también desarrollar las herramientas biológicas necesarias para optimizar su producción.

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 (<http://www.bergeys.org>). Engloba bacterias miceliares Gram positivas fundamentalmente aerobias con un complejo ciclo de vida que conlleva diferenciación morfológica. Su hábitat natural es el suelo, aunque en la actualidad se están descubriendo nuevas especies de *Streptomyces* en distintos nichos (Seipke *et al.*, 2012; Raveh *et al.*, 2013). 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 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 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).

3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN *Streptomyces*

Dentro del grupo de metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces*, 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 cuyos productos intervienen en su síntesis se encuentran agrupados físicamente en *clusters* de tamaño variable que incluyen varios operones. Estos *clusters*, cuyo tamaño va desde las 15 hasta las 100 Kb, también incluyen los genes implicados en resistencia, transporte y regulación (Bibb y Hesketh, 2009). Los *clusters* biosintéticos están formados por unos 20-30 genes, cuya expresión 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 (Huang *et al.*, 2005). Mientras que los genes de los reguladores específicos de ruta se encuentran codificados dentro del propio *cluster*, los genes que codifican reguladores globales se localizan fuera de los mismos y pueden afectar no sólo a la producción de metabolitos secundarios sino también a la diferenciación.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de sistemas de dos componentes, que afectan de forma global a la regulación de la biosíntesis de antibióticos, en *S. coelicolor*. Por ello nos centraremos en la descripción de su funcionamiento en el siguiente apartado.

4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

4.1. Características generales

Las células, tanto procariontas como eucariotas, han desarrollado distintos sistemas de señalización para reconocer, integrar y responder a las múltiples variaciones del ambiente. En bacterias, la principal vía de señalización 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 en menor número. Sin embargo, no se han identificado en genomas animales ya secuenciados, por lo que se considera 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 al hablar de sistemas de dos componentes se hace referencia a la HK con su correspondiente pareja de RR adyacente en el genoma, en algunos casos la HK o el RR carecen de una 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: una región amino terminal, en la que se localiza el dominio sensor, y una región carboxilo terminal, donde reside la actividad quinasa de la proteína. La región amino terminal es variable, indicando la amplia diversidad de estímulos ambientales a los que pueden responder las distintas HKs. El dominio sensor que se localiza 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).



Figura 1: Esquema de un monómero de HK. TM: regiones transmembrana. H: Residuo conservado de histidina. Dominio DHP: Dominio de dimerización y fosfotransferencia. Dominio CA: Dominio catalítico

Los RRs son proteínas formadas por dos dominios, un dominio receptor en la región amino terminal y un dominio efector carboxilo terminal (Figura 2). El dominio regulador contiene una

serie de aminoácidos conservados imprescindibles para la fosforilación del RR. El dominio efector media la respuesta apropiada frente al estímulo específico de ese sistema. Este dominio es la región más variable de la proteína, y aunque la mayoría 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.

Los RRs pueden actuar como activadores o represores, o bien como ambos según la diana (Gao y Stock, 2009), y el número de genes regulados por ellos puede ir desde un sólo operón hasta cientos de genes (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003). 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.

4.2. Mecanismo de acción de los sistemas de dos componentes

El mecanismo de actuación de una ruta de señalización de dos componentes se inicia cuando 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 generalmente se da en trans, es decir, un monómero de la HK fosforila al otro monómero y viceversa, pero también puede ocurrir en cis donde cada monómero se autofosforila independientemente del otro (Casino *et al.*, 2009). Posteriormente, el grupo fosforil de la HK se transfiere al residuo Asp del dominio receptor del RR, lo provoca un cambio conformacional que hace que el dominio efector del RR sea activo, regulando por lo general la expresión génica (Figura 3). 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 procariontas, existen otras más complejas en las que intervienen más proteínas y se dan múltiples pasos de fosfotransferencia ("Phosphorelay system") (Zhang y Shi, 2005).

tripirrol altamente hidrofóbica. El CDA es un lipopéptido cíclico. El yCPK es la coelimicina P1, un alcaloide derivado de poliquétido.

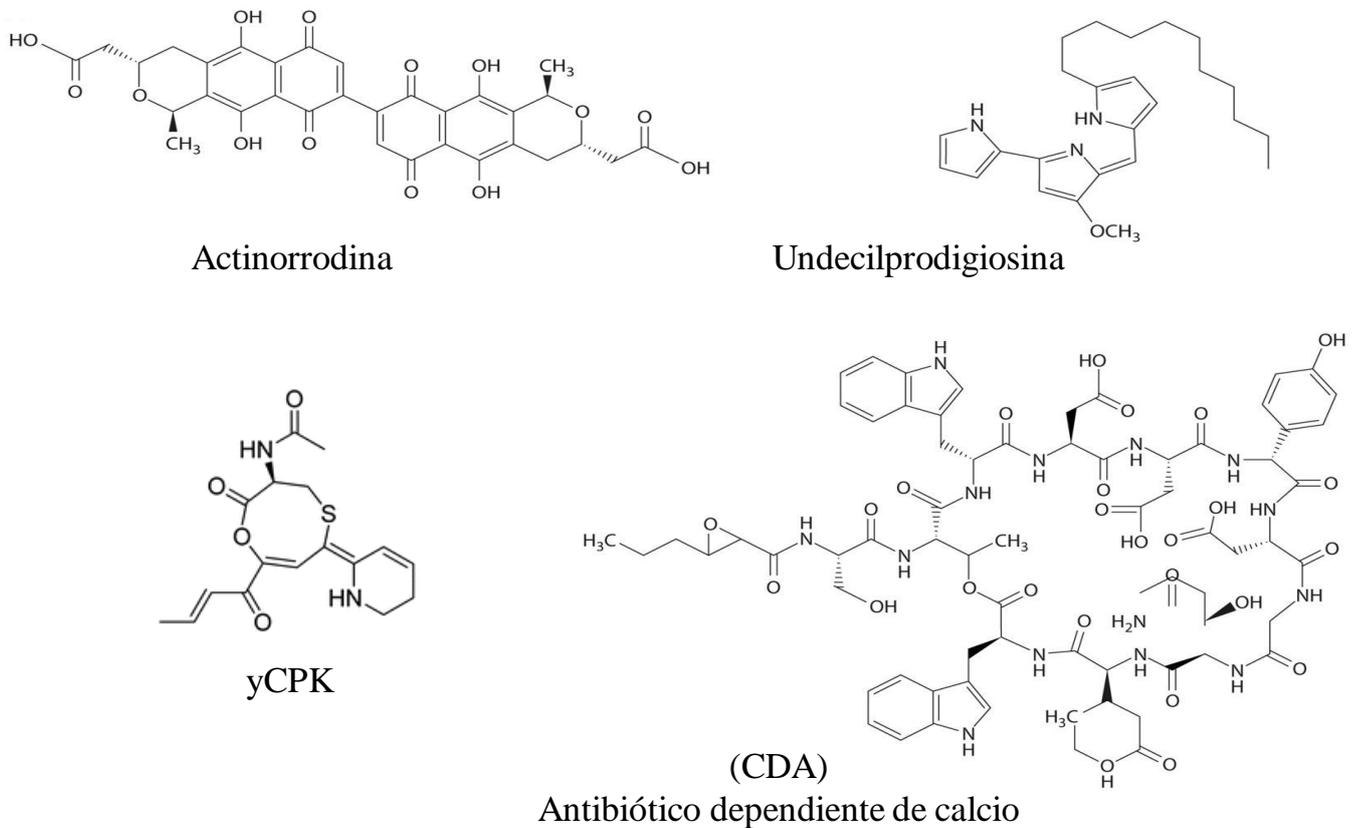


Figura 4: Estructura química de los antibióticos producidos por *S. coelicolor* A3 (2).

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 pigmentación conferida por ACT y RED hacen de *S. coelicolor* un buen modelo para estudios genéticos sobre producción de antibióticos, ya que son una característica fenotípica fácilmente diferenciable.

5.2. 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). Este hecho 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) (Rodríguez *et al.*, 2013).

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

TCS	Proceso regulado (Directa o indirectamente)	Referencia
AbsA1/A2	Producción de antibióticos	(Adamidis <i>et al.</i> , 1990)
AbrA1/A2	Producción de antibióticos y diferenciación morfológica	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
AbrC1/C2/C3	Desarrollo morfológico y producción de antibióticos	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
AfsQ1/Q2	Producción de antibióticos y diferenciación	(Ishizuka <i>et al.</i> , 1992)
CseB/C	Homeostasis de pared celular	(Paget <i>et al.</i> , 1999)
CutR/S	Producción de antibióticos	(Chang <i>et al.</i> , 1996)
ChiS/R	Producción de una quitinasa	(Homerova <i>et al.</i> , 2002)
DraR/K	Producción de antibióticos	(Yu <i>et al.</i> , 2012)
EcrA1/A2	Producción de antibióticos	(Li <i>et al.</i> , 2004)
OsaA/B	Osmoadaptación y producción de antibióticos	(Bishop <i>et al.</i> , 2004)
OhkA	HK huérfana implicada en producción de antibióticos y diferenciación	(Lu <i>et al.</i> , 2011)
PhoP/R	Transporte de fosfato y producción de antibióticos	(Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2007)
RagK/R	Esporulación independiente de SapB	(San Paolo <i>et al.</i> , 2006)
RapA1/A2	Producción de antibióticos	(Lu <i>et al.</i> , 2007)
VanR/S	Resistencia a vancomicina	(Hong <i>et al.</i> , 2004)
SCO0203/04	Producción de antibióticos	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
SCO2281	RR huérfano implicado en producción de antibióticos y diferenciación	(Rico <i>et al.</i> , en revisión)
SCO3818	RR huérfano implicado en producción de antibióticos	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
SCO4155/56	Secreción en respuesta a estrés	(Gullón <i>et al.</i> , 2012)
SCO5784/85	Metabolismo primario y secundario	(Rozas <i>et al.</i> , 2012)

6. ANTIBIÓTICOS PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del TCS AbrA1/A2 en la producción heteróloga de varios compuestos de interés con actividad tanto antibiótica como antitumoral. Los compuestos seleccionados para el estudio se describen a continuación.

6.1 Tetracenomicina C

La tetracenomicina C es un poliquétido aromático producido por *Streptomyces glaucescens* (Figura 5A). Los poliquétidos representan un grupo diverso de compuestos naturales producidos por plantas hongos y bacterias que presentan un considerable interés por su importancia como antibióticos y antitumorales. Su biosíntesis tiene mediante la adición de ácidos carboxílicos de cadena corta mediante reacciones catalizadas por enzimas denominadas Poliquétido Sintetas (PKS) (Hopwood y Sherman, 1990; Katz y Donadio, 1993). Los poliquétidos son compuestos de gran interés desde un punto de vista biotecnológico, ya que mediante biosíntesis combinatoria se pueden producir nuevos compuestos artificiales o productos híbridos, ya sea modificando su estructura principal mediante las poliquétido sintetas, o alterando modificaciones posteriores con transferasas u oxidorreductasas (Wohlert, 1998; Rodriguez *et al.*, 2000).

Este antibiótico es activo frente a algunas bacterias Gram positivas, especialmente frente a estreptomicetos, pero no frente a Gram negativas ni hongos. (Weber *et al.*, 1979). Además, la tetracenomicina C también tiene propiedades antitumorales.

