



INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA  
(USAL/CSIC)

---

TESIS DOCTORAL

Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta  
positivo de la producción de antibióticos  
en *Streptomyces coelicolor*

Sergio Rico García

Salamanca, 2014



**Dra. Margarita Díaz Martínez**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **Dr. Ramón Santamaría Sánchez**, Científico Titular del CSIC

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta positivo de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor***”, presentada por D. Sergio Rico García para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (USAL/CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extienden el presente certificado en Salamanca, a    de marzo de 2014.

Fdo: Dra. Margarita Díaz Martínez

Dr. Ramón Santamaría Sánchez

---

**Dra. María Jesús Monte Río**, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “**Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta positivo de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor***”, presentada por D. Sergio Rico García para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Margarita Díaz Martínez y el Dr. Ramón Santamaría Sánchez en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (USAL/CSIC).

Y para que así conste, expide este certificado en Salamanca, a    de marzo de 2014.

Fdo. Dra. María Jesús Monte Río



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Antibióticos y metabolismo secundario	3
1.1. Conceptos generales	3
1.2. Organismos productores	3
2. El género <i>Streptomyces</i>	4
2.1. Características generales	4
2.2. Organización genómica	5
2.3. Ciclo de vida	6
2.4. Metabolismo secundario de <i>S. coelicolor</i>	8
3. Regulación de la producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i>	11
3.1. Último nivel de control: regulación específica y CSRs	11
3.2. Nivel de regulación superior: integración de señales y reguladores pleiotrópicos	13
3.2.1. Sistema AfsK/R/S	13
3.2.2. DasR	14
3.2.3. AtrA	15
3.2.4. Rok7B7	15
3.2.5. AdpA	16
3.2.6. BldD	16
3.2.7. Reguladores LAL	16
3.2.8. sIHF	17
3.2.9. Crp	17
3.2.10. Sistemas de dos componentes	17
4. Sistemas de dos componentes	18
4.1. Características generales	18
4.2. Arquitectura	19
4.3. Mecanismo de acción	22
4.4. Sistemas de dos componentes en <i>S. coelicolor</i>	24
5. Estrategias para la optimización de la producción y descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios y papel de los TCSs	29
5.1. Modificación de las condiciones de cultivo	29
5.2. Co-cultivo con otros organismos	30
5.3. Ingeniería de ribosomas	30
5.4. Moléculas de señalización y compuestos remodelantes de antibióticos	31
5.5. Expresión heteróloga	31
5.6. Manipulación genética de sistemas implicados en la transcripción génica	32
6. Antecedentes	33
6.1. Sistema AbrC1/C2/C3	34
6.2. AbrC1 y AbrC2, las histidina quinasas del TCS	35
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>

<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
1. Relevancia biológica de AbrC3 en la producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i>	45
1.1. Construcción de la cepa mutante <i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC3</i>	45
1.2. Estudio fenotípico de la cepa <i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC3</i>	48
1.3. Ensayos de complementación del mutante $\Delta$ <i>abrC3</i>	51
1.4. Efecto de la sobreexpresión de <i>abrC3</i>	52
1.5. Construcción de formas modificadas de <i>abrC3</i>	54
1.6. Estudio “in vivo” de la función de las HKs AbrC1 y AbrC2 en el TCS	56
2. Diferencias de expresión génica entre la cepa mutante $\Delta$ <i>abrC3</i> y la cepa parental M145	59
2.1. Condiciones del ensayo	59
2.2. Resultados de los <i>microarrays</i>	60
2.2.1. Genes subexpresados	61
2.2.2. Genes sobreexpresados	63
2.3. Validación de los resultados mediante PCR cuantitativa a tiempo real	64
3. Búsqueda de las dianas moleculares de AbrC3	67
3.1. Condiciones del estudio	67
3.2. Dianas moleculares de AbrC3	68
3.3. Validación de los resultados mediante ensayos de retardo en gel (EMSAs)	71
3.4. Identificación de la secuencia diana de AbrC3	73
3.4.1. Ensayos de protección frente a DNasa I	73
3.4.2. Identificación “in silico” de la secuencia diana de AbrC3	74
4. AbrC3 y la activación del metabolismo secundario	81
4.1. Sobreexpresión de <i>abrC3</i> en <i>S. lividans</i>	81
4.2. Efecto de la sobreexpresión de AbrC3 en otras especies de <i>Streptomyces</i>	82
5. Genes relacionados con el TCS AbrC1/C2/C3 y su implicación en la regulación de la producción de antibióticos	85
5.1. El RR huérfano Aor1 (SCO2281)	85
5.2. AbsR1, un regulador transcripcional implicado en la producción de antibióticos	86
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
1. AbrC3, un RR con efectos pleiotrópicos	92
2. Sistema AbrC1/C2/C3, un TCS atípico de <i>S. coelicolor</i>	97
3. AbrC3 como activador del metabolismo secundario	99
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>101</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>105</b>
1. Microorganismos utilizados	107
2. Vectores utilizados	107
3. Cepas de <i>Streptomyces</i> generadas	111
4. Medios de cultivo y aditivos	112

4.1. Medios de cultivo	112
4.1.1. Medios para <i>E. coli</i>	112
4.1.2. Medios para <i>Streptomyces</i>	112
4.2. Aditivos para medios de cultivo	113
5. Conservación de cepas y condiciones de cultivo	113
6. Manipulación y detección de ADN	114
6.1. Obtención de ADN genómico de <i>Streptomyces</i>	114
6.2. Aislamiento de ADN plasmídico y de cósmidos de <i>E. coli</i>	115
6.3. Técnicas básicas de ingeniería genética de ADN	115
6.4. PCR	115
6.5. Mutagénesis dirigida	116
6.6. PCR cuantitativa a tiempo real	117
6.7. Purificación de fragmentos de ADN	118
6.8. Electroforesis en geles de agarosa	118
6.9. Southern-blot	118
7. Introducción de ADN en microorganismos	120
7.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	120
7.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	120
7.3. Transformación de <i>Streptomyces</i>	120
7.4. Conjugación	120
8. Manipulación de proteínas	120
8.1. Expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i>	120
8.2. Electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	121
8.3. Detección de proteínas por Western-blot	122
8.4. Producción de anticuerpos policlonales	122
8.5. Ensayos de retardo en gel (EMSA)	124
8.6. Ensayos de protección frente a DNasa I	125
9. Estudio de las diferencias de expresión génica en la cepa $\Delta abrC3$ mediante <i>microarrays</i>	126
9.1. Aislamiento de ARN	126
9.2. Síntesis y marcaje de ADNc	126
9.3. Marcaje de ADNg	127
9.4. Hibridación, lavado y escaneado de los <i>microarrays</i>	127
9.5. Análisis estadístico	128
10. Ensayos de ChIP-chip	129
10.1. Obtención de cromatina	129
10.2. Inmunoprecipitación	130
10.3. Marcaje del ADN inmunoprecipitado	130
10.4. Hibridación, lavado y escaneado de los <i>microarrays</i>	131
10.5. Análisis estadístico	131
11. Análisis cromatográfico	132
12. Curvas de crecimiento	132
13. Análisis de la producción de antibióticos	132
13.1. Cuantificación en medio líquido	132

13.2. Ensayos en medio sólido	133
13.3. Bioensayo en medio sólido para la cuantificación de CDA	133
14. Bases de datos on-line	133
<b>ANEXOS</b>	<b>135</b>
1. Abreviaturas	137
2. Oligonucleótidos utilizados	138
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>141</b>



# Introducción |



# 1. ANTIBIÓTICOS Y METABOLISMO SECUNDARIO

## 1.1 CONCEPTOS GENERALES

Los **antibióticos** son compuestos de bajo peso molecular producidos generalmente por microorganismos capaces de inhibir el crecimiento o matar a otros microorganismos a bajas concentraciones, por su acción bacteriostática o bactericida respectivamente, por lo que son usados en medicina, ganadería y agricultura para combatir enfermedades infecciosas y son herramientas muy útiles también en investigación (Demain, 2014).

Estas moléculas pertenecen al **metabolismo secundario**, por lo tanto, no son esenciales para el crecimiento del organismo productor, sin embargo, le confieren ventajas ecológicas que en muchos casos aumentan su competitividad biológica (Diminic *et al.*, 2014). La mayoría son específicos de la cepa productora, presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas y suelen ser productos de complejas rutas biosintéticas. Su producción suele coincidir con el final de la fase de crecimiento exponencial y comienzo de la fase estacionaria debido a que pueden estar relacionados con procesos de diferenciación celular y/o porque sean compuestos tóxicos para el propio organismo productor en etapas tempranas del crecimiento al no tener activos los mecanismos de resistencia al metabolito.

Los genes implicados en la síntesis de un determinado metabolito secundario se encuentran agrupados físicamente formando **clusters** que generalmente incluyen varios operones. Con un tamaño que varía entre 15 y 100 Kb, en los *clusters* se encuentran codificados las enzimas biosintéticas, las proteínas implicadas en los mecanismos de transporte y de resistencia y los reguladores transcripcionales necesarios para el control de la producción (Bibb y Hesketh, 2009).

## 1.2. ORGANISMOS PRODUCTORES

Muchos seres vivos son capaces de producir compuestos tóxicos para combatir infecciones microbianas como los invertebrados, las algas y las plantas superiores. Sin embargo, los antibióticos usados en clínica son producidos por dos grandes grupos de microorganismos: los hongos y las bacterias (Demain, 2014). Sólo una decena de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones son sintetizados por hongos, entre los que cabe destacar los  $\beta$ -lactámicos, producidos por los géneros *Penicillium* y

*Aspergillus* y las cefalosporinas por *Cephalosporium*. La gran mayoría de antibióticos son sintetizados por bacterias como *Bacillus*, productor de bacitracina y polimixina B, *Nocardia* de rifamicina, *Micromonospora* de gentamicina (aminoglucósido), etc. Pero hay un grupo de bacterias único debido al gran número de antibióticos producido por él y la diversidad de estructuras químicas con distintos modos de acción: las especies del género *Streptomyces*.

## **2. EL GÉNERO *Streptomyces***

### **2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

Los microorganismos del género *Streptomyces* pertenecen al orden de los Actinomycetales y con más de 500 especies descritas constituyen uno de los grupos de bacterias más numeroso y diverso (<http://www.bergeys.org/>). Engloba bacterias Gram positivas, miceliares y fundamentalmente aerobias, aunque también se ha descrito su crecimiento en determinadas condiciones anaerobias (van Keulen *et al.*, 2003). Poseen un cromosoma lineal, con alto contenido en G+C (hasta el 75 %) y de gran tamaño, superando las 8 Mb, y su ciclo de vida es complejo ya que conlleva diferenciación morfológica.