6.2 Eloramicina

La eloramicina es otro poliquétido aromático con un alto nivel de similitud a la tetracenomicina C (Rohr y Zeeck, 1990). Este compuesto es producido por *Streptomyces olivaceus* Tü2353 (Drautz *et al.*, 1985). La eloramicina, al igual que la tetracenomicina C, presenta actividad antibiótica frente a Gram positivas, así como propiedades antitumorales. Su estructura es parecida a la tetracenomicina C, pero tiene un grupo C-12a-O-metil y en el grupo hidroxil de C-8 está glicosilado con un residuo L-ramnosa permetilado (Figura 5B). Por lo tanto, para producir eloramicina no solo es necesario producir el poliquétido sino también sintetizar el azúcar y transferirlo.

6.3 Estaurosporina

La estaurosporina (Figura 5C) es un indolocarbazol, una familia de productos naturales que constituye una clase de compuestos antitumorales. Estos compuestos se encuentran unidos a un azúcar mediante un enlace glicosídico a uno o a los dos grupos indol del esqueleto principal. La presencia de los azúcares es esencial para la actividad biológica de estos compuestos (Bailly *et al.*, 1999).

La estaurosporina es un potente inhibidor de la proteína quinasa C (Tamaoki *et al.*, 1986), pero no tiene la especificidad necesaria para su aplicación farmacéutica, por lo que actualmente se está tratando de generar nuevos derivados con una especificidad mayor (Sanchez *et al.*, 2005).

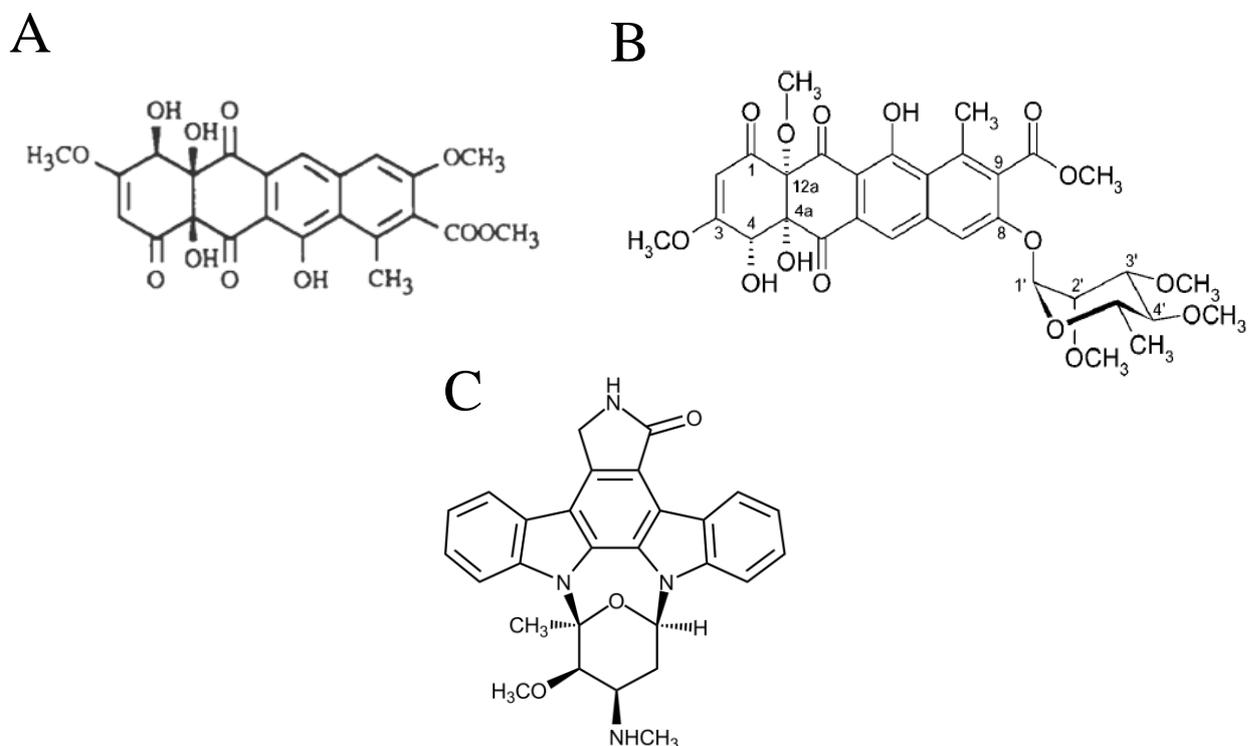


Figura 5: Estructura química de los antibióticos tetracenomicina C (A), eloramycin (B) y estaurosporina (C).

ANTECEDENTES

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha investigado el papel de varios TCSs de *S. coelicolor* M145. Uno de ellos, el sistema AbrA1/A2 (*SCOs* 1744/1745) es un regulador pleiotrópico negativo tanto de la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA como de la diferenciación (Yepes *et al.*, 2011). Los genes de este TCS forman parte de un operón en el que están precedidos por dos genes que codifican un sistema de transporte ABC (*SCOs* 1742/1743).

El mutante doble $\Delta 1744/45$ ($\Delta abrA1/A2$) presenta una mayor producción de antibióticos endógenos así como un desarrollo morfológico acelerado con respecto a la cepa silvestre. Los mutantes de delección simple de cada uno de los genes del sistema, $\Delta 1744$ ($\Delta abrA1$) y $\Delta 1745$

($\Delta abrA2$), muestran un fenotipo altamente dependiente de medio que en ninguno de los casos coincide con el presentado por el mutante doble (Figura 6). Esto, unido a otros experimentos realizados en nuestro grupo (Rico *et al.*, en revisión), parecería indicar que cuando uno de los dos componentes del sistema está ausente se produce una regulación cruzada con otros elementos ajenos al sistema. Sin embargo, la complementación de los mutantes individuales para desechar la posibilidad de un posible efecto polar debido a la mutación no se había llevado a cabo y forma parte de este trabajo.

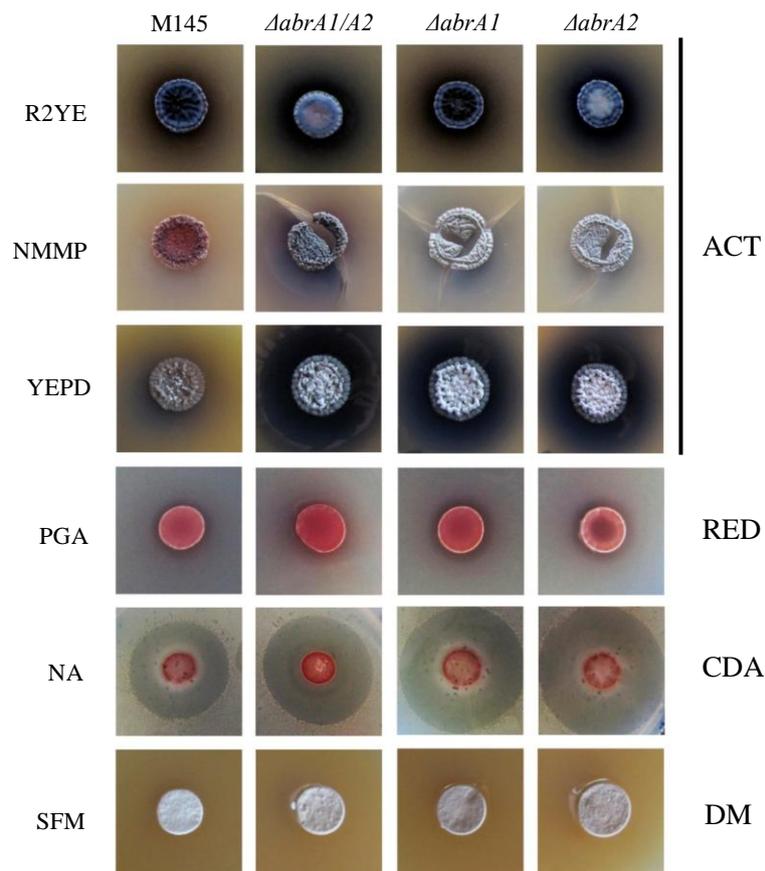


Figura 6: Fenotipo de los mutantes del sistema AbrA. Producción de los antibióticos ACT, RED y CDA y diferenciación morfológica (DM) en crecimiento en gota de las cepas M145, $\Delta abrA1/A2$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ en diferentes medios: R2YE (5 días), NMMP (7 días), YEPD (7 días), PGA (2 días), NA (bioensayo frente a *Bacillus subtilis*) y SFM (3 días).

También se habían llevado a cabo estudios sobre la producción heteróloga del antibiótico y antitumoral oviedomicina viéndose que su producción es muy superior en el mutante doble que en la cepa silvestre, duplicándola (Figura 7) (Rico *et al.*, en revisión). En este trabajo nos planteamos comparar la expresión heteróloga de otras rutas de producción de antibióticos en la cepa silvestre y

en el mutante doble para validar esta cepa como hospedador heterólogo, así como comprobar la expresión de la ruta de la tetracenomicina C en ambas cepas y en los mutantes sencillos $\DeltaabrA1$ y $\DeltaabrA2$ para determinar si la producción mejoraba en alguno de los mutantes sencillos.

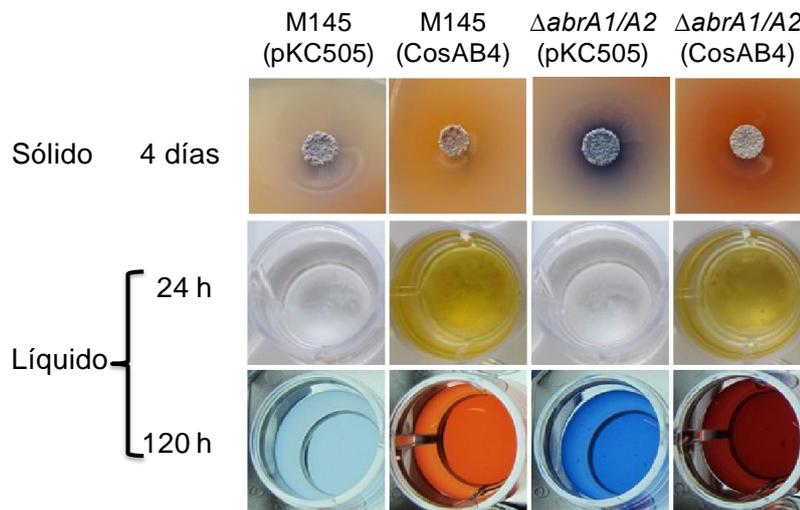


Figura 7: Comparación de la producción de oviedomicina (CosAB4) en medio NMMP sólido y líquido en las cepas M145 y $\DeltaabrA1/A2$. El plásmido pKC505 se empleó como control.

OBJETIVOS

1. Complementación de los mutantes $\DeltaabrA1$ y $\DeltaabrA2$ y análisis de los fenotipos.
2. Expresión heteróloga de las rutas de los antibióticos tetracenomicina C, eloramycin y estaurosporina en las diferentes cepas y comparación de la producción.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Protótrofo, SCP1- SCP2-	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: Δ SCO1744/1745	(Yepes, 2006)
<i>S. coelicolor</i> Δ abrA1	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: Δ SCO1744	(Rico <i>et al.</i> , en revisión)
<i>S. coelicolor</i> Δ abrA2	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: Δ SCO1745	(Rico <i>et al.</i> , en revisión)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYAargF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rk-,mk+), supE44, λ -, thi-1, gyrA, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> ET12567	dam, dcm, hsdS, cat, tet	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
<i>Bacillus subtilis</i>	Cepa silvestre	CECT 4522
<i>S. lividans</i> 1326	SLP1 ⁺ SLP2 ⁺	(Hopwood <i>et al.</i> , 1983)

2. VECTORES UTILIZADOS

En este trabajo se han utilizado y generado los siguientes vectores (Tabla 3).

Tabla 3: Vectores utilizados en este trabajo.

Vector	Características	Referencia
pKC796Hyg	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , integrativo Φ C31, HygR.	(Fernández-Abalos <i>et al.</i> , 2003)
pHabrA1/A2	Derivado del pKC796Hyg. Plásmido integrativo con los genes <i>abrA1/A2</i> clonados bajo su propio promotor	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
pET1745sintag	Derivado de pET-22b(+). Plásmido replicativo con el gen <i>abrA2</i> sin colas de histidinas clonado bajo control del promotor T7	(Rico <i>et al.</i> , en revisión)
pWHM3	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , alto número de copias, AmpR en <i>E. coli</i> , TioR en <i>Streptomyces</i>	(Vara <i>et al.</i> , 1989)
pWHM1026	Derivado del pWHM3 con la ruta de biosíntesis de la tetracenomicina C	(Decker y Hutchinson, 1993)
pKC505	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , bajo número de copias, ApraR	(Richardson <i>et al.</i> , 1987)
Cos16F4	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta	(Decker <i>et al.</i> , 1995)

de biosíntesis de la eloramicina		
Cos32D1	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta de biosíntesis de la estaurosporina	(Salas <i>et al.</i> , 2005)
pHabrA1	Derivado del pKC796Hyg. Plásmido integrativo con el gen <i>abrA1</i> clonado bajo su propio promotor	Este trabajo
pHabrA2	Derivado del pKC796Hyg. Plásmido integrativo con el gen <i>abrA2</i> clonado bajo su propio promotor	

Los plásmidos integrativos pHabrA1 y pHabrA2 son derivados del plásmido pKC796Hyg (multicopia en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces*), portador del sitio de integración del fago Φ C31.

El plásmido pHabrA1 se obtuvo amplificando mediante PCR el gen *abrA1* utilizando los oligonucleótidos AY-035 (añade un sitio *NdeI*) y SAM-001 (añade un sitio *XhoI*) (Tabla 5) y poniéndolo bajo el control de su propio promotor utilizando el plásmido pHabrA1/A2. Para ello se reemplazaron los genes *abrA1/abrA2* del plásmido pHabrA1/A2 digeridos con *XhoI* y *NdeI* por el fragmento de PCR digerido con los mismos sitios *NdeI* y *XhoI*. El plásmido resultante se clonó en *E. coli* DH5 α y el fragmento obtenido por PCR fue secuenciado para comprobar la ausencia de mutaciones (Figura 8).

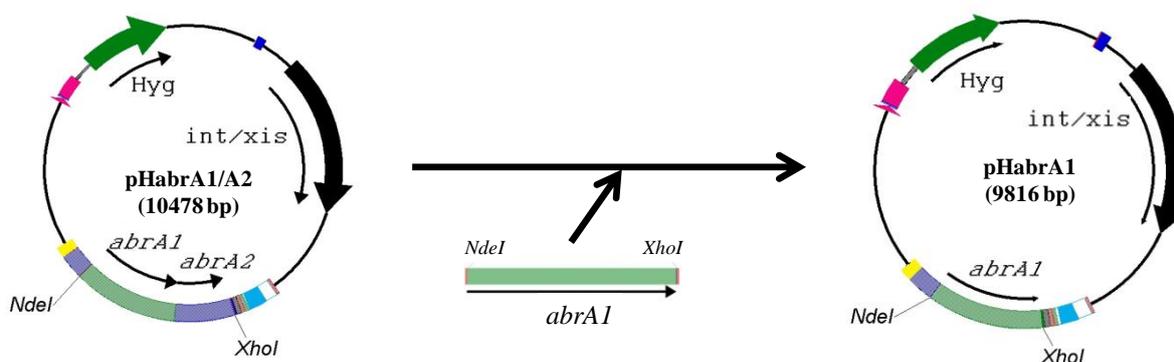


Figura 8: Construcción del plásmido pHabrA1

Del mismo modo, el plásmido pHabrA2 se construyó reemplazando los dos genes del sistema en el plásmido pHabrA1/A2 digerido con *NdeI* y *XhoI* por el gen *abrA2*. En este caso el gen *abrA2* se obtuvo tras digerir el plásmido pET1745sintag previamente obtenido y comprobado por secuenciación en nuestro laboratorio con los sitios *NdeI* y *XhoI* (Figura 9).

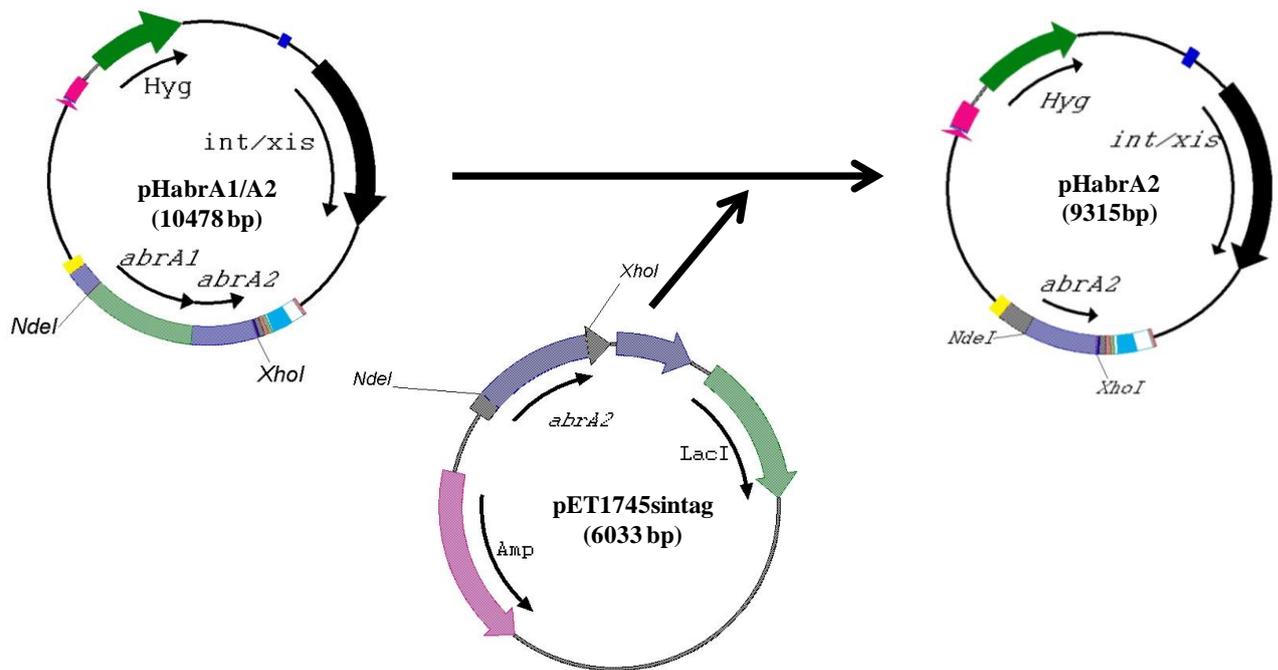


Figura 9: Construcción del plásmido pHabrA2

3. CEPAS DE *Streptomyces* GENERADAS

Las cepas de *Streptomyces* generadas en este trabajo se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Cepas de *Streptomyces* generadas en este trabajo

Cepa	Genotipo
<i>S. coelicolor</i> M145. pKC796Hyg	M145 con el plásmido pKC796Hyg insertado en el genoma
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1. pKC796Hyg	Δ SCO1744 con el plásmido pKC796Hyg
<i>S. coelicolor</i> Δ abra2. pKC796Hyg	Δ SCO1745 con el plásmido pKC796Hyg
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1. pHabrA1	Δ SCO1744 con el plásmido pHabrA1
<i>S. coelicolor</i> Δ abra2. pHabrA2	Δ SCO1745 con el plásmido pHabrA2
<i>S. coelicolor</i> M145 (pKC505)	M145 con el plásmido pKC505
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1/A2 (pKC505)	Δ SCO1744/45 con el plásmido pKC505
<i>S. coelicolor</i> M145 (16F4)	M145 con el plásmido 16F4
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1/A2 (16F4)	Δ SCO1744/45 con el plásmido 16F4
<i>S. coelicolor</i> M145 (32D1)	M145 con el plásmido 32D1
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1/A2 (32D1)	Δ SCO1744/45 con el plásmido 32D1
<i>S. coelicolor</i> M145 (pWHM3)	M145 con el plásmido pWHM3
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1/A2 (pWHM3)	Δ SCO1744/1745 con el plásmido pWHM3
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1 (pWHM3)	Δ SCO1744 con el plásmido pWHM3
<i>S. coelicolor</i> Δ abra2 (pWHM3)	Δ SCO1745 con el plásmido pWHM3
<i>S. coelicolor</i> M145 (pWHM1026)	M145 con el plásmido pWHM1026
<i>S. coelicolor</i> Δ abra1/A2 (pWHM1026)	Δ SCO1744/1745 con el plásmido pWHM1026

<i>S. coelicolor</i> Δ <i>abrA1</i> (pWHM1026)	Δ <i>SCO1744</i> con el plásmido pWHM1026
<i>S. coelicolor</i> Δ <i>abrA2</i> (pWHM1026)	Δ <i>SCO1745</i> con el plásmido pWHM1026

4. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

4.1 Medios de cultivo

- Medio **SFM (MSA)** (Kieser *et al.*, 2000): manitol 20 g/L, harina de soja 20 g/L, 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: ZnCl₂ 40 mg/L, FeCl₃.6H₂O 200 mg/L, CuCl₂.2H₂O 10 mg/L, MnCl₂.4H₂O 10 mg/L, Na₂B₄O₇.10H₂O 10 mg/L y (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 10 mg/L.
 - 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.
 - Medio **YEPD** (Rose *et al.*, 1990): extracto de levadura 10 g/L, glucosa 10 g/L, peptona 20 g/L. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %.
 - Medio **NMMP** (Hopwood *et al.*, 1985): (NH₄)SO₄ 2 g/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 empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %.
- *Elementos traza: ZnSO₄.7H₂O 1 g/L, FeSO₄.7H₂O 1 g/L, MnCl₂.4H₂O 1 g/L, CaCl₂ 1 g/L.
- Medio **LB** (Sambrook *et al.*, 1989): bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5. Este medio se empleo tanto en forma líquida como solida añadiendo agar 2 %.
 - Medio **YEG**: extracto de levadura 1 %, sacarosa 10,3 %, MgCl₂ 5 mM, glicina 0,5 %, glucosa 1 %.