Son bacterias saprófitas cuyo hábitat natural es el suelo, sin embargo, en la actualidad se está llevando a cabo una gran búsqueda de nuevas especies de *Streptomyces* en nuevos nichos como el medio marino (Raveh *et al.*, 2013) o en simbiosis junto a plantas, insectos o invertebrados marinos (Seipke *et al.*, 2012). Descomponen restos orgánicos, principalmente vegetales, debido a su capacidad para producir una amplia gama de enzimas hidrolíticas extracelulares (Hodgson, 2000). Este hecho hace que el género *Streptomyces* juegue un importante papel en los ciclos biogeoquímicos y que algunas de estas enzimas tengan aplicación en la industria.

Otra característica importante es su gran capacidad para producir metabolitos secundarios, alguno de ellos con actividad antitumoral, antifúngica, antibiótica, inmunosupresora etc., por lo que muchos son muy valiosos en medicina, veterinaria y agricultura (Thompson *et al.*, 2002; Challis y Hopwood, 2003).

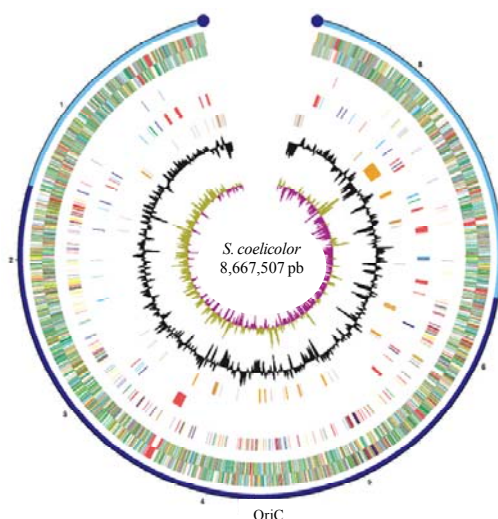
## 2.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma de *Streptomyces* es especialmente grande, con un tamaño que varía entre 8 y 9 Mb dependiendo de las especies, dobla al de otros microorganismos como *Escherichia coli* (Smith *et al.*, 1987) o *B. subtilis* (Young, 1974) que está en torno a los 4 Mb. Este mayor tamaño no es debido a un incremento en longitud de los genes sino que codifica un mayor número de ellos, hecho que refleja su capacidad de respuesta a los constantes cambios del medio en el que habita y la gran variedad de metabolitos secundarios que es capaz de producir. Su composición química también es característica al poseer un elevado contenido en guaninas y citosinas (G+C) que está entre el 70 y el 74 %.

El cromosoma es lineal y en sus extremos presenta secuencias cortas repetidas e invertidas (TIRs) capaces de formar estructuras secundarias. En los extremos 5' se unen covalentemente proteínas terminales (TPs) que juegan un papel esencial en la replicación del ADN y en la protección de estas regiones del cromosoma (Bao y Cohen, 2001).

La especie genéticamente mejor conocida es *S. coelicolor* dado que su genoma fue el primero en ser secuenciado completamente ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) (Bentley *et al.*, 2002). Posee un cromosoma de 8,7 Mb en el que se han identificado 7.825 genes y posee un único origen de replicación (OriC) localizado en la región central.

En el cromosoma se diferencian dos regiones (Figura I.1). La central o “core” tiene un tamaño de 4,9 Mb, está altamente conservada y en ella se encuentran codificados la mayoría de los genes implicados en procesos esenciales como división celular, replicación del ADN, transcripción, traducción y metabolismo primario. El “core” está flanqueado por dos brazos, el izquierdo de 1,5 Mb y de 2,3 Mb el derecho, que codifican genes no esenciales del metabolismo secundario y enzimas hidrolíticas (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Además, la cepa secuenciada, *S. coelicolor* A3(2), porta tres plásmidos: SCP1 (lineal de 350 Kb), SCP2 (30 Kb) y SLP1 integrado en el cromosoma (Kieser, 2000).



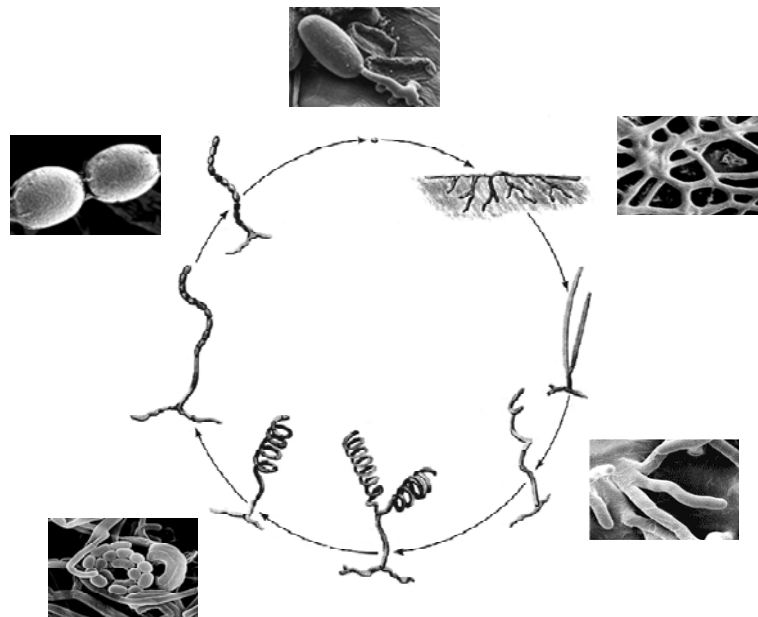
**Figura I.1.** Representación del cromosoma de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002). Los dos círculos azules representan las TPs, el “core” en azul oscuro, los brazos del cromosoma en azul claro y el origen de replicación (OriC).

Actualmente, una veintena de especies se encuentran secuenciadas ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces\\_group/GenomesIndex.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces_group/GenomesIndex.html)) y al comparar el genoma de *S. coelicolor* con el de otras especies como *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) o *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008) se observa un alto grado de sintenia en la región central del cromosoma mientras que los brazos no son tan similares. Este hecho se debe a la gran inestabilidad del cromosoma lineal, que en ausencia de presión selectiva sufre frecuentes pérdidas de cientos de kilobases en las regiones laterales y extensas amplificaciones en torno a las secuencias desaparecidas. Estos reordenamientos del genoma conducen a la diversidad metabólica existente entre las distintas especies de *Streptomyces*.

### 2.3. CICLO DE VIDA

El ciclo de desarrollo de *Streptomyces* es un proceso complejo que implica diferenciación morfológica y ha sido ampliamente estudiado en medio sólido ya que la mayoría de las especies son incapaces de esporular en medio líquido. Las estructuras diferenciadas que se han descrito a lo largo del ciclo son: el **micelio sustrato**, producto de la fase vegetativa, y el **micelio aéreo** o reproductivo que culminará el desarrollo con la formación de **esporas** (Figura I.2).

Característico de este género es que son microorganismos sincitiales, es decir, cada compartimento celular presenta más de una copia del genoma siendo únicamente unicelulares en la fase de spora según el ciclo tradicional (Chater y Losick, 1997).

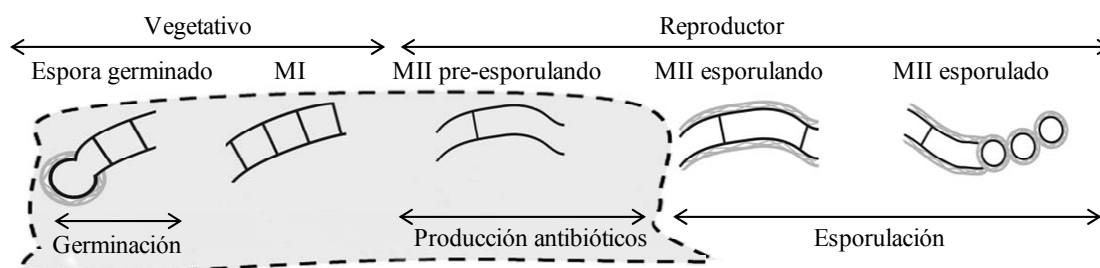


**Figura I.2.** Ciclo de vida de *Streptomyces*. Modificado de Chater y Losick, 1997.

Cuando las condiciones del medio son favorables la espora germina y a partir de ella se origina el micelio sustrato que está formado por un entramado de hifas ramificadas donde los septos son escasos y delimitan compartimentos que contienen varias copias del genoma (Waksman, 1967). El crecimiento vegetativo se detiene cuando los nutrientes del medio se agotan y a partir de este micelio sustrato comienzan a originarse hifas menos ramificadas que se elevan sobre la colonia formando el micelio aéreo. Este desarrollo se lleva a cabo, al menos en parte, a expensas de los nutrientes provenientes de la lisis del micelio sustrato (Méndez *et al.*, 1985). En un determinado momento, las hifas aéreas detienen su crecimiento y comienzan a fragmentarse transversalmente, transformándose en largas hileras de esporas hidrofóbicas unigenómicas que tras sufrir un proceso de maduración se dispersan al medio para colonizar nuevos nichos.

En los últimos años se ha descrito un nuevo modelo de ciclo de vida de *Streptomyces* más detallado basado en técnicas de microscopía confocal, tinciones de viabilidad y marcadores bioquímicos de crecimiento, diferenciación y muerte celular (Manteca *et al.*, 2005) (Figura I.3). Este modelo describe que tras la germinación de la espora se forma un **micelio primario (MI)** compartimentalizado que sufre un proceso temprano de muerte celular programada dando lugar a hifas en las que se alternan segmentos vivos y muertos. A partir de los segmentos viables de MI se forman hifas multinucleadas que dan lugar al **micelio secundario (MII)** que carece de cubierta

hidrofóbica (micelio sustrato), y en el que se produce la síntesis de metabolitos secundarios (Manteca *et al.*, 2007). En un determinado momento, las hifas de MII comienzan a formar la cubierta hidrofóbica (micelio aéreo) iniciándose el proceso de esporulación que culmina con la formación y liberación de las esporas.



**Figura I.3.** Ciclo de vida de *Streptomyces* descrito por Manteca y Sanchez, 2009.

Según este modelo, la fase vegetativa del ciclo corresponde solamente al MI compartimentalizado (primeras etapas del micelio sustrato), y el MII, ya sea temprano (micelio sustrato) o tardío (micelio aéreo), a la fase reproductora (Manteca y Sánchez, 2009).

#### 2.4. METABOLISMO SECUNDARIO DE *S. coelicolor*

Las bacterias del género *Streptomyces* producen una gran variedad de metabolitos secundarios y algunos de ellos tienen gran interés por su aplicación en industria o clínica. De gran importancia son los metabolitos con actividad antibiótica, de hecho, *Streptomyces* produce más del 50 % de los antibióticos naturales disponibles actualmente. Ejemplos de metabolitos producidos por *Streptomyces* son la daptomicina (antibacteriano), la anfotericina B (antifúngico), la doxorubicina (anticancerígeno), la avermectina B1a (insecticida) o la fosfotricina (herbicida) (Challis, 2014).

Este trabajo se ha realizado en la especie *S. coelicolor* y el análisis de la secuencia de su genoma ha identificado al menos 23 *clusters* de genes relacionados con el metabolismo secundario (aproximadamente el 4,5 % del genoma). Tres de ellos codifican las proteínas implicadas en la biosíntesis de los antibióticos **actinorrodina (ACT)**, **undecilprodiginina (RED)** y **antibiótico dependiente de Calcio (CDA)** (Bentley *et al.*, 2002), antibióticos cuya producción es conocida en *S. coelicolor* A3(2) (Figura I.4). Además, produce otros dos antibióticos: el **poliquétido críptico amarillo (yCPK)**, cuya caracterización está siendo llevada a cabo actualmente (Gottelt *et al.*, 2010) y la



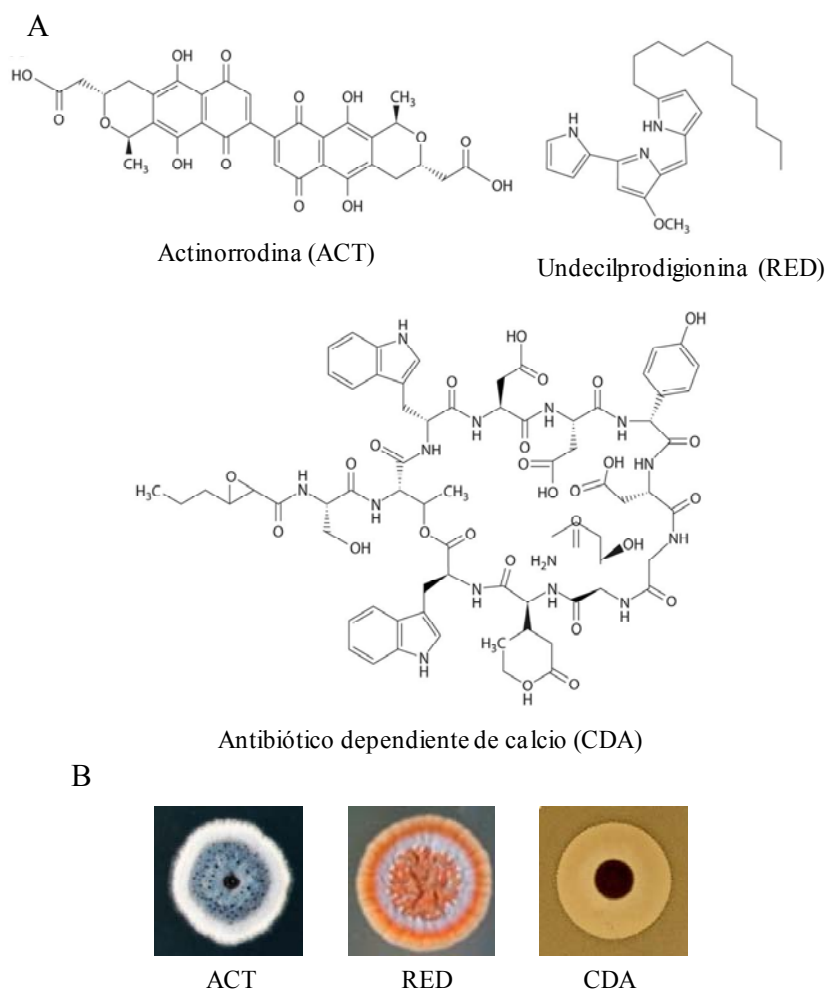
**metilenomicina**, cuyos genes biosintéticos se encuentran en el plásmido SCP1, pero la cepa parental con la que se ha llevado el estudio (*S. coelicolor* M145) carece de este plásmido por lo que no hay producción del antibiótico. El resto de *clusters* puede que no se expresen en las condiciones de estudio o que los metabolitos secundarios resultantes no hayan sido detectados hasta el momento.

Químicamente, ACT es una benzoisocromanoquinona pigmentada que sirve como indicador de pH ya que es azul en medio básico y rojo en medio ácido. Su *cluster* biosintético contiene 22 genes organizados en cinco unidades transcripcionales y la ruta de síntesis se basa en reacciones tipo poliquétido sintasa tipo II (Okamoto *et al.*, 2009). Por su similitud estructural con los antibióticos kalafungina y nanomicina podría ser un agente alquilante biorreductor (Tahlan *et al.*, 2007).

RED es un pigmento rojo con estructura de tripirrol hidrofóbico que es sintetizada por una ruta en la que participan enzimas de tipo ácido graso sintasa y su *cluster* biosintético consta de 22 genes (Mo *et al.*, 2008). Pertenece al grupo de las prodigininas, moléculas con gran interés por su acción anticancerígena e inmunosupresora (Ho *et al.*, 2007).

CDA es un lipopéptido incoloro en cuya síntesis intervienen sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y su *cluster* está formado por 48 genes (Hojati *et al.*, 2002). Forma un ionóforo dependiente de calcio modificando la membrana plasmática de otros microorganismos (Lakey *et al.*, 1983).

Hasta la fecha se desconoce la estructura detallada de yCPK, así como su modo de acción.



**Figura I.4.** A) Estructura química de los antibióticos producidos por *S. coelicolor* M145. B) Colonias productoras de los correspondientes antibióticos: ACT - colonias azules, RED - colonias rojas, CDA - detección por bioensayo frente a *B. subtilis*.

Estos antibióticos son efectivos frente a bacterias Gram positivas pero no tienen aplicación en clínica. Sin embargo, la pigmentación conferida a las cepas productoras por ACT y RED ha hecho de *S. coelicolor* un modelo para estudios genéticos sobre biosíntesis de antibióticos ya que la alteración de la producción de estos compuestos mediante la obtención de mutantes o sobreexpresión de genes es fácilmente observable por cambios en el color permitiendo ahondar en el estudio de la biosíntesis de antibióticos y su regulación.

### 3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN *S. coelicolor*

La síntesis de antibióticos es un proceso estrictamente regulado, y aunque también existen mecanismos traduccionales y postraduccionales, la regulación transcripcional es el principal punto de control.

Esta regulación está formada por varios sistemas que actúan de manera jerárquica existiendo factores transcripcionales que actúan a un nivel superior controlando la expresión de otros reguladores inferiores. Sin embargo, varios factores de transcripción pueden actuar de manera conjunta independientemente del nivel al que pertenezcan, por lo que esta jerarquía no es total sino que la regulación de la producción de antibióticos se compone de diversas redes de transducción de señales muy complejas y conectadas entre sí a diferentes niveles (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003).

#### 3.1. ÚLTIMO NIVEL DE CONTROL: REGULACIÓN ESPECÍFICA Y CSRs

La regulación más directa es ejercida por los **Reguladores Situados en los Clusters biosintéticos (CSRs, Cluster-Situated Regulators)**, también denominados reguladores específicos de ruta (Huang *et al.*, 2005). Son el último nivel de control en las redes de transducción de señales y la mayoría de ellos actúan como activadores transcripcionales promoviendo, principalmente, la transcripción de los genes biosintéticos de su propio *cluster*, aunque también pueden regular la expresión de genes no situados en él (Iqbal *et al.*, 2012).

Todos los reguladores de este tipo descritos en *S. coelicolor* pertenecen a la familia **SARP (Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins)** (Wietzorrek y Bibb, 1997), reguladores específicos de *Streptomyces* implicados en el control de la producción de antibióticos. Se caracterizan por poseer en su extremo C-terminal el dominio de activación transcripcional y en su extremo N-terminal un motivo de unión a ADN tipo hélice-giro-hélice (HTH) que reconoce motivos repetidos espaciados por 11 nucleótidos que suelen coincidir con la región -35 de la zona promotora (Bibb, 2005).

En el *cluster* implicado en la síntesis de ACT se encuentra codificado el CSR **ActII-ORF4** (Fernández-Moreno *et al.*, 1991). Se trata de un SARP que reconoce repeticiones de la secuencia TCGA que aparece en cinco de los promotores del *cluster* (Wietzorrek y Bibb, 1997). La mayoría de la información recogida por las células que afecta a la

producción de ACT es transmitida vía ActII-ORF4, por lo que su gen codificante se encuentra sometido a un diverso y exhaustivo control transcripcional por parte de más de una docena de proteínas reguladoras que responden a gran variedad de estímulos. Entre estas proteínas se encuentran AdpA (Lee *et al.*, 2013), LexA (Iqbal *et al.*, 2012), AbsA2 (McKenzie y Nodwell, 2007), DasR (Rigali *et al.*, 2008), DraR (Yu *et al.*, 2012), AfsQ1 (Wang *et al.*, 2013), AtrA (Uguru *et al.*, 2005), Crp (Gao *et al.*, 2012), ROK7B7 (Swiatek *et al.*, 2013), GlnR (Wang *et al.*, 2013), SCO0310, SCO3932, SCO5405 (Park *et al.*, 2009), los reguladores LAL SCO0877 y SCO7173 (Guerra *et al.*, 2012), el factor  $\sigma$  SigT (Feng *et al.*, 2011). Además el transcrito de *actII-ORF4* presenta el codón raro para leucina UUA cuya traducción es dependiente del ARNt codificado por *bldA*, gen implicado en el desarrollo del ciclo celular, relacionando la producción de ACT con la diferenciación morfológica (Fernández-Moreno *et al.*, 1991).

La síntesis de RED está regulada por dos CSRs: el primero, **RedZ**, que activa la expresión del segundo, **RedD**, el **Regulador Final de la Producción de Antibióticos o URAP** (*Ultimate Regulator of Antibiotic Production*) (White y Bibb, 1997). RedZ es un regulador de respuesta atípico y huérfano de un sistema de dos componentes (explicado posteriormente) ya que carece de su histidina quinasa asociada en el genoma y en su estructura no existen los residuos conservados necesarios para su fosforilación (Guthrie *et al.*, 1998). Por lo tanto, y a diferencia de la mayoría de los reguladores de respuesta, su actividad se regula por el producto final de la ruta, la undecilprodiginina, que al unirse a RedZ disminuye su afinidad por la región promotora de *redD*. La transcripción de *redZ*, al igual que la de *actII-ORF4*, está regulada por AbsA2 (McKenzie y Nodwell, 2007), DasR (Rigali *et al.*, 2008), AfsQ1 (Wang *et al.*, 2013) y además contiene el codón UUA (Guthrie *et al.*, 1998). El segundo CSR es RedD, un SARP que activa directamente la expresión de los genes biosintéticos de su *cluster*. Se une a repeticiones de la secuencia TCAG separadas por 11 nucleótidos presentes en la zona promotora del largo operón biosintético del *cluster* que comienza en *redP* (Iqbal *et al.*, 2012).

El CSR implicado en la activación de la producción de CDA es **CdaR** (Ryding *et al.*, 2002) cuyo gen, *cdaR*, se encuentra regulado directamente por AbsA2 (McKenzie y Nodwell, 2007) y AfsQ1 (Wang *et al.*, 2013).