4.2 Aditivos para medios de cultivo

Los antibióticos empleados a lo largo de este trabajo así como sus concentraciones para seleccionar y mantener los plásmidos y cósmidos utilizados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5: Antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico solución stock (mg/mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>E.coli</i>	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>Streptomyces</i>
Higromicina (hyg: 200)	200	75
Ampicilina (amp: 100)	100	-
Tioestreptona (tsr: 50)	-	10
Apramicina (apra: 200)	50	15

4.3 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas

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 en líquido se hizo mediante suspensiones de esporas cuantificadas, con una concentración de esporas por matraz de 10^6 esporas/mL; o desde taco en el caso de las cepas con los plásmidos pWHM3 y pWHM1026. En este caso el taco inóculo se obtuvo con un sacabocados de 0,8 cm de diámetro sobre un césped de las mencionadas cepas. La incubación se realizó a 30 °C en un incubador orbital a 200 rpm.

Las cepas de *E. coli* con plásmidos derivados del pKC796Hyg se incubaron a 37 °C, mientras que aquellas con los plásmidos derivados del pKC505 o del pWHM3 fueron incubadas a 30 °C debido a la termosensibilidad de estos vectores.

Las cepas de *E. coli* se conservaron en glicerol al 20 % congeladas a -80 °C. Las cepas de *Streptomyces* se mantuvieron como suspensiones de esporas o de micelio fresco en glicerol al 20 % congeladas a -20 %.

Las esporas de las diferentes cepas se recogieron siguiendo el protocolo descrito por (Hopwood *et al.*, 1985). Para calcular la población de las suspensiones obtenidas se sembraron diluciones seriadas en placas de YEPD y se contaron las colonias obtenidas tras 3-4 días de crecimiento.

5. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

5.1 Aislamiento de DNA

La obtención de DNA plasmídico de *E. coli* se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* (Macherey-Nagel). La obtención de DNA de los cósmidos se llevó a cabo siguiendo el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) introduciendo un paso de fenolización previo a la precipitación del DNA.

5.2 PCR

Para amplificar el gen *abrA1* se utilizó el kit *Phusion Hot Start II* (Finnzymes). El fragmento amplificado se obtuvo con los oligonucleótidos AY-035 y SAM-001 (Tabla 5) empleando como molde el plásmido pHabrA1/A2. Las condiciones de PCR fueron:

1. 98 °C - 30s
 2. 98 °C - 10 s
 3. 60 °C - 30 s
 4. 72 °C - 1 min
 5. 72 °C - 10 min
- } 30 ciclos

5.3 Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA 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. Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron por comparación con el marcador de referencia *1Kb Plus Ladder* (Invitrogen).

5.4 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo usando el kit *Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5 Aislamiento de RNA

El RNA se obtuvo a partir de cultivos en medio líquido por triplicado de cada cepa. Se emplearon matraces indentados de 250 mL con 50 mL de medio NB inoculado con 10^6 esporas/mL. Se tomaron muestras de 20 mL por duplicado a las 48 horas. Dichas muestras se centrifugaron y, tras desechar el sobrenadante, las células se trataron con *RNA Protect Bacteria Reagent* (Qiagen) y se congelaron. El micelio se lisó resuspendiéndolo en TE con lisozima (15 mg/mL) e incubando la solución 15 minutos a temperatura ambiente. El ARN se extrajo siguiendo el protocolo recomendado por el kit de purificación *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

5.6 qRT-PCR

Tras la obtención del RNA, las muestras se trataron con *DNasa RQ1* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar totalmente posibles contaminaciones con DNA. En cada reacción de RT-PCR se utilizaron 0,75 ng de RNA como molde para la síntesis de cDNA en 20 µL de volumen final de *iScript Reverse transcription Supermix for RT-qPCR* (Bio-Rad). Para llevar a cabo las qRT-PCRs se utilizaron 2 µL de cDNA junto a 2 µmoles de oligonucleótidos y 5 µL de *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) en un volumen final de 10 µL. Cada reacción se hizo por duplicado en un termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) incluyendo los controles negativos pertinentes (sin cDNA y con muestras de RNA sin síntesis de cDNA).

1. 95 °C - 30s
 2. 95 °C - 5 s
 3. 56,5 °C - 30 s
 4. 72 °C - 15 s
 5. 95 °C - 30 s
 6. 65 °C - 30 s
 7. 65 °C - 5 s - Incrementos de 0,5 °C 5 s hasta 95 °C
- } 40 ciclos

5.7 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5: Oligonucleótidos empleados durante este trabajo.

Nombre	Secuencia	Función
AY-035	TTTTTCATATGAACGACCTCTTCGGGCGGG	Oligonucleótido directo para clonar <i>abrA1</i> . El sitio de corte de <i>NdeI</i> aparece subrayado.
SAM-001	TTTTTTCCTCGAGTCATGCCGCGTCCCCGGCGTCC	Oligonucleótido reverso para clonar <i>abrA1</i> . El sitio de corte de <i>XhoI</i> aparece subrayado.
SAM-006	GGGATGCCCGTACAACCTG	Oligonucleótido directo para qRT-PCR de <i>abrA1</i> .
SAM-007	GGGGTCGGTGTGTTTGAG	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR de <i>abrA1</i> .
SAM-008	ACGTGGTCCTGATGGACA	Oligonucleótido directo

		para qRT-PCR de <i>abrA2</i> .
SAM-009	ACGTACTCGTCCAGGTCGTA	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR de <i>abrA2</i> .
hrdBF	CGACTACACCAAGGGCTACA	Oligonucleótido directo para qRT-PCR de <i>hrdB</i> .
hrdBR	TTGTTGATGACCTCGACCAT	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR de <i>hrdB</i> .

6. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS

6.1 Transformación de *E. coli*

Las transformaciones con plásmidos se llevaron a cabo utilizando células competentes de *E. coli* DH5 α y ET12567 y siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (Hanahan, 1983), en el cual se introduce el DNA mediante un choque térmico.

Las transformaciones con cósmidos se realizaron mediante electroporación. Las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y ET12567 se obtuvieron a partir de cultivos en medio SOB suplementado con 2 mL de MgCl₂ 2M y MgSO₄ 20 mM. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador *Micropulser TM* de Biorad con un pulso de 2,5 KV 5 ms. Las células electroporadas se incubaron 1 hora y media a 30 °C en un incubador orbital y se sembraron en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

6.2 Transformación de *Streptomyces*

El método utilizado para transformar *Streptomyces* fue el descrito por (Kieser *et al.*, 2000). Se obtuvieron protoplastos que fueron transformados con los distintos vectores demetilados y se regeneraron en placas de R2YE. Tras 24 horas de crecimiento se añadió una cobertera del antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes.

Para obtener los protoplastos se cultivaron las distintas cepas inoculando 2,5 x 10⁵ esporas en 25 mL de medio YEG durante 32 horas. Tras recoger las células por centrifugación, se trataron con solución P con lisozima (2mg/mL) hasta que se obtuvieron los protoplastos (30 minutos).

Solución P: TES 5,73 g/L; Sacarosa 103 g/L; Cl₂Mg 6H₂O 2,03 g/L; K₂SO₄ 0,25 g/L; CaCl₂ 2H₂O 3,68 g/L; elementos traza* 2 mL/L; pH 7,2. Tras autoclavar añadir 5 mL de KH₂PO₄ 1 % por litro.

*Elementos traza: ZnCl₂ 40 mg/L, FeCl₃.6H₂O 200 mg/L, CuCl₂.2H₂O 10 mg/L, MnCl₂.4H₂O 10 mg/L, Na₂B₄O₇.10H₂O 10 mg/L y (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 10 mg/L.

7. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Para los estudios en medio sólido se partió de suspensiones de esporas de las diferentes cepas (obtenidas de medio SFM con los antibióticos correspondientes a cada cepa) a partir de las cuales se sembraron gotas de 5 μL conteniendo 10^5 esporas sobre placas de YEPD, NMMP, NA y SFM. Las placas se incubaron a 30 °C y se siguió su progresión cada 24 horas.

Para valorar la producción de CDA, a los 5 días de crecimiento se cubrió la placa con 5 mL de agar nutritivo blando + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 60 mM que contenía 200 μL de un cultivo 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.

La producción de tetracenomicina C se observó mediante cultivos en medio líquido, inoculando desde tacho matraces de 50 mL con 10 mL de YEPD más el antibiótico de selección y dejándolo crecer 3 días. La comparación de fenotipos se hizo a partir de los sobrenadantes. También se valoró su actividad con un bioensayo frente a *S. lividans*. Para ello, sobre placas cuadradas con 70 mL de medio R2YE se sembraron 10^6 esporas de *S. lividans*. A continuación se hicieron pocillos en los que se añadieron dos dosis 100 μl del sobrenadante obtenido desde los cultivos líquidos, manteniendo la placa a baja temperatura hasta que el antibiótico difundió. Las dosis de sobrenadante se añadieron espaciadas 3 horas.

La producción de eloramicina y estaurosporina se llevó a cabo en cultivos en medio líquido, inoculando desde tacho o con 10^6 esporas/mL en 10 mL de YEPD más el antibiótico de selección en matraces indentados de 50 mL.

8. ANÁLISIS POR UPLC

Los análisis de producción mediante UPLC fueron realizados por el Dr. Alfredo Braña de la Universidad de Oviedo. A partir 1 mL de los cultivos en medio líquido se extrajeron con 700 μL de acetato de etilo acidificado con 1 % de ácido fórmico. Se evaporó la fase orgánica y el residuo seco se disolvió en 100 μL de DMSO + metanol (1:1). De cada muestra se inyectaron 5 μL y se analizaron los cromatogramas a 280 nm.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$

Como se ha comentado en la sección de antecedentes, la delección individual de los genes *abrA1* y *abrA2* origina fenotipos dependientes del medio de cultivo. En particular presentan mayor producción de ACT en medio YEPD, mayor producción de RED en medio NMMP, mayor producción de CDA en medio NA y una diferenciación morfológica acelerada (DM) en medio SFM (Figura 6). Para comprobar que los fenotipos observados en estos mutantes se debían realmente a la delección de dichos genes y no a efectos polares se llevó a cabo la complementación de estos mutantes en dichos medios. Para ello, se construyeron los plásmidos integrativos pHabrA1 y pHabrA2 que contienen los genes *abrA1* y *abrA2* respectivamente bajo el control del promotor del sistema (Materiales y métodos). Una vez obtenidos y comprobados, estos plásmidos se transfirieron a *E.coli* ET12567, una cepa no metilante, ya que *S. coelicolor* posee un sistema de restricción contra el ADN metilado (MacNeil, 1988; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2009). A continuación se transformaron protoplastos de las cepas de *S. coelicolor* $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ con sus correspondientes plásmidos. Paralelamente, ambos mutantes y la cepa silvestre M145 se transformaron con el plásmido pKC796Hyg y se usaron como controles debido a que la integración del plásmido vacío en el sitio $\phi C31$ puede provocar en todas las cepas una disminución por sí misma en la producción de antibióticos (Baltz, 1998).

Una vez obtenidos los transformantes, estos se sembraron en medio SFM para recoger esporas que fueron cuantificadas y se emplearon para realizar los posteriores análisis. Para analizar el fenotipo de producción de antibióticos así como de diferenciación morfológica, se sembraron 10^5 esporas de cada una de las cepas en gotas de 5 μ L para obtener 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 mismas.

Como podemos observar (Figura 10), tanto la inserción del gen *abrA1* en el mutante $\Delta abrA1$ como la del gen *abrA2* en el mutante $\Delta abrA2$ restauran los niveles de producción de los antibióticos ACT, RED y CDA y la diferenciación morfológica (DM) a los niveles de la cepa silvestre M145 portadora del plásmido. Estos resultados confirman que los fenotipos observados en los mutantes $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ son debidos a la delección de dichos genes, y no a efectos polares causados por su eliminación.