En la regulación de la producción de  $\gamma$ CPK, el CSR del *cluster* es **CpkO** (Takano *et al.*, 2005). La expresión de este regulador es reprimida por ScbR (receptor de butirolactonas), el cual se encuentra unido a su promotor hasta que intervienen las gamma-butirolactonas (SCBs), moléculas de señalización que se acumulan en el citoplasma y liberan a ScbR del promotor de *cpkO*, y por lo tanto activando la producción de  $\gamma$ CPK (Gottelt *et al.*, 2010).

### 3.2. NIVEL DE REGULACIÓN SUPERIOR: INTEGRACIÓN DE SEÑALES Y REGULADORES PLEIOTRÓPICOS

Los **reguladores pleiotrópicos o globales** son factores transcripcionales que intervienen en el control de varios procesos celulares pudiendo regular la producción de más de un antibiótico, diferenciación morfológica, respuestas a estrés, etc., y en algunos casos proporcionan un nexo de control entre el metabolismo primario, secundario y desarrollo del ciclo celular. Estos sistemas son los encargados de integrar la información nutricional y medioambiental para que las células lleven a cabo la respuesta adecuada en cada situación (Martín y Liras, 2010). Además, existe una regulación cruzada entre ellos generando una compleja red de regulación transcripcional.

Los genes que codifican estos reguladores suelen encontrarse fuera de los *clusters* biosintéticos y su estructura es más variable que en el caso de los CSRs.

A continuación se describen diferentes sistemas de regulación pleiotrópica implicados en la producción de antibióticos descritos en *Streptomyces* y que responden a señales muy diversas.

#### 3.2.1. Sistema AfsK/R/S

Este sistema está formado por tres proteínas: la serina/treonina quinasa AfsK, el regulador transcripcional, AfsR y la proteína tipo sigma AfsS. La quinasa **AfsK** se sitúa en la cara interna de la membrana plasmática y su actividad se encuentra inhibida por la unión de la proteína KbpA. Ensayos de resonancia magnética nuclear sugirieron que AfsK se une a S-adenosilmetionina provocando cambios en su conformación que le permiten liberarse de KbpA y autofosforilarse en el residuo específico de treonina 168 recuperando su actividad quinasa (Tomono *et al.*, 2006). Entre las proteínas fosforiladas por AfsK se encuentra **AfsR**, un regulador transcripcional que activa la producción de antibióticos de forma indirecta y modula la respuesta frente a diferentes tipos de estrés

nutricional. En la estructura de AfsR se distinguen tres dominios característicos: un tipo SARP N-terminal de unión a ADN, otro tipo NB-ARC ATPasa central y repeticiones de tetratricopéptidos en su extremo C-terminal implicadas en interacciones proteína-proteína. La fosforilación de AfsR hace que aumente su capacidad de unión al ADN y su actividad ATPasa, así, recluta la ARN polimerasa formando un complejo gracias a la energía liberada de la hidrólisis de ATP por parte de su dominio NB-ARC ATPasa y este complejo activa la transcripción del gen *afsS*, que se encuentra adyacente a *afsR*, uniéndose a su promotor entre las posiciones -35 y -10 (Lee *et al.*, 2002). **AfsS** es una proteína pequeña tipo sigma que presumiblemente actúa junto a diferentes factores  $\sigma$  en función de las respuestas requeridas modulando así el control de la transcripción ejercido por AfsR y que activa la expresión de genes que codifican CSRs como *actII-ORF4* y *redD*, aunque se desconoce si lo hace de forma directa o indirecta (Lian *et al.*, 2008).

También se ha observado que AfsK fosforila a DivIVA, proteína clave en el crecimiento polarizado de nuevas hifas por lo que este sistema tiene efectos pleiotrópicos sobre producción de antibióticos, estrés nutricional y desarrollo morfológico (Hempel *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de AfsR y AfsS en *S. coelicolor* provoca un aumento en la producción de ACT y RED, en *S. lividans* hace que produzca estos antibióticos cuyos *clusters* se encuentran silenciados en las condiciones más comunes de cultivo y en *S. griseus* también estimula la síntesis de metabolitos secundarios (van Wezel y McDowall, 2011).

### 3.2.2. DasR

DasR es un regulador pleiotrópico de la familia GntR que responde a los niveles de N-acetilglucosamina (GlcNAc), que actúa como molécula de señalización en situaciones de estrés nutricional (Nazari *et al.*, 2013). GlcNAc es uno de los componentes principales del peptidoglicano y también es el monómero de la quitina, por lo tanto es abundante en la pared celular de *Streptomyces* y en el suelo, medio en el que vive habitualmente. DasR es un factor de transcripción que en condiciones de abundancia de nutrientes permanece unido a las regiones promotoras de los genes *actII-ORF4* y *redZ*, de genes del metabolismo de la GlcNAc como *nagA*, *nagB* y *nagK* o de los codificantes del transportador PTS de GlcNAc reprimiendo su expresión. De este modo, DasR bloquea la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos ya que hay

nutrientes disponibles para continuar el crecimiento. Sin embargo, cuando los nutrientes escasean, se desencadena una serie de procesos que concluyen con la degradación de la pared de una parte de la población celular y la liberación de monómeros de GlcNAc, que es introducida al interior celular y fosforilada por el sistema de transporte PTS. Tras una desacetilación en el citoplasma se forma GlcN-6-P, otra molécula de señalización que en estas situaciones de estrés nutricional se une a DasR liberando su unión de los promotores que estaba reprimiendo y por lo tanto activando la expresión de estos genes y la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica (Rigali *et al.*, 2008).

### 3.2.3. AtrA

Es un regulador transcripcional de la familia TetR identificado por ser capaz de unirse al promotor de *actII-ORF4* “in vitro” y su delección provoca una marcada disminución de la producción de ACT bajo ciertas condiciones de crecimiento (Uguru *et al.*, 2005). También participa en la biosíntesis de la pared celular y el metabolismo del glicerol. El gen *atrA* está regulado por el sistema de dos componentes PhoP/R, conectando la síntesis de ACT con la disponibilidad de fosfato (Allenby *et al.*, 2012), y además AtrA activa directamente la expresión de *nagE2*, una permeasa de N-acetilglucosamina cuya expresión es reprimida por DasR (Nothhaft *et al.*, 2010). Su ortólogo en *S. griseus*, AtrA-g, activa directamente la expresión de *srtR*, el SARP del *cluster* de la estreptomicina, incrementando su producción en determinados medios de cultivo (Hirano *et al.*, 2008).

### 3.2.4. Rok7B7

Este regulador pleiotrópico perteneciente a la familia ROK (*Regulators, ORFs and Kinases*) es un activador directo de la producción de antibióticos ya que se une a los promotores de los genes *actII-ORF4* y *redD*, y además, al igual que AtrA, activa la expresión de *nagE2*. Está implicado en la Represión Catabólica por Carbono (CCR) inhibiendo la expresión del operón adyacente de xilosa *xyl-IFGH*, así, la cepa mutante carente de *rok7B7* muestra una mayor utilización de xilosa en presencia de glucosa lo que hace que prolongue su fase de crecimiento exponencial y retrase la entrada en fase estacionaria (Swiatek *et al.*, 2013).

### 3.2.5. AdpA

Este regulador transcripcional está presente en todos los estreptomicetos y las cepas mutantes carentes de él presentan deficiencias en la formación del micelio aéreo y en la producción de metabolitos secundarios en determinados medios de cultivo. Pertenecen a la familia AraC/XylS, caracterizados por poseer en su extremo C-terminal dos motivos HTH de unión a ADN y además en la zona N-terminal presenta un dominio GATasa-1, probablemente implicado en el reconocimiento de moléculas de señalización (Yao *et al.*, 2012). La expresión de *adpA* en *S. coelicolor* es reprimida por la unión a su promotor de SlbR y en *S. griseus* por ArpA, ambos receptores de butirolactonas. Estas interacciones son liberadas por la unión de SCBs y Factor-A respectivamente a sus receptores y en *S. coelicolor* su propio producto, AdpA, y el regulador pleiotrópico BldD también reprimen la expresión. También se han encontrado secuencias de reconocimiento de AdpA en el promotor de *actII-ORF4*, regulando directamente la producción de ACT (Lee *et al.*, 2013).

### 3.2.6. BldD

Los mutantes carentes de los genes *bld* presentan un bloqueo en las primeras etapas del desarrollo morfológico y son incapaces de formar hifas de micelio aéreo. Entre estos genes se encuentra *bldD*, cuyo mutante nulo muestra, además del desarrollo aberrante, una disminución en la producción de ACT, RED y CDA. Es un activador indirecto de la síntesis de antibióticos y entre sus dianas se encuentran el gen *adpA*, los genes *nsdA* y *cvn9*, ambos implicados en la represión de la producción de antibióticos y diferenciación o *leuB* y *leuC* que participan en la síntesis de aminoácidos ramificados necesarios para la síntesis de ACT (den Hengst *et al.*, 2010).

### 3.2.7. Reguladores LAL

En el genoma de *S. coelicolor* se han identificado 23 reguladores LAL (*Large ATP-binding regulators of the Lux family*) caracterizados por su gran tamaño y por poseer un dominio de unión a ATP/GTP en su extremo N-terminal y otro de unión a ADN tipo HTH de la familia LuxR en el extremo C-terminal. Ninguno de ellos corresponde a CSRs en *S. coelicolor* pero sí en otras especies como NysRI y NysRIII de *S. noursei* que regulan la producción de nistatina (Sekurova *et al.*, 2004) o PikD de *S. venezuelae* que controla la síntesis de picromicina (Wilson *et al.*, 2001). En el caso de *S. coelicolor*, la delección de dos de ellos, *SCO0877* y *SCO7173*, provoca una disminución en la



producción de ACT debido a una menor expresión de *actII-ORF4* y *afsS* en los dos mutantes (Guerra *et al.*, 2012). Además varios genes implicados en la respuesta a la escasez de fosfato se encuentran sobreexpresados en ambas cepas ya que ambos reguladores actúa como represores de la expresión del sistema de dos componentes *phoP/R*.

### 3.2.8. sIHF

Los factores de integración en el huésped (sIHF, *Streptomyces Integration Host Factors*) juegan un papel fundamental en *Streptomyces* en los procesos de replicación, transcripción, recombinación, organización del genoma, etc., que se traduce en un control de diversos procesos celulares como producción de antibióticos o desarrollo morfológico (Swiercz *et al.*, 2013). En el genoma de *S. coelicolor* se han identificado tres sIHFs, entre ellos el SCO1480. La cepa mutante carente de este factor presenta una menor síntesis de ACT, RED en determinadas condiciones de cultivo debido a que sIHF regula de manera directa la expresión de *actII-ORF4*, *redD* y *redZ*. También se ha detectado unión de sIHF al promotor divergente de los genes *pyrR* y *bldD*, pudiendo controlar la síntesis de pirimidinas y diferenciación morfológica (Yang *et al.*, 2012).

### 3.2.9. Crp

La proteína receptora de AMP cíclico (Crp, *cAMP Receptor Protein*) está implicada en el control del desarrollo morfológico, metabolismo primario y secundario. Se trata de un activador de la síntesis de antibióticos y mediante tecnología ChIP-chip se ha determinado que activa de manera directa la expresión de los CSRs *actII-ORF4*, *redZ* y *cdaR*, y también se une a zonas promotoras de genes biosintéticos del *cluster* de yCPK. Así, la cepa carente de *crp* muestra una menor producción de estos antibióticos y el tamaño de colonias y la germinación de las esporas también se encuentran afectadas (Gao *et al.*, 2012).

### 3.2.10. Sistemas de Dos Componentes

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la regulación de la producción de antibióticos ejercida por estos sistemas en *S. coelicolor*. Por esta razón, en el siguiente apartado se detalla lo que se conoce hasta la fecha de estos sistemas en *Streptomyces* y más concretamente en *S. coelicolor* (Rodríguez *et al.*, 2013).

## 4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

### 4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las bacterias reconocen gran variedad de estímulos ambientales y fisiológicos, integran la información y elaboran una respuesta rápida y adecuada frente a estos cambios, siendo los **Sistemas de Dos Componentes (TCSs, *Two-Component Systems*)** las principales rutas de transducción de señales.

Además de en bacterias, estos sistemas se han identificado en arqueas (Kim y Forst, 2001) y eucariotas como hongos, protozoos y plantas aunque en menor número (Thomason y Kay, 2000; Urao *et al.*, 2000) ya que las mayoritarias vías de señalización en organismos superiores se llevan a cabo a través de Ser/Thr/Tyr quinasas. Sin embargo, no se han identificado TCSs en los genomas animales ya secuenciados por lo que se considera que estos sistemas no están presentes en el reino animal (Wolanin *et al.*, 2002).

El TCS típico está formado por una proteína sensora denominada **Histidina Quinasa (HK, *Histidine Kinase*)**, y un **Regulador de Respuesta (RR)** que actúan en conjunto. Los genes que codifican estas dos proteínas se encuentran adyacentes en el genoma formando una única unidad transcripcional, pero en determinados casos la HK o el RR carece de pareja contigua denominándose **huérfanos**. El número medio de TCSs presentes en un genoma bacteriano es de 29 (Szurmant y Hoch, 2010) aunque puede llegar hasta los 72 como en *Myxococcus xanthus* (Shi, 2008) o carecer de ellos como en bacterias patógenas en cuyo nicho las condiciones ambientales se mantienen constantes (Wuichet *et al.*, 2010).

Como se ha comentado, el genoma de *M. xanthus* codifica más de 70 TCSs, sin embargo, sólo el 29 % de ellos corresponden a sistemas típicos en los que la HK y RR forman un operón. El 16 % se encuentran en *clusters* formando unidades transcripcionales mayores y el 55 % son HKs o RRs huérfanos (Shi, 2008). Se han llevado a cabo pocos estudios de genes huérfanos, pero debido a su alto número, se cree que proporcionan un beneficio a los microorganismos al ampliar el número de estímulos a los que pueden responder a través de una regulación cruzada entre HKs y RRs huérfanos y emparejados (Wang *et al.*, 2009b).

En los últimos años, la secuenciación masiva de genomas microbianos ha permitido identificar en aproximadamente 9.000 especies bacterianas más de 125.000 genes pertenecientes a TCSs que se encuentran recogidos en la base de datos P2CS (Prokaryotic 2-Component Systems: <http://www.p2cs.org>). El alto número de genes identificados y su ubicuidad (presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas) indican la gran importancia de estos sistemas que están implicados en múltiples procesos celulares como motilidad (Joslin y Hendrixson, 2009), división celular (Carballès *et al.*, 1999), comunicación intercelular (Neiditch *et al.*, 2006), formación de biofilm (Cairns *et al.*, 2013), virulencia de patógenos (Beier y Gross, 2006) o resistencia a antibióticos (Hutchings *et al.*, 2006).

## 4.2. ARQUITECTURA

Generalmente, las **histidina quinasa** son proteínas de membrana con un tamaño entre 40 y 110 kDa que actúan como homodímeros. Están formadas por una región sensora orientada hacia el exterior de la membrana plasmática y otra región con actividad quinasa en el citoplasma y ambas se encuentran conectadas por segmentos transmembrana (Attwood, 2013).

La región citoplasmática de la HK corresponde a la zona carboxilo terminal de la proteína y en ella se distinguen los dominios catalítico o de unión a ATP (**CA**) y de dimerización y fosfotransferencia (**DHp**) (Gao y Stock, 2009). En el dominio DHp se encuentra el residuo de histidina clave en la activación de la HK localizado en el motivo *H Box* y además es responsable de la dimerización de los monómeros de HK. El dominio CA está conservado y cataliza la reacción de transferencia de fosfato desde ATP o GTP al residuo de His (Scaramozzino *et al.*, 2009), la transferencia de este grupo a un residuo conservado de Asp del regulador, y la desfosforilación del RR (Figura I.5).



**Figura I.5.** Representación esquemática de un monómero de histidina quinasa prototipo.

La región amino terminal corresponde al dominio sensor de la proteína encargada de detectar los diferentes estímulos y dado que las bacterias son capaces de responder ante multitud de señales, es la región más variable en secuencia.

En el modelo básico de HK, el dominio sensor se encuentra orientado hacia el exterior de la membrana plasmática flanqueado por dos segmentos transmembrana (**TM**) y responde a estímulos extracelulares como nutrientes o solutos. Dentro de este grupo se han identificado dominios pertenecientes a las familias PBPp, CACHE y CHASE (Gao y Stock, 2009). Sin embargo, existen HK con múltiples segmentos TM (de 2 a 20) que carecen de dominio extracelular y detectan estímulos asociados a la membrana como integridad celular o gradiente de iones a través de ella. Además existen HKs cuyos dominios sensores se encuentran en el citoplasma o son proteínas solubles que detectan estímulos intracelulares y/o interacciones proteína-proteína. El 33 % de las HKs tienen dominios de este tipo pertenecientes a la familia PAS y el 9 % de la familia GAF, ambos se unen a pequeños ligandos detectando cambios en O<sub>2</sub>, potencial redox o estado energético de la célula (Capra y Laub, 2012). Además, se ha identificado un tercer grupo perteneciente a la familia HAMP en el 31 % de las HKs estudiadas (Szurmant *et al.*, 2007).

Algunas HKs combinan diferentes tipos de dominios sensores lo que permite integrar varios estímulos, extracelulares y/o intracelulares, generando una respuesta más compleja frente a los cambios ambientales y fisiológicos (Moglich *et al.*, 2010).

Existen variaciones del modelo básico de HK, por ejemplo, del 5 % analizadas, las actividades del dominio DHP se encuentran en regiones separadas formando los dominios histidina fosfotransferasa (**HPT**) y de dimerización. Además, cerca del 25 % de las HKs incorporan en su extremo carboxilo terminal un dominio receptor (**REC**) de un RR formando quinasas híbridas (**HyHK**). Con estos mecanismos se elaboran cascadas más complejas de fosfotransferencia His-Asp-His-Asp, denominadas *phosphorelays*, permitiendo ejercer un control más sofisticado sobre la ruta de transducción de señales (West y Stock, 2001). Por ejemplo, el sistema Esp de *M. xanthus* regula de forma negativa la progresión del ciclo celular y está compuesto por varias proteínas como las HyHKs EspA y EspC, implicadas en eventos de inter e intra-fosfotransferencia entre ellas siendo EspA quien fosforila a EspC y a ella misma (Schramm *et al.*, 2012).

Los **reguladores de respuesta** son proteínas de alrededor de 25 kDa de tamaño formadas por dos dominios: el receptor (**REC**) en la región amino terminal y el dominio efector en la carboxilo terminal.

El dominio REC consta de unos 120 aminoácidos y presentan una similitud de secuencia del 26 %. Entre los residuos conservados cabe destacar el Asp fosforilable que va a aceptar el grupo fosfato desde la HK y existen otros dos residuos de Asp/Glu, que junto al anterior, forman el llamado bolsillo ácido que genera el entorno adecuado para la unión del fosfato. Además, hay aminoácidos conservados importantes para la función catalítica del dominio como una Lys, o implicados en cambios conformacionales como Ser/Thr y Phe/Tyr. Este dominio cataliza las reacciones de transferencia del grupo fosfato desde la HK, actuando en conjunto con su dominio CA, y la propia desfosforilación del RR (Gao y Stock, 2009).



**Figura I.6.** Representación esquemática de un regulador de respuesta.

El 17 % de los RRs descritos están formados solamente por el dominio REC y no llevan a cabo la respuesta final sino que actúan en conjunto junto a HKs formando HyHKs en las cascadas de fosfotransferencia (Jenal y Galperin, 2009).

También se ha identificado el grupo de reguladores PIARR (*Phosphorylation-Independent Activation of Response Regulator*) que poseen la estructura convencional de RR pero carecen de los residuos esenciales para la fosforilación y se activan mediante la unión a ligandos (Wang *et al.*, 2009a).

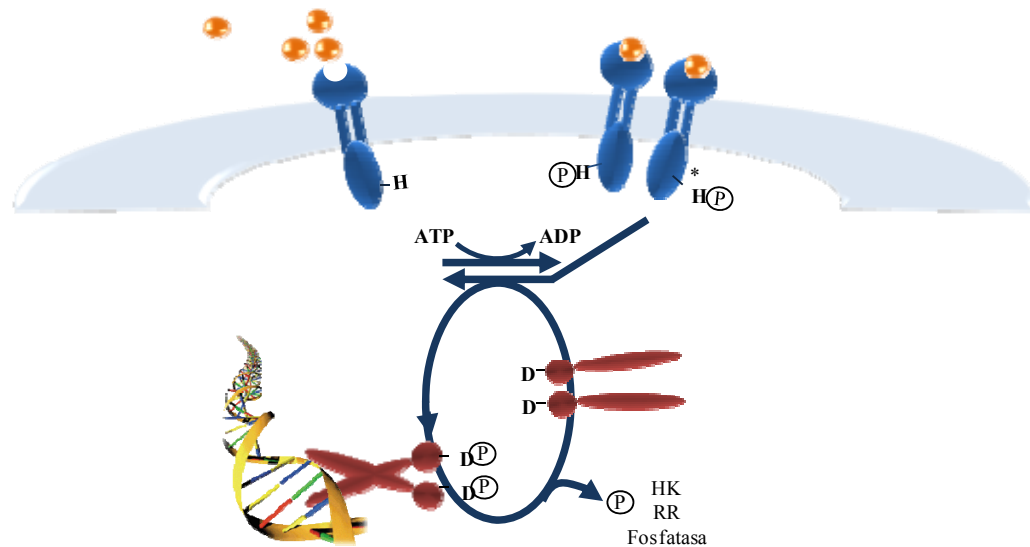
El dominio efector es la región más variable de la proteína debido al amplio rango de respuestas que las bacterias pueden llevar a cabo. El 63 % de los RRs se unen a regiones del ADN regulando la expresión génica y la mayoría pertenecen a las subfamilias OmpR (30 % de los RRs), NarL (17 %), NtrC (10 %) y LytTR (3 %). El 13 % de los RRs poseen dominios con actividad enzimática, la mayoría implicados en la regulación de c-di-GMP o desfosforilaciones. Por último un 3 % de los RRs están implicados en interacciones con otras proteínas o ligandos y un 1 % se unen a ARN actuando como factores antiterminación de la traducción (Galperin, 2010).