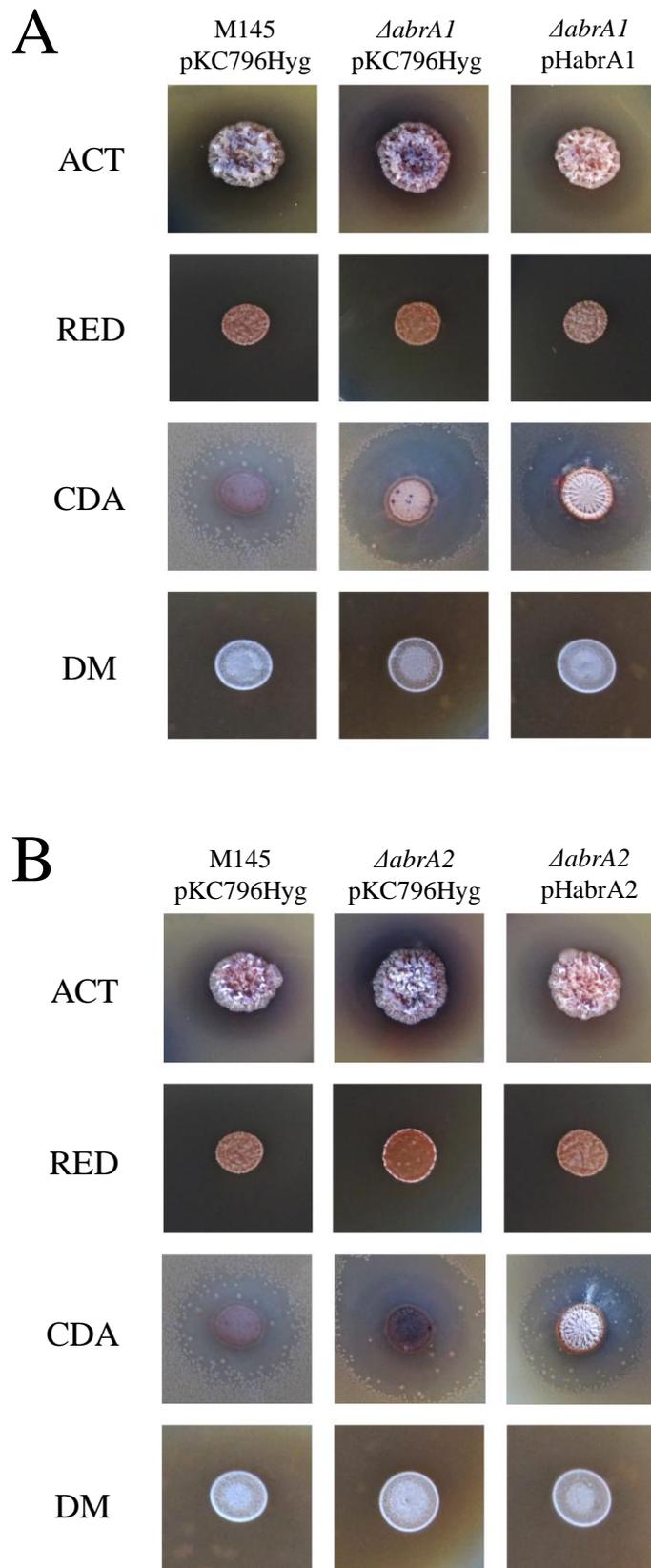


Figura 10: Complementación de los mutantes $\DeltaabrA1$ (A) y $\DeltaabrA2$ (B). Producción de ACT (YEPD, 9 días), RED (NMMP, 4 días), CDA, (NA, 5 días) y diferenciación morfológica (DM) (SFM, 2 días).

Como se ha comentado anteriormente, el uso de vectores integrativos en el sitio de inserción Φ C31 reduce la producción de antibióticos (Baltz, 1998). Esta reducción puede dificultar la comparación de fenotipos, especialmente cuando las diferencias encontradas previamente a la inserción del plásmido no son muy drásticas.

En nuestro estudio se pudo observar que la inserción de todos los plásmidos (incluso el vector) producían un fuerte efecto negativo sobre la producción de antibióticos y la diferenciación en todas las cepas. Estos efectos se manifestaron como una producción muy inferior a la mostrada en las cepas sin transformar y un retraso en esta producción y en la diferenciación.

Sin embargo y a pesar de este problema, el uso de vectores integrativos en el sitio Φ C31 es el más extendido en el estudio de *Streptomyces*, debido principalmente a la ausencia de otros vectores que se inserten en sitios alternativos en el genoma y que hayan sido tan intensamente estudiados. En los últimos años se están desarrollando nuevos vectores con otros sitios de inserción diferentes como el del fago ϕ BT-1 (Gregory *et al.*, 2003; Fayed *et al.*, 2014), pero su efecto sobre la producción de antibióticos no se ha estudiado.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *abrA1* Y *abrA2* EN LAS CEPAS COMPLEMENTADAS MEDIANTE qRT-PCR

Para comprobar de una forma alternativa si la introducción de los genes *abrA1* y *abrA2* en los mutantes restauraba la expresión de los mismos al nivel de la cepa silvestre se realizaron PCR cuantitativas en tiempo real. Esto además nos permitiría comprobar si la sustitución de cualquiera de los dos genes por el cassette de resistencia a apramicina afecta o no a la expresión del otro gen del sistema de dos componentes. Para ello se extrajo RNA tanto de las cepas complementadas como de las cepas M145, Δ *abrA1* y Δ *abrA2* portadoras del plásmido pKC796Hyg (Materiales y métodos), y tras sintetizar su cDNA complementario este se analizó con oligonucleótidos propios de los genes *abrA1*, *abrA2* y *hrdB* (gen de referencia).

Claramente hemos observado que los genes se están transcribiendo en las cepas complementadas. Sin embargo, no se han podido comparar los niveles de expresión entre estas cepas y la cepa silvestre debido a que no hemos sido capaces de determinar la expresión del gen de referencia *hrdB* (*SCO5820*), necesaria para cuantificar la expresión relativa de cada gen. Estos

experimentos se están repitiendo actualmente a fin de cuantificar la expresión de los genes complementados.

INTRODUCCIÓN DE DISTINTAS RUTAS DE ANTIBIÓTICOS EN *S. coelicolor* PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Por todo lo expuesto anteriormente, se ha determinado que el sistema AbrA1/A2 está involucrado en la regulación negativa de la producción de antibióticos, y que la cepa mutante doble en este sistema parece ser buena candidata para la expresión heteróloga de compuestos de interés (Rico *et al.*, en revisión). Para estudiar en mayor profundidad esta posibilidad las distintas cepas mutantes obtenidas fueron transformadas con diferentes plásmidos y cósmidos que contenían rutas de síntesis de distintos antibióticos. Las rutas ensayadas fueron la de la tetracenomicina C, la eloramycinina y la estaurosporina. Todas ellas, junto con los vectores correspondientes, fueron cedidas por el laboratorio de los Dres. José Antonio Salas y Carmen Méndez (Universidad de Oviedo).

Tanto el plásmido portador de la ruta de la tetracenomicina C (pWHM1026) como los dos cósmidos con las rutas de la eloramycinina (Cos16F4) y la estaurosporina (Cos32D1), así como los vectores vacíos correspondientes (pWHM3 y pKC505), fueron transformados en *E. coli* DH5 α para tener mayor cantidad de DNA y posteriormente en la cepa *E. coli* ET12567 para obtener sus formas demetiladas con las que transformar *S. coelicolor*.

Los estudios de producción de la ruta de la tetracenomicina C se realizaron en las cepas de *S. coelicolor* M145, Δ abrA1/A2, Δ abrA1 y Δ abrA2 transformando protoplastos de estas cepas con los plásmidos pWHM3 (control) y pWHM1026 y seleccionando los transformantes con tioestreptona. Los cósmidos Cos16F4 (eloramycinina), Cos32D1 (estaurosporina) y pKC505 (control) únicamente se transformaron en la cepa silvestre M145, y en Δ abrA1/A2, debido a que los cósmidos derivados del pKC505 deben ser seleccionados con apramicina, y los mutantes Δ abrA1 y Δ abrA2 ya eran resistentes a este antibiótico. En el futuro se obtendrán los mutantes SCAR (sin el cassette de resistencia a apramicina) de estos mutantes para el estudio de expresión de estas u otras rutas.

Todos los transformantes de *S. coelicolor* obtenidos se sembraron en parches y posteriormente en césped en placas de SFM para obtener esporas siguiendo el procedimiento habitual. Sin embargo, las cepas portadoras del plásmido pWHM1026 mostraron ser incapaces de

esporular incluso a tiempos largos, por lo que los subsiguientes estudios en líquido tuvieron que realizarse a partir de tacos de micelio en lugar de con esporas cuantificadas.

La ausencia de esporulación en este caso puede ser debida a diferentes factores. Una posibilidad es que los propios productos de la ruta, expresada en un plásmido de alto número de copias, puedan afectar de alguna manera a la esporulación. Se ha visto que algunos de los pigmentos presentes en las esporas son producidos por poliquétido sintetasas (PKS), enzimas necesarias para la síntesis de determinados antibióticos como la tetracenomicina C (Davis y Chater, 1990). Además, también se sabe que la tetracenomicina C es capaz de inhibir el crecimiento de algunas especies de *Streptomyces* (Weber et al., 1979), por lo que tal vez a pesar de que la ruta incluye los genes de resistencia esto podría afectar a la esporulación. A ello hay que añadir que el antibiótico de selección necesario para mantener los plásmidos, la tioestreptona, ha demostrado poder alterar la expresión de determinados genes de *Streptomyces* que afectan a la diferenciación (Murakami et al., 1989; Myers et al., 2014).

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE TETRACENOMICINA C

La introducción de la ruta de la tetracenomicina C mediante el plásmido pWHM1026 producía una coloración rojiza tanto en el propio *Streptomyces* como en el medio, que no se daba cuando las diferentes cepas eran transformadas con el vector vacío (pWHM3), por lo que se asoció esta tonalidad con la expresión de la ruta (Figura 11). De esta manera se pudo apreciar de forma cualitativa que en medio YEPD líquido a los 4 días el mutante doble del sistema ($\Delta abrA1/A2$) presentaba una producción muy superior a la cepa silvestre. El mutante carente del RR ($\Delta abrA2$) también mostraba un incremento en la producción, aunque no llegaba a alcanzar el nivel de la cepa $\Delta abrA1/A2$. Sin embargo, el mutante de la HK ($\Delta abrA1$) apenas presentaba diferencias con respecto a la cepa silvestre.

Se ha descrito que la tetracenomicina C es capaz de inhibir el crecimiento de distintas especies del género *Streptomyces* (Weber et al., 1979). Mediante un bioensayo frente a *S. lividans* se comprobó que el producto de la ruta era funcional y que las cepas que lo sintetizaban en mayor cantidad producían también un halo de inhibición de mayor diámetro (Figura 11B).

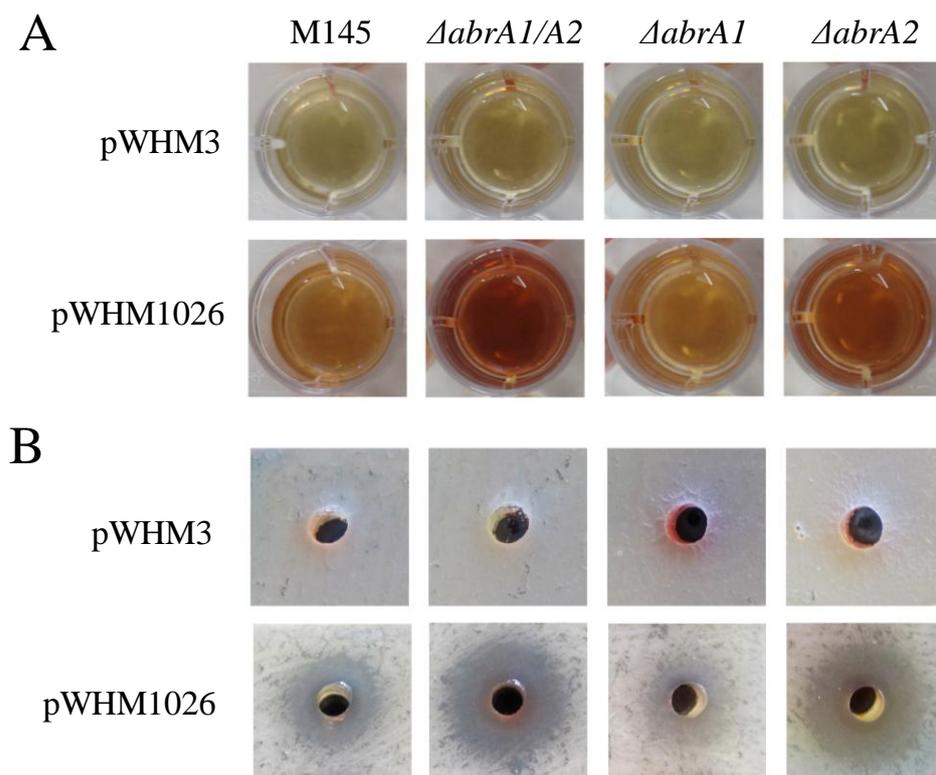


Figura 11: A: Producción de tetracenomicina en las cepas M145, $\Delta abrA1/A2$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ portadoras del plásmido pWHM1026 y pWHM3 (vector) en medio YEPD líquido. B: bioensayo frente a *S. lividans* a partir de los cultivos líquidos.

Para cuantificar las diferencias de producción observadas entre las diferentes cepas se inocularon cultivos de medio YEPD líquido desde taco y se recogieron a los 4 días de crecimiento, tras lo cual se congelaron y se enviaron al Dr. Alfredo Braña (Universidad de Oviedo) para que las analizara mediante UPLC.

Dicho análisis reveló diferentes picos correspondientes a la tetracenomicina C y a intermediarios de la ruta (Figura 12). Como podemos apreciar, tanto la tetracenomicina C como los compuestos intermediarios se producen en la cepa mutante $\Delta abrA1/A2$ en mayor cantidad que en la cepa silvestre, siendo dicha producción de aproximadamente el doble. En cuanto a los mutantes individuales, el mutante de la HK presenta unos niveles de producción muy parecidos a los de la cepa silvestre, y el mutante del RR, aunque presenta un incremento de la producción, se encuentra en un punto intermedio entre la cepa silvestre y el mutante doble.

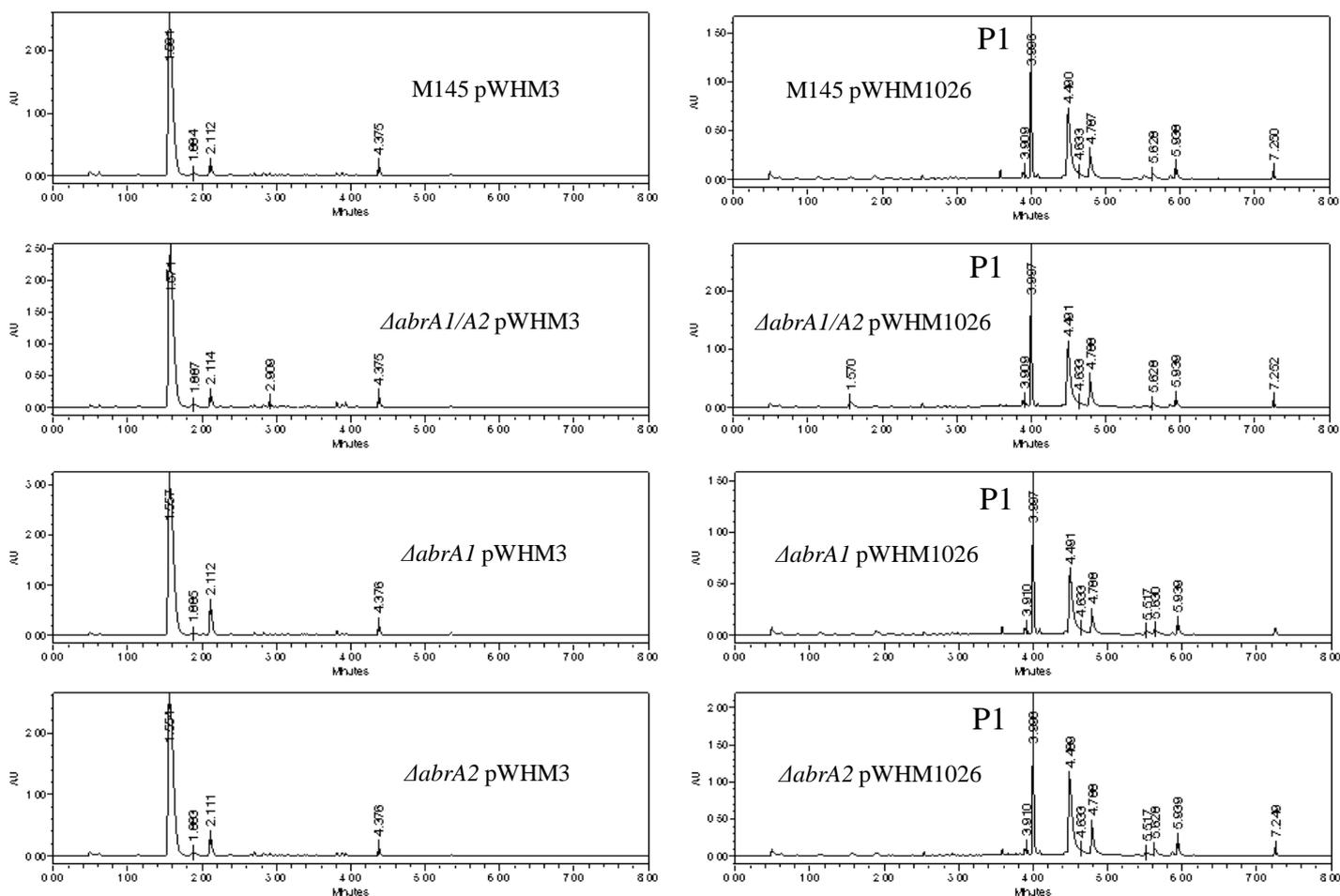


Figura 12: Gráficas de UPLC de las cepas M145, $\Delta abrA1/A2$, $\Delta abrA1$ y $\Delta abrA2$ portadoras del plásmido vacío (pWHM3) y el plásmido con la ruta de la tetracenomicina C (pWHM1026). P1: pico correspondiente a eloramycinona. Obsérvese la diferencia de escala (eje vertical).

Además, resulta interesante comprobar que los picos más importantes encontrados en las cepas con el plásmido control (a los 1,5 y 2,1 minutos) no se hallan presentes cuando se introducen las rutas. Estos picos, cuya naturaleza por el momento desconocemos, corresponden a productos endógenos sintetizados por *S. coelicolor* bajo esas condiciones de cultivo. Se ha podido observar (Rico *et al.*, en revisión) que la introducción de la ruta de la oviedomicina en *S. coelicolor* provocaba que no se sintetizara el antibiótico azul ACT (Figura 7). Por lo tanto, en vista de estos resultados, parece posible que expresar rutas de forma heteróloga influya negativamente no sólo sobre la producción de ACT, sino también sobre la de otros compuestos de la cepa huésped probablemente por la competencia por precursores de las rutas.

Por lo tanto, en este caso la cepa $\Delta abrA1/A2$ muestra de nuevo su potencial como huésped para expresar rutas de forma heteróloga en mayor cantidad que en la cepa silvestre, duplicando la producción.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ELORAMICINA

La ruta de la eloramicina no se encuentra completa en el cósmido Cos16F4 al carecer de los genes necesarios para sintetizar L-Ramnosa, por lo que para dar lugar al producto final, eloramicina, la cepa huésped debe ser capaz de sintetizar L-Ramnosa (Ramos *et al.*, 2008). En caso contrario, como ocurre en *S. lividans*, el producto final es la 8-demetil-tetracenomicina C, que también es uno de los intermediarios finales de la síntesis de tetracenomicina C, por lo que sería esperable que la coloración de ambos productos no fuera demasiado diferente.

Sin embargo, la introducción del cósmido Cos16F4 no dio lugar a colonias transformantes con una coloración rojiza semejante a la mostrada cuando se insertaba la ruta de la tetracenomicina C. Los posteriores ensayos en medios sólidos y líquidos, así como bioensayos frente a *S. lividans* tanto desde tacos de medio sólido como con los sobrenadantes recogidos en medio líquido no mostraron diferencias entre las cepas con el cósmido con la ruta y el vacío. El análisis mediante UPLC (Figura 13) tampoco mostró los picos de producción esperables para la producción de 8-demetil-tetracenomicina C ni de ninguno de sus intermediarios.

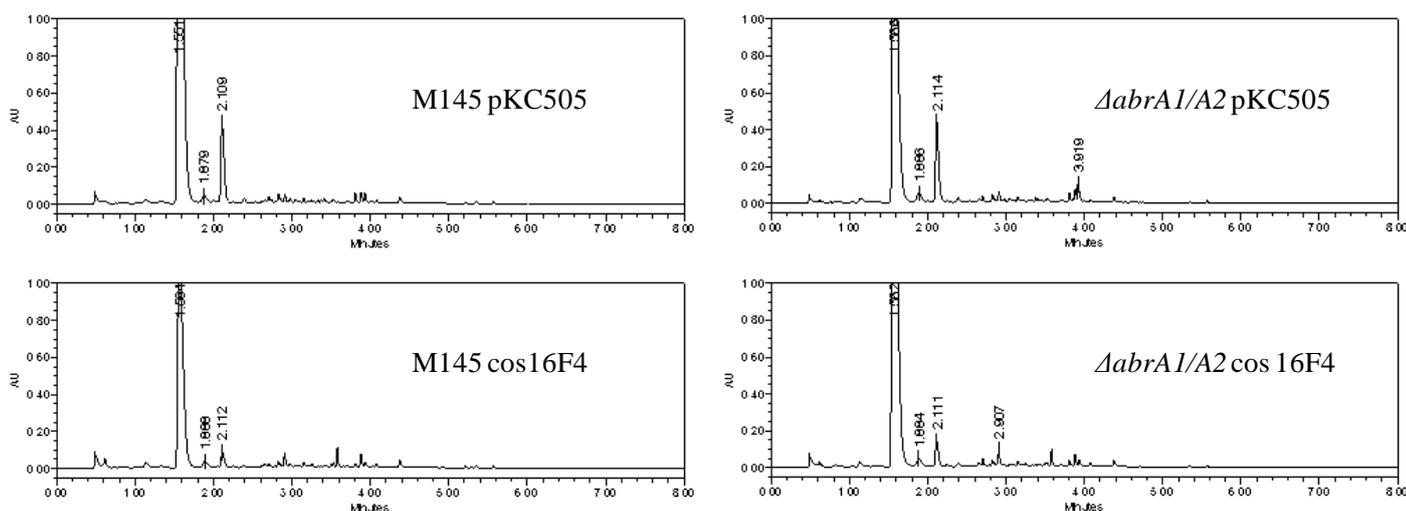


Figura 13: Gráficas de UPLC de las cepas M145 y $\Delta abrA1/A2$, portadoras del cósmido 16F4 o el vector pKC505.