Los RRs que son factores de transcripción pueden actuar como activadores, represores o ambos y el número de genes regulados por ellos puede ir desde un solo operón hasta cientos de genes (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003).

Existen variaciones del modelo básico de TCS en el que **proteínas auxiliares** actúan sobre la HK y/o el RR (Buelow y Raivio, 2010; Jung *et al.*, 2012) y que permiten coordinar diferentes sistemas como PmrD de *Salmonella enterica* que conecta los TCSs PhoP/Q y PmrA/B (Kox *et al.*, 2000); actuar como proteínas de andamiaje en la localización física de la HK y/o el RR como UspC y el TCS KdpD/E de *E. coli* (Heermann *et al.*, 2009); formar parte de la cadena de transducción de señales como la proteína periplásmica ChvE de *Agrobacterium tumefaciens* que transmite el estímulo a la HK VirA (Nair *et al.*, 2011); influir sobre la estabilidad de los RR o ampliar la respuesta frente a determinadas señales (Salvado *et al.*, 2012). En otros casos el tercer componente de estos sistemas son pequeños ARN que actúan como ARN antisentido promoviendo o impidiendo la traducción de determinados ARNm o interaccionando directamente con otras proteínas (Gopel y Gorke, 2012).

#### **4.3. MECANISMO DE ACCIÓN**

El mecanismo de acción de un sistema de dos componentes se inicia cuando un determinado estímulo es detectado por el dominio sensor de una quinasa provocando un cambio en su conformación y como consecuencia la HK cataliza la autofosforilación del residuo específico de His a partir de una molécula de ATP o GTP. Esta fosforilación generalmente se da en trans, es decir, un monómero fosforila al otro y viceversa, aunque también puede ocurrir en cis donde cada monómero se fosforila a sí mismo (Casino *et al.*, 2009). Posteriormente, la HK junto al RR catalizan la transferencia del grupo fosfato desde la His hasta el residuo Asp del RR localizado en su dominio receptor. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en él haciendo que los monómeros de RR dimericen y adquieran su conformación activa permitiendo que lleven a cabo su función, generalmente uniéndose a secuencias específicas de ADN y regulando la expresión génica (Figura I.7).



**Figura I.7.** Mecanismo de acción de un sistema de dos componentes típico.

Este tipo de rutas de fosfotransferencia son las más comunes en procariotas, pero como se ha comentado anteriormente, existen otras más complejas, comunes en eucariotas, donde actúan más de dos proteínas y se dan múltiples pasos de fosfotransferencia (*Multi-component phosphorelay system*). En estas rutas el grupo fosfato se transfiere desde la HK a proteínas histidina fosfotransferasas intermediarias (HPT) que posteriormente fosforilan al RR (West y Stock, 2001).

En la célula existe un equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva de los RRs y su fosforilación desplaza el equilibrio hacia la forma activa, permitiendo a los RRs llevar a cabo su acción que se mantiene mientras se encuentren fosforilados. El tiempo de vida de los RR fosforilados varía desde segundos hasta horas y depende directamente del tipo de respuesta que medien. Por último, los RRs son desfosforilados y vuelven a la conformación inactiva dejando de ejercer su acción. Su desfosforilación pueden realizarla los propios RR por su actividad autofosfatasa, por la HK asociada o por fosfatasas externas al sistema (West y Stock, 2001).

La especificidad entre la HK y el RR de un sistema es muy elevada, y aunque se han identificado casos de regulación cruzada entre componentes de diferentes sistemas, la frecuencia con la que ocurren es muy baja y su cinética es tan lenta que son irrelevantes desde el punto de vista biológico (Groban *et al.*, 2009). Dicha especificidad está determinada por varios mecanismos, el de mayor importancia es la habilidad de la HK de reconocer al RR de su sistema que está determinado por la estructura primaria de las

proteínas (Podgornaia y Laub, 2013; Willett *et al.*, 2013). Se ha demostrado que modificando solo tres aminoácidos del dominio DHP de la quinasa EnvZ de *E. coli*, implicados en el reconocimiento, se modifica su especificidad haciéndola coincidir con la de la quinasa RstB (Skerker *et al.*, 2008). Otro mecanismo se debe a la actividad fosfatasa que poseen la mayoría de las HKs siendo capaces de desfosforilar al RR cuando este es fosforilado inapropiadamente por HKs ajenas o por fosfodonadores de bajo peso molecular como acetilfosfato (Boll y Hendrixson, 2011). La efectividad también está determinada por la competición por sustrato ya que en la célula la HK y el RR de un sistema se encuentran en una proporción de 1:35 haciendo que el RR pueda interactuar con su HK asociada con mayor efectividad (Groban *et al.*, 2009). Por último, también se ha descrito un mecanismo de restricción espacio-temporal en *Rhodobacter sphaeroides* en el que la diferente localización subcelular o la expresión a distintos tiempos de los TCSs determina la especificidad HK – RR (Scott *et al.*, 2010).

#### **4.4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN *S. coelicolor***

En el genoma de *S. coelicolor* se describieron inicialmente 67 TCSs, 17 HKs y 13 RRs huérfanos (Hutchings *et al.*, 2004), lo que supone una proporción del 0,86 % en relación al número total de genes, un 25 % más que en el resto de bacterias no patógenas de vida libre (Kim y Forst, 2001). Este hecho se debe a que el rango de estímulos a los cuales un microorganismo puede responder está directamente relacionado con el número de HKs codificadas en su genoma y el tamaño de este, y como el hábitat natural de *S. coelicolor* es el suelo, donde las condiciones son muy variables, precisa responder al amplio rango de estímulos a los que se enfrenta (Bentley *et al.*, 2002).

La mayoría son sistemas prototipo, no habiéndose descrito hasta la fecha ninguna cascada de fosfotransferencia, aunque sí se han encontrado dos HyHKs con un dominio REC (<http://www.p2cs.org>). Además, como se recoge en la página RR census (actualizada a fecha 2008) se han descrito 84 RRs ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/RRcensus.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html)). Tres de ellos constan sólo del dominio REC, uno tiene un dominio efector de unión a ARN tipo AmiR, en dos su efector es enzimático y hay otros tres que se describen como “otros” y que no se conoce exactamente su modo de acción. La mayoría de los RRs de *S. coelicolor* poseen un dominio efector de unión a ADN tipo NarL (53) o OmpR (21) y también hay uno con dominio tipo LytR. En la base de datos P2CS (<http://www.p2cs.org>) el número de RRs se amplía hasta 87 ya que se incluyen las dos



proteínas HyHKs con dominios REC y una HK-RR bifuncional. En esta base de datos también se recoge la información de las 100 HKs que se han descrito finalmente incluyendo las HyHKs mencionadas.

En cuanto a su organización en el genoma, de los 67 TCSs inicialmente descritos, 64 se encuentran en parejas, hay un sistema de tres componentes compuesto por dos RRs y una HK (en disposición RR-HK-RR) y el sistema estudiado en este trabajo, AbrC1/C2/C3, que también forma una triada pero en este caso formada por dos HKs y un RR en disposición HK-HK-RR en el genoma.

Hasta la fecha, en *S. coelicolor* funcionalmente sólo se han descrito 17 de los TCSs emparejados, una HK huérfana y dos RRs huérfanos (en este trabajo se describe un RR huérfano adicional) (Tabla I.1). Además, cabe destacar que 15 de ellos están relacionados con la producción de antibióticos como se recoge en la revisión (Rodríguez *et al.*, 2013).

**Tabla I.1.** Resumen de los TCSs de *S. coelicolor* descritos y los procesos en los que están implicados.

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> , 2009b)
SCO2281	RR huérfano implicado en producción de antibióticos y diferenciación	Este trabajo
SCO3818	RR huérfano implicado en producción de antibióticos	(Wang <i>et al.</i> , 2009b)
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)

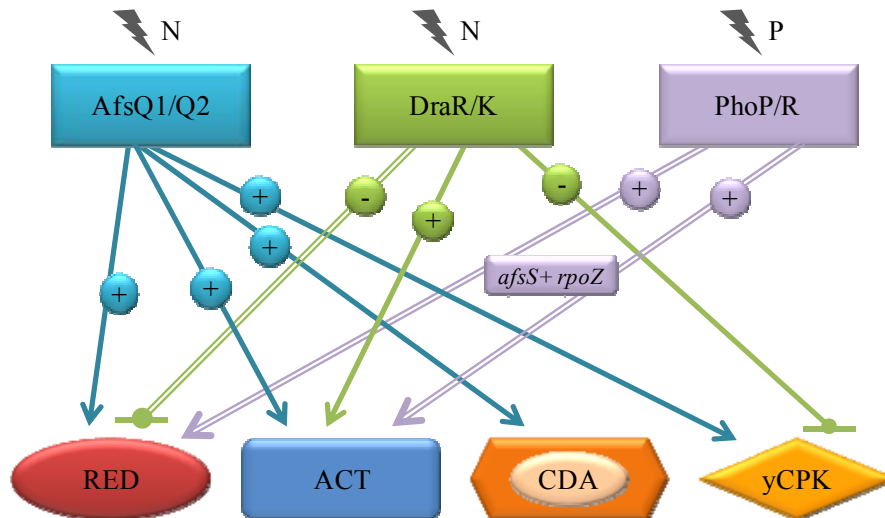
A continuación, se describen brevemente los distintos TCSs implicados en la regulación de antibióticos en *S. coelicolor*.

Solamente se conoce la señal activadora de tres TCSs: los sistemas AfsQ1/Q2 y DraR/K que relacionan la producción de antibióticos con aumentos en la disponibilidad de nitrógeno, pudiendo detectar un compuesto intermediario del metabolismo del nitrógeno o el ratio de C/N/P de la célula (Martín *et al.*, 2011) y el sistema PhoP/R implicado en situaciones de limitación de fosfato (Allenby *et al.*, 2012) (Figura I.8)

El sistema **AfsQ1/Q2** regula positivamente y de manera directa la producción de antibióticos y se identificó porque su sobreexpresión *S. lividans* inducía la producción de ACT y RED (Ishizuka *et al.*, 1992). La cepa mutante de *S. coelicolor* carente del sistema muestra una disminución en la producción de ACT, RED, CDA y yCPK. Mediante ensayos de retardo en gel (EMSAs) se identificaron como dianas moleculares de AfsQ1 los CSRs de los tres antibióticos más estudiados: *actII-ORF4*, *redZ* y *cdaR*, y además, la zona intergénica de *cpkA/cpkD* (Wang *et al.*, 2013).

El sistema **DraR/K** inhibe la producción de RED de manera indirecta mientras que activa la producción de ACT e inhibe la de yCPK de forma directa ya que se detectaron bandas de retardo en ensayos EMSA al incubar el RR DraR junto con los promotores de los CSRs de estos antibióticos: *actII-ORF4* y *cpkO* (Yu *et al.*, 2012).

El sistema **PhoP/R** activa la producción de ACT y RED indirectamente y presenta una regulación recíproca con AfsR ya que este regulador transcripcional es capaz de unirse al promotor de PhoP/R y compite con él por unirse al promotor de *afsS* y al del operón *pst*, codificando este último un sistema de transporte de fosfato de alta afinidad (Santos-Beneit *et al.*, 2009). Además, PhoP también regula directamente la expresión del gen *rpoZ*, un factor omega necesario para la síntesis de ACT y RED (Santos-Beneit *et al.*, 2011). Por lo tanto, el papel de este sistema se ejerce de forma indirecta, supuestamente a través la represión de *afsS* y la activación de *rpoZ*, dando como resultado final un efecto positivo sobre la producción de los antibióticos.



**Figura I.8.** Representación esquemática de la regulación de la producción de antibióticos mediada por TCSs cuya señal activadora es conocida. (+) regulación positiva; (-) regulación negativa. (—>) regulación directa sobre los CSRs; (==>) regulación indirecta. Modificado de Rodríguez *et al.*, 2013.

Se desconoce la señal activadora del resto de TCSs que pueden estar implicados en la regulación de la producción de uno o varios antibióticos o tener efectos pleiotrópicos sobre otros procesos fisiológicos como la diferenciación morfológica y la sincronización entre el metabolismo secundario y el desarrollo (Figura I.9).

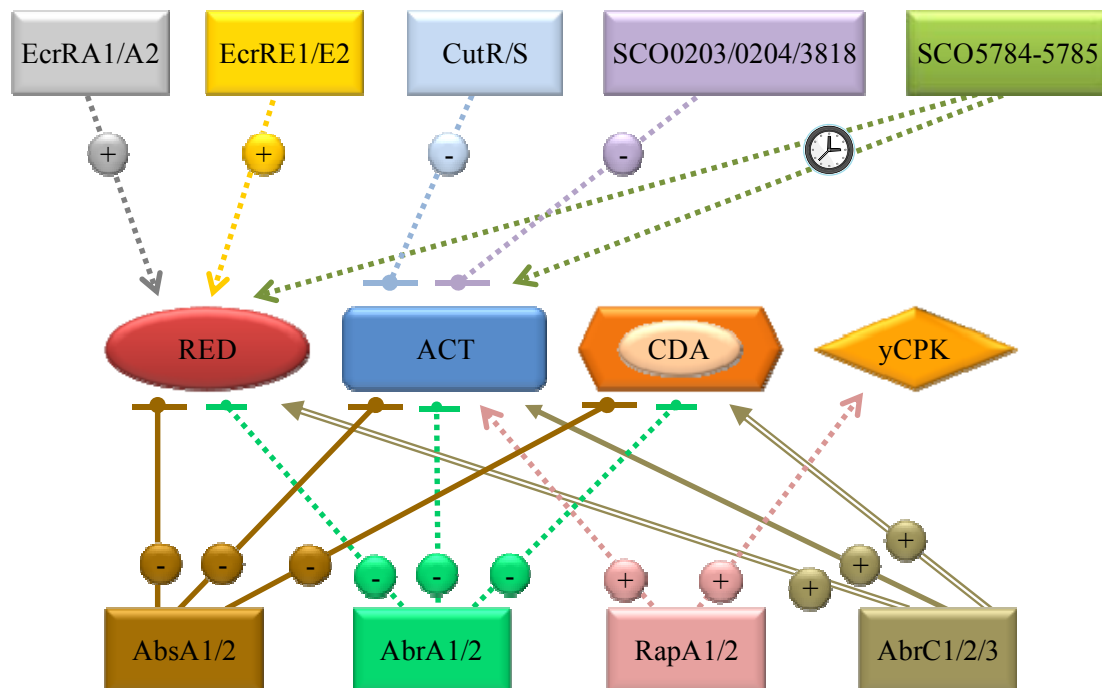
Entre los sistemas que afectan a la síntesis de un solo antibiótico se encuentran **EcrA1/A2** (Li *et al.*, 2004) y **EcrE1/E2** (Wang *et al.*, 2007) que activan la producción de RED sin afectar al resto y los sistemas **CutR/S** (Chang *et al.*, 1996), **SCO0203/04** y el RR huérfano **SCO3818** (Wang *et al.*, 2009b) que inhiben únicamente la producción de ACT. En estos casos se desconoce si la regulación ejercida es directa o indirecta sobre los CSRs de los *clusters* de antibióticos.

El sistema **AbsA1/A2** ejerce un control negativo sobre la síntesis de ACT, RED y CDA sin afectar a la diferenciación morfológica. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y EMSAs se ha demostrado que el regulador AbsA2 se une a los promotores de los genes *actII-ORF4*, *redZ* y *cdaR*, controlando de forma directa la producción de los antibióticos (McKenzie y Nodwell, 2007).

El TCS **RapA1/A2** activa la producción de ACT y yCPK. Así, la cepa carente del sistema presenta unos niveles de expresión de *actII-ORF4* y *cpkO* disminuidos pero se desconoce si la acción del RR sobre los CSRs es directa o indirecta (Lu *et al.*, 2007).

Los TCSs **AbrA1/A2** y **AbrC1/C2/C3**, además de controlar la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA, regulan la diferenciación morfológica. El sistema **AbrA1/A2** es un inhibidor de la síntesis de antibióticos y el desarrollo morfológico y se desconoce si el RR AbrA2 lleva a cabo su acción de forma directa o indirecta sobre los CSRs. Por otro lado, el sistema **AbrC1/C2/C3** (este trabajo) regula positivamente tanto la producción de antibióticos como la diferenciación morfológica (Yepes *et al.*, 2011). Así, el regulador AbrC3 activa de forma directa *actII-ORF4* (este trabajo).

El sistema **SCO5784/85** está implicado en la sincronización de la producción de antibióticos y el ciclo de desarrollo. La cepa carente del sistema presenta una síntesis de ACT y RED tardía al igual que la esporulación (Rozas *et al.*, 2012).



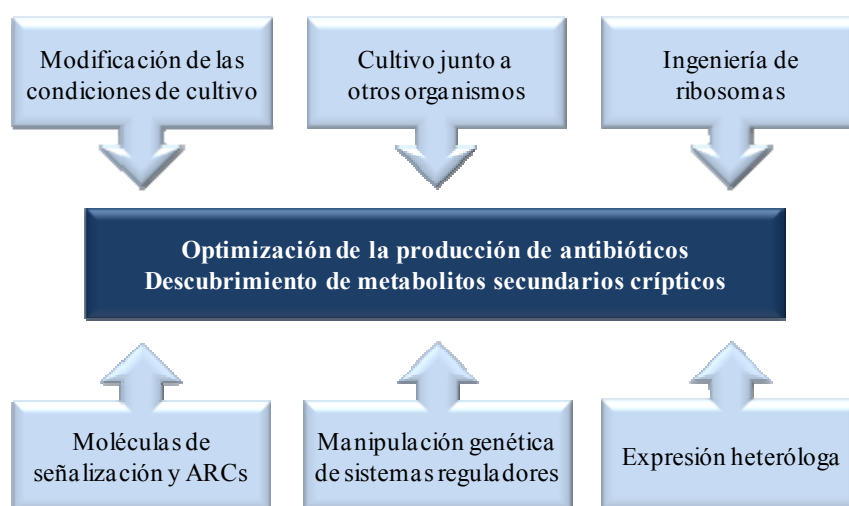
**Figura I.9.** Representación esquemática de la regulación de la producción de antibióticos mediada por TCSs cuya señal activadora se desconoce. (+) regulación positiva; (-) regulación negativa. (—>) regulación directa sobre los CSRs; (==>) regulación indirecta; (- ->) se desconoce el tipo de regulación. (⌚) sincronización de la producción de antibióticos con el ciclo celular. Modificado de Rodríguez *et al.*, 2013.

## 5. ESTRATEGIAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS Y PAPEL DE LOS TCSs

La aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos disponibles hace que el descubrimiento de nuevos compuestos antibióticos y la mejora de los procesos de producción sea una prioridad en la biotecnología microbiana.

Como se ha comentado anteriormente, a día hoy se conoce la secuencia del genoma de una veintena de especies de *Streptomyces*, lo que ha revelado la presencia de múltiples *clusters* biosintéticos implicados en la síntesis de metabolitos secundarios que desconocemos (Aigle *et al.*, 2014; Challis, 2014; Ikeda *et al.*, 2014).

A continuación, se describen diferentes estrategias que se están llevando a cabo actualmente para descubrir nuevos compuestos bioactivos y en alguna de ellas los TCSs juegan un papel importante (Liu *et al.*, 2013) (Figura I.10).



**Figura I.10.** Estrategias empleadas para la optimización de la producción de antibióticos y el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios crípticos. Modificada de Liu *et al.*, 2013.

### 5.1. MODIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

La producción de un determinado antibiótico es dependiente de la disponibilidad y nivel de nutrientes presentes en el medio así, aunque una especie tenga la maquinaria necesaria para sintetizarlo no lo va a hacer en todas las condiciones de cultivo. Por ejemplo, *S. coelicolor* no produce ACT o RED en medio SFM, medio que favorece la esporulación en vez de la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto es necesario cultivar los microorganismos en una batería de medios y condiciones

diferentes para comprobar si en alguno de ellos se encuentra la señal que active la producción de metabolitos que han permanecido silenciados. Por ejemplo, la adición al medio de cultivo de compuestos poco habituales como las tierras raras puede incrementar la producción, así, la adición de escandio multiplica por 20 la síntesis de ACT en *S. coelicolor* y activa su producción en *S. lividans*, también aumenta la actinomicina producida por *S. antibioticus* o *S. parvulus*, y la estreptomicina en *S. griseus* (Kawai *et al.*, 2007).

Además, el uso de agentes químicos y condiciones de cultivo que generen estrés al microorganismo puede activar o aumentar la producción de metabolitos (Yoon y Nodwell, 2014). Por ejemplo, el cultivo de *S. venezuelae* a 42 °C hace que la síntesis de jadomicina B aumente significativamente, resultado que también se obtiene al añadir etanol al medio de cultivo (Doull *et al.*, 1994)

La función de muchos de los TCSs es dependiente de las condiciones de cultivo y el desconocimiento de sus señales de activación hace que sea más complicado el estudio detallado de estos sistemas. Así, descifrar cuales son estas señales facilitará el descubrimiento de nuevos antibióticos cuya expresión dependa de su regulación (Sidda y Corre, 2012).

## 5.2. CO-CULTIVO CON OTROS ORGANISMOS

En la naturaleza, *Streptomyces* comparte nicho ecológico con otros microorganismos y la señal activadora de *clusters* crípticos podría ser la interacción entre ellos. Por ejemplo, el co-cultivo de *S. coelicolor* con *M. xanthus* hace que se dispare la producción de ACT (Pérez *et al.*, 2011) y con *S. viridochromogenes*, debido a la competencia por hierro, hace que produzca acil-desferrioxaminas, moléculas no descritas anteriormente en *S. coelicolor* (Traxler *et al.*, 2013). Además, los ácidos micólicos presentes en la pared celular de *Tsukamurella pulmonis* activan la producción de pigmentos rojos en *S. lividans* (Onaka *et al.*, 2011).

## 5.3. INGENIERÍA DE RIBOSOMAS

Mutaciones en ciertas proteínas ribosomales pueden activar la síntesis de antibióticos, por ejemplo cambios en *rpsL* hacen que aumente la producción de proteínas en la fase final de crecimiento exponencial promoviendo la producción de ACT en *S. lividans* y el aumento de su síntesis en *S. coelicolor*. En *S. lividans* se observa el mismo efecto cuando las mutaciones se producen en *rpoB* debido a que aumenta la afinidad de la

ARN polimerasa por los promotores de ciertos genes implicados en la síntesis de antibióticos (Ochi, 2007). Además, las mutaciones en *rpoB* en *S. coelicolor*, *S. griseus* y *S. erythraea* activan la producción de metabolitos crípticos no identificados hasta la fecha (Ochi *et al.*, 2014).

#### **5.4. MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN Y COMPUESTOS REMODELANTES DE ANTIBIÓTICOS**

Al igual que las gamma-butirolactonas activan la producción de yCPK en *S. coelicolor*, otras moléculas de señalización podrían activar la expresión de *clusters* crípticos. Por ejemplo, la desferrioxamina E, un sideróforo producido por *S. griseus*, estimula la producción de antibióticos en *S. tanashiensis* (Yamanaka *et al.*, 2005) y la goadsporina, un oligopéptido lineal de 19 aminoácidos producido por *Streptomyces sp.* TP-A0584, induce la producción de RED en *S. lividans* (Onaka *et al.*, 2001).

Por otro lado, los Compuestos Remodelantes de Antibióticos (**ARCs**, *Antibiotic-Remodeling Compounds*) son pequeñas moléculas capaces de modificar la producción de metabolitos secundarios actuando sobre la función de determinadas enzimas, no regulando la transcripción génica (Ingeniería Metabólica) (Craney *et al.*, 2012). Por ejemplo, ARC2 provoca un aumento en la síntesis de ACT en *S. coelicolor* e induce la síntesis de dos compuestos desconocidos en *S. peucetius*. Estructuralmente ARC2 es similar a Triclosan, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos actuando sobre la enoil-reductasa FabI. Como la síntesis de ácidos grasos y la de antibióticos poliQUÉTIDOS comparten precursores como acetil-CoA y malonil-CoA, al estar inhibida la síntesis de ácidos grasos hay más precursores disponibles para la producción de antibióticos (Ochi y Okamoto, 2012). En este caso, ARC2 sólo es efectivo en la síntesis de poliQUÉTIDOS y no afecta a la producción de antibióticos con estructuras y precursores diferentes.

#### **5.5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA**

La expresión de *clusters* crípticos en especies diferentes de *Streptomyces* permite descubrir nuevos metabolitos secundarios ya que muchos de estos genes no se encuentran activos en las condiciones típicas de cultivo en las especies originales y su introducción en otras puede activar su expresión. Además se han construido cepas para ser utilizadas específicamente como hospedadores, por ejemplo *S. coelicolor* M1154 carece de los *clusters* implicados en la producción de ACT, RED, CDA y yCPK y porta

las mutaciones en los genes de las proteínas ribosomales *rpoB* y *rpsL* mencionadas anteriormente (Gomez-Escribano y Bibb, 2014), eliminando la competencia por los precursores y simplificando la identificación de nuevos compuestos. Así, la expresión de los *clusters* de cloramfenicol y congocidina de *S. venezuelae* y *S. ambofaciens* respectivamente en *S. coelicolor* M1154 provoca un aumento en la producción de estos antibióticos de hasta diez veces respecto a las especies originales. También se ha construido una cepa huésped de *S. avermitilis* en la cual se ha eliminado 1,6 Mb de su genoma de 9,02 Mb correspondiente a genes no esenciales entre los que se encuentran la mayoría de los implicados en la síntesis de metabolitos secundarios (Komatsu *et al.*, 2010). Utilizando esta cepa como huésped se obtienen niveles de producción más altos de estreptomicina y cefamicina C que en las especies originales *S. griseus* y *S. clavuligerus* respectivamente. Por otro lado, la introducción del *cluster* biosintético de tienamicina de *S. cattleya* en *S. albus* modifica su producción de metabolitos secundarios (Braña *et al.*, 2014). Así, 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- $\beta$ -agarofurano, con actividades antitumoral, anti-VIH e inmunosupresora. En *S. lividans* la introducción del *cluster* provoca un aumento de la producción de ACT y una disminución de la de RED.

Otra estrategia es la utilización de cepas de *Streptomyces* manipuladas en sus TCSs como hospedadoras para la hiperproducción de antibióticos heterólogos o sus propios productos naturales. Estas cepas pueden derivar de la delección de sistemas represores de la producción o de la sobreexpresión de sistemas que actúen como activadores. Siguiendo esta línea de trabajo, en nuestro laboratorio se ha utilizado como cepa hospedadora el mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *abrA1/A2* (Yepes *et al.*, 2011) para sobreexpresar el *cluster* implicado en la síntesis del antitumoral oviedomicina (Lombó *et al.*, 2004) consiguiendo aumentos de la producción de aproximadamente el 50 % (Santamaría, 2013).

## **5.6. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE SISTEMAS IMPLICADOS EN LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA**

La identificación y posterior sobreexpresión del CSR de un *cluster* silenciado podría activar la síntesis del metabolito crítico como en el caso de las estambomicinas en *S.*



*ambofaciens*, cuya producción se descubrió al sobreexpresar el regulador LAL SamR0484 presente en el *cluster* (Laureti *et al.*, 2011). Además, en *S. albus* la integración del gen *pimM*, un regulador del *cluster* de pimamicina de *S. natalensis*, provoca la síntesis de candicidinas y antimicinas (Olano *et al.*, 2014). En otros casos, la estrategia es delecionar represores específicos de ruta como el gen *scbR2*, cuya proteína se mantiene unida al promotor del CSR *cpkO* reprimiendo su expresión en *S. coelicolor* (Gottelt *et al.*, 2010) o delecionar *alpW* que hace que aumente la producción de kinamicina en *S. ambofaciens* (Bunet *et al.*, 2011).

La manipulación de reguladores con efecto pleiotrópico también puede ser una estrategia para descubrir nuevos metabolitos secundarios, así, la sobreexpresión de *crp* hace que aumente su síntesis en las cepas de *Streptomyces* WACA4988 y SPB74 (Gao *et al.*, 2012).

La expresión de RRs o HKs de TCSs en diferentes especies también puede activar o aumentar la producción de metabolitos secundarios. Así, la expresión de un alelo modificado de la HK AbsA1 en *S. coelicolor* provoca un aumento en la síntesis de antibióticos (Sheeler *et al.*, 2005). Además, la expresión de esta HK modificada ha permitido identificar nuevas actividades antimicrobianas en 10 especies diferentes de *Streptomyces* y la producción de pulvomycinina en *S. flavopersicus* (McKenzie *et al.*, 2010).

## 6. ANTECEDENTES

Uno de los objetivos más interesantes en el estudio de la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces* es conocer las rutas de señalización que desencadenan la biosíntesis con vistas a la explotación industrial de cepas hospedadoras en las que se pueda controlar la producción de un metabolito secundario concreto. No obstante, ésta es una difícil tarea debido a la complejidad de la regulación de las rutas biosintéticas, así como el amplio rango de estímulos a los que estas bacterias son capaces de responder como se ha descrito en los apartados anteriores.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de los mecanismos de respuesta mediados por los TCSs que regulan la biosíntesis de antibióticos, nuestro laboratorio inició esta línea de investigación en el año 2003. En la tesis doctoral “Sistemas de dos componentes y la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces*

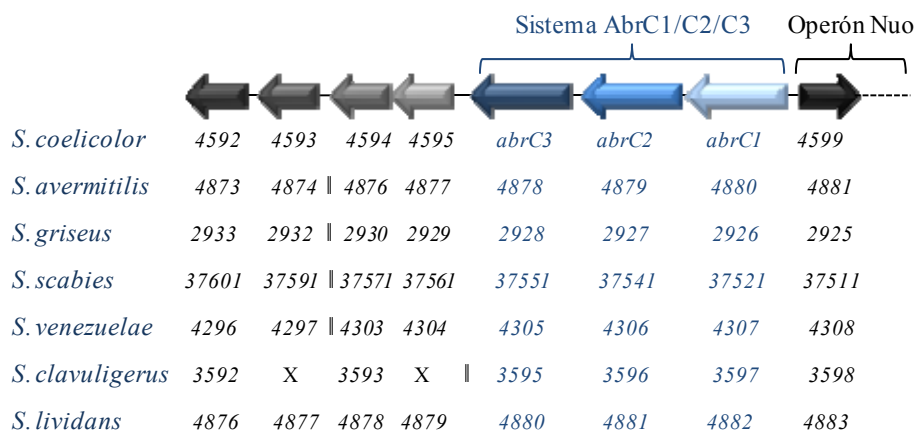
*coelicolor*” (Yepes, 2010) se llevó a cabo el estudio de la relevancia biológica y caracterización “in vitro” de los sistemas AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 y este trabajo se ha centrado en el estudio detallado de AbrC3, el RR del segundo TCS.

### 6.1. SISTEMA AbrC1/C2/C3

Se trata de un TCS atípico ya que está formado por dos HKs: AbrC1 y AbrC2 (*SCOs4598/97*) y un RR: AbrC3 (*SCO4596*) (Yepes *et al.*, 2011). Además, estos tres genes no forman una única unidad transcripcional sino que tanto las HKs como el RR poseen regiones promotoras propias haciendo que su expresión sea