Curiosamente el pico encontrado a 2,1 minutos, correspondiente a algún compuesto producido por *S. coelicolor* bajo esas condiciones de cultivo, muestra una fuerte disminución cuando las cepas empleadas portan el cósmido con la ruta en lugar del control, aunque no desaparece como ocurría con la ruta de la tetracenomicina C.

Como hemos dicho anteriormente, la producción de compuestos de forma heteróloga en *S. coelicolor* causa una disminución de ACT en la cepa hospedadora (Rico *et al.* en revisión), y es probable que también se vean afectados otros compuestos del metabolismo secundario. En este caso, a pesar de que aparentemente la ruta no se estaría expresando, vemos que también se produce una reducción de un compuesto, aunque por el momento no conocemos la naturaleza del mismo y las causas de su disminución al introducir la ruta de la eloramycinina.

Aunque estos datos muestran que el cósmido Cos16F4 no es capaz de expresar la ruta de la eloramycinina en estas cepas en las condiciones utilizadas, esta ruta ha sido expresada de forma heteróloga con el mismo cósmido en *S. lividans*, especie muy cercana a la utilizada en este trabajo *S. coelicolor* M145, llegando a producir 8-demetil-tetracenomicina C (Ramos *et al.*, 2008). Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se hace necesario reproducir exactamente las mismas condiciones de esos estudios con el fin de poder demostrar si en este caso la cepa Δ *abrA1/A2* también presenta una mayor producción.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESTAUROSPORINA

La transformación de las cepas M145 y Δ *abrA1/A2* con el cósmido Cos32D1 no dio lugar a colonias transformantes con un fenotipo diferenciado de las cepas transformadas con el plásmido control pKC505. La búsqueda bibliográfica tampoco aportó información sobre si dicho antibiótico presenta coloración, por lo que el hecho de no poder diferenciar fácilmente si se está sintetizando estaurosporina dificultó los estudios visuales con este compuesto.

Al haberse descrito diferentes actividades antimicrobianas para la estaurosporina (Omura *et al.*, 1977), se procedió a realizar antibiogramas frente a algunos de los microorganismos sensibles a este compuesto para determinar si se estaba produciendo. Los organismos ensayados fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* y *E. coli*. Dichos antibiogramas se llevaron a cabo tanto desde tacos de medio sólido, conteniendo el micelio de las distintas cepas, como desde sobrenadantes recogidos de medio líquido, crecidos en ambos casos en diferentes medios y a distintos tiempos. En ninguno de los casos se observó inhibición del crecimiento de los organismos seleccionados, indicando que o bien la estaurosporina no se producía en esas condiciones o se producía en cantidades demasiado bajas como para impedir el crecimiento de los organismos ensayados.

El análisis cuantitativo por UPLC confirmó que no se producía estaurosporina ni ninguno de sus derivados en las cepas portadoras del cósmido Cos32D1 crecidas en YEPD líquido durante 4 días (Figura 14). No obstante, vemos que la cepa $\DeltaabrA1/A2$ con el cósmido Cos32D1 produce tres picos que destacan claramente (P1, P2 y P3) y también una serie de picos menos claros (P4), que no aparecen ni en la cepa M145 portadora del mismo cósmido ni en los controles vacíos.

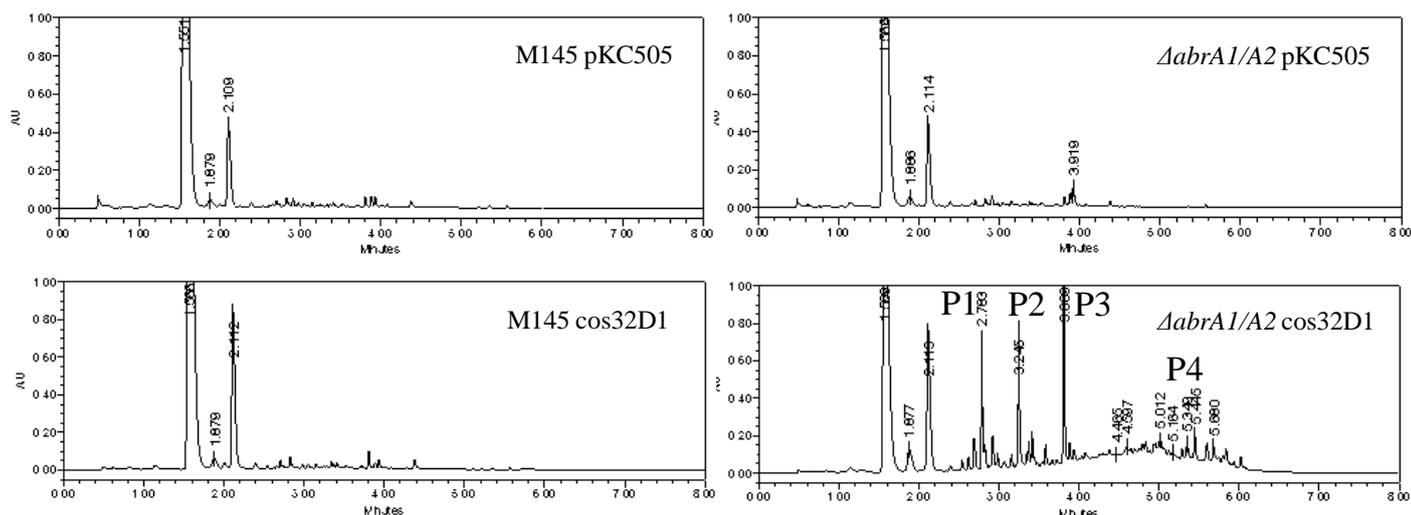


Figura 14: Gráficas UPLC de las cepas M145 y $\DeltaabrA1/A2$ con el cósmido 32D1 y el vector vacío a 280 nm.

Sin embargo, se vio que ninguno de estos picos correspondía a la estaurosporina ni a ninguno de sus intermediarios. El análisis de barrido a distintas longitudes de onda de la serie de compuestos que se detectan como picos poco diferenciados a 280 nm (P4) reveló que esta serie de productos presentan el mismo patrón de la ACT (Figura 15). No obstante, como se pudo apreciar en la figura 14, no hay picos aislados, sino un conjunto de moléculas que aparecen a lo largo de ese intervalo, indicando que existe una serie de intermediarios y productos modificados y mal acabados que no llegan a ser ACT, probablemente fruto de la interferencia por precursores y enzimas con otra ruta biosintética. En cuanto a los otros picos encontrados (P1, P2 y P3), no se ha visto semejanza con estaurosporina ni intermediarios de su síntesis, ni con ACT, ni con otros compuestos con los que se compararon.

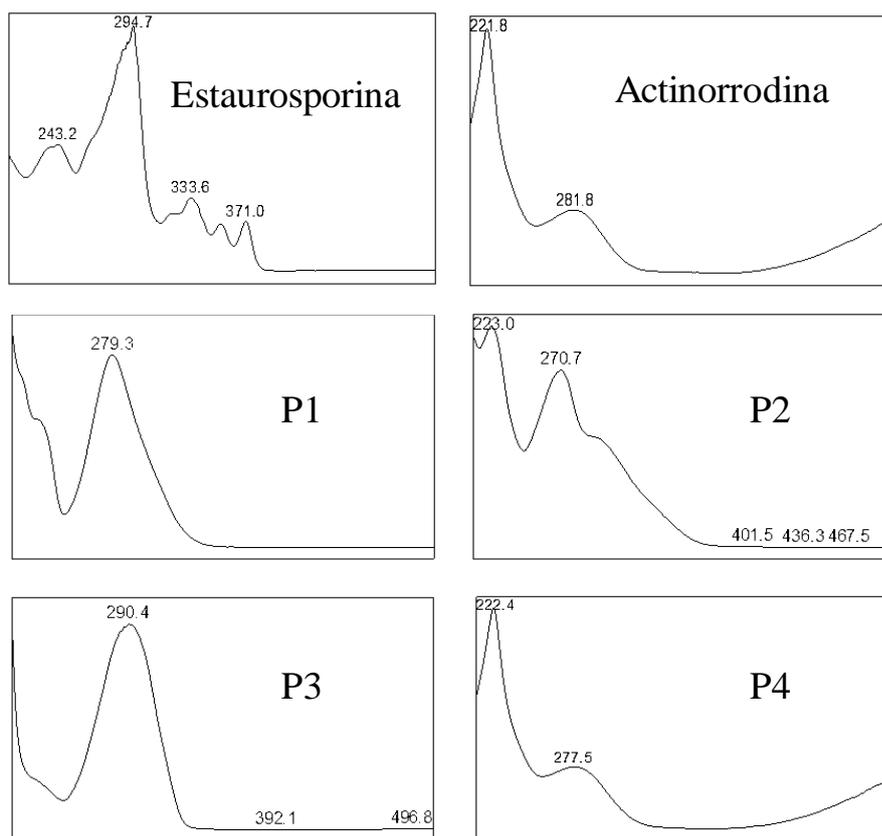


Figura 15: Comparación de los barrido de estaurosporina y actinorrodina con los picos encontrados en la muestra del mutante $\Delta abrA1/A2$ con el cósmido 32D1.

Una posible interpretación para estos resultados es que la introducción de esta ruta en nuestro mutante esté produciendo una desrepresión de alguno de los *clusters* silenciados de *S. coelicolor*. Hay que señalar que la expresión heteróloga de compuestos es en la actualidad una de las estrategias empleadas para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios. Por un lado, expresar *clusters* crípticos de diferentes especies de *Streptomyces* está permitiendo descubrir nuevos metabolitos secundarios, ya que muchos de esos genes no se encuentran activos en las condiciones de cultivo de la especie original, y su introducción en otras puede activar su expresión. Por otro, introducir *clusters* biosintéticos en otras especies también puede modificar la producción de metabolitos secundarios de la cepa huésped. Se ha visto que la introducción del *cluster* de tienamicina de *S. cattleya* en *S. albus* modifica su producción de metabolitos secundarios (Braña *et al.*, 2014), de tal manera que aunque no sintetiza dicho antibiótico, *S. albus* produce nuevos metabolitos como las paulomicinas A y B utilizadas en clínica frente a *Chlamydia*, tetrametilpirazina usada en tratamientos de enfermedades cardiovasculares, protección pulmonar y fibrosis quística y dihidro- β -agarofurano, con actividades antitumoral, anti-VIH e inmunosupresora.

Por lo tanto, otros análisis y experimentos se requieren para conocer a qué corresponden y cuál es el origen de esos picos.

En cuanto a la ausencia de producción de estaurosporina, existe la posibilidad de que los medios seleccionados no sean los idóneos para que la ruta se exprese normalmente, al estar entrando en juego alguno de los muchos reguladores existentes en *S. coelicolor* que afecte negativamente a la producción de este compuesto.

No obstante, hay que indicar que en trabajos previos (Santamaría, 2013) se trató de expresar la ruta del antibiótico rebecamicina sin conseguir que se produjera en ninguna de las cepas seleccionadas. La estaurosporina y la rebecamicina son dos indolocarbazoles que comparten una misma estructura principal. Esto tal vez indique que en ambos casos la ruta está bloqueada de una manera similar, que podría ser extensible a otros indolocarbazoles, por lo que encontrar la manera de desbloquear dichas rutas podría ser de gran interés a la hora de expresar otras rutas en estas cepas.

El hecho de expresar rutas de determinados compuestos en otro organismo puede producir que como hemos visto los compuestos no se produzcan o no lleguen a su producto final, por lo que para poder implementar la producción de un compuesto en concreto posiblemente se necesitarán estudios en mayor profundidad y, tal vez, otras modificaciones. En futuros proyectos del grupo se continuará trabajando con cepas que además carezcan de las rutas de antibióticos endógenos más importantes, hecho que aparte de haber mostrado que afecta positivamente a la producción (Gómez-Escribano y Bibb, 2011) posiblemente evite interacciones indeseadas con otros compuestos endógenos.



CONCLUSIONES

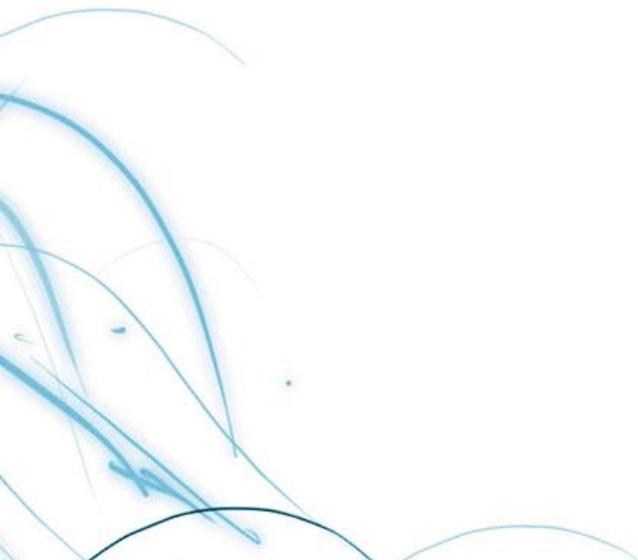


CONCLUSIONES

1. Los fenotipos mostrados por los mutantes *ΔabrA1* y *ΔabrA2* se deben a la delección de dichos genes y no a efectos polares.
2. La introducción de vectores en el sitio ΦC31 causa una fuerte disminución en la producción de antibióticos.
3. La cepa *ΔabrA1/A2* duplica la producción heteróloga de tetracenomicina C con respecto a la cepa silvestre.
4. El mutante *ΔabrA2* presenta un aumento del 50% de la producción de tetracenomicina C con respecto a la cepa silvestre.
6. El antibiótico eloramicina no se produce en ninguna de las cepas en las condiciones seleccionadas en este estudio.
7. El antibiótico estaurosporina no se produce en las condiciones seleccionadas.
8. El mutante *ΔabrA1/A2* con la ruta de la estaurosporina produce una serie de compuestos no identificados.



BIBLIOGRAFÍA



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

Bailly, C., Qu, X., Graves, D.E., Prudhomme, M., y Chaires, J.B. (1999). Calories from carbohydrates: energetic contribution of the carbohydrate moiety of rebeccamycin to DNA binding and the effect of its orientation on topoisomerase I inhibition. *Chemistry & biology* 6, 277-286.

Baltz, R.H. (1998). Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends in microbiology* 6, 76-83.

Becker, D.E. (2013). Antimicrobial drugs. *Anesthesia progress* 60, 111-122.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., y Hopwood, D.A. (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 in enzymology* 458, 93-116.

Birnboim, H.C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.

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 research* 14, 893-900.

Braña, A.F., Rodríguez, M., Pahari, P., Rohr, J., García, L.A., y Blanco, G. (2014). Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Archives of microbiology* 196, 345-355.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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. *Molecular microbiology* 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.

Davis, N.K., y Chater, K.F. (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Molecular microbiology* 4, 1679-1691.

Decker, H., y Hutchinson, C.R. (1993). Transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens* tetracenomycin C biosynthesis gene cluster. *Journal of bacteriology* 175, 3887-3892.

Decker, H., Rohr, J., Motamedi, H., Zahner, H., y Hutchinson, C.R. (1995). Identification of *Streptomyces olivaceus* Tü2353 genes involved in the production of the polyketide elloramycin. *Gene* 166, 121-126.

Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 185-201.

Diminic, J., Starcevic, A., Lisfi, M., Baranasic, D., Gacesa, R., Hranueli, D., Long, P.F., Cullum, J., y Zucko, J. (2014). Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 211-217.

Drautz, H., Reuschenbach, P., Zahner, H., Rohr, J., y Zeeck, A. (1985). Metabolic products of microorganisms. Elloramycin, a new anthracycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation, characterization, structure and biological properties. *The Journal of antibiotics* 38, 1291-1301.

Fayed, B., Younger, E., Taylor, G., y Smith, M.C. (2014). A novel *Streptomyces* spp. integration vector derived from the *S. venezuelae* phage, SV1. *BMC biotechnology* 14, 51.

Fernández-Abalos, J.M., Reviejo, V., Díaz, M., Rodríguez, S., Leal, F., y Santamaría, R.I. (2003). Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology* 149, 1623-1632.

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. *Annual review of microbiology* 63, 133-154.

Gómez-Escribano, J.P., y Bibb, M.J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial biotechnology* 4, 207-215.

González-Cerón, G., Miranda-Olivares, O.J., y Servín-González, L. (2009). Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS microbiology letters* 301, 35-43.

Gottelt, M., Kol, S., Gómez-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.

Gregory, M.A., Till, R., y Smith, M.C. (2003). Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *Journal of bacteriology* 185, 5320-5323.

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.

Gullón, S., Vicente, R.L., y Mellado, R.P. (2012). A novel two-component system involved in secretion stress response in *Streptomyces lividans*. *PloS one* 7, e48987.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.

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

Homerova, D., Knirschova, R., y Kormanec, J. (2002). Response regulator ChiR regulates expression of chitinase gene, *chiC*, in *Streptomyces coelicolor*. *Folia microbiologica* 47, 499-505.

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. *Molecular microbiology* 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.

Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., y Bibb, M.J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of general microbiology* 129, 2257-2269.

Hopwood, D.A., y Sherman, D.H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual review of genetics* 24, 37-66.

Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M.J., Karoonuthaisiri, N., Lih, C.J., Kao, C.M., Buttner, M.J., y Cohen, S.N. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* 58, 1276-1287.

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. *Journal of bacteriology* 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.

Katz, L., y Donadio, S. (1993). Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annual review of microbiology* 47, 875-912.

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, 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.

Lu, Y., Wang, W., Shu, D., Zhang, W., Chen, L., Qin, Z., Yang, S., y Jiang, W. (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* 77, 625-635.

MacNeil, D.J. (1988). Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of bacteriology* 170, 5607-5612.

MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., y MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61-68.

Mandal, S.M., Roy, A., Ghosh, A.K., Hazra, T.K., Basak, A., y Franco, O.L. (2014). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Frontiers in pharmacology* 5, 105.

Martínez-Antonio, A., y Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology* 6, 482-489.

Murakami, T., Holt, T.G., y Thompson, C.J. (1989). Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology* 171, 1459-1466.

Myers, C.L., Harris, J., Yeung, J.C., y Honek, J.F. (2014). Molecular interactions between thiostrepton and the TipAS protein from *Streptomyces lividans*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 15, 681-687.

Nett, M., Ikeda, H., y Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports* 26, 1362-1384.

Nigam, A., Gupta, D., y Sharma, A. (2014). Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. *Microbiological research*.

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., y Masuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of antibiotics* 30, 275-282.

Paget, M.S., Leibovitz, E., y Buttner, M.J. (1999). A putative two-component signal transduction system regulates *sigmaE*, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular microbiology* 33, 97-107.

Ramos, A., Lombó, F., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., y Salas, J.A. (2008). Biosynthesis of elloramycin in *Streptomyces olivaceus* requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster. *Microbiology* 154, 781-788.

Raveh, A., Delekta, P.C., Dobry, C.J., Peng, W., Schultz, P.J., Blakely, P.K., Tai, A.W., Matainaho, T., Irani, D.N., Sherman, D.H., y Miller, D.J. (2013). Discovery of potent broad spectrum antivirals derived from marine actinobacteria. *PloS one* 8, e82318.

Richardson, M.A., Kuhstoss, S., Solenberg, P., Schaus, N.A., y Rao, R.N. (1987). A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* 61, 231-241.

Rico, S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S. Krause, E., Díaz, M y Santamaría, RI. Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production. *PLOS ONE* (en revisión)

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.

Rodríguez, H., Rico, S., Diaz, M., y Santamaria, R.I. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial cell factories* 12, 127.

Rodríguez, L., Oelkers, C., Aguirrezabalaga, I., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., y Salas, J.A. (2000). Generation of hybrid elloramycin analogs by combinatorial biosynthesis using genes from anthracycline-type and macrolide biosynthetic pathways. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2, 271-276.

Rohr, J., y Zeeck, A. (1990). Structure-activity relationships of elloramycin and tetracenomycin C. *The Journal of antibiotics* 43, 1169-1178.

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.

Salas, A.P., Zhu, L., Sánchez, C., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., y Salas, J.A. (2005). Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase. *Molecular microbiology* 58, 17-27.

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*. *Molecular microbiology* 61, 1167-1186.

Sánchez, C., Zhu, L., Braña, A.F., Salas, A.P., Rohr, J., Méndez, C., y Salas, J.A. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 461-466.

Santamaría, J. (2013). Expresión heteróloga de rutas de antitumorales en *Streptomyces coelicolor*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Salamanca.

Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., y Hutchings, M.I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS microbiology reviews* 36, 862-876.

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.

- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., y Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 135, 397-402.
- Thompson, C.J., Fink, D., y Nguyen, L.D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome biology* 3, REVIEWS1020.
- Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y.G., Donadio, S., y Hutchinson, C.R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *Journal of bacteriology* 171, 5872-5881.
- Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W., y Lu, Y. (2009). Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS microbiology letters* 294, 150-156.
- Weber, W., Zahner, H., Siebers, J., Schroder, K., y Zeeck, A. (1979). [Metabolic products of microorganisms. Tetracenomycin C]. *Archives of microbiology* 121, 111-116.
- Wohlert, S.E., Blanco, G., Lombó, F., Fernández, E., Braña, A. F., Reich, S., Udvarnoki, G., Méndez, C., Decker, H., Frevert, J., Salas, J. A., Rohr, J. (1998). Novel Hybrid Tetracenomycins through Combinatorial Biosynthesis Using a Glycosyltransferase Encoded by the *elm* Genes in Cosmid 16F4 and Which Shows a Broad Sugar Substrate Specificity. *J. Adm. Chem. Soc* 120, 10596-10601.
- Yepes, A. (2006). Estudio de sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces*. Grado de 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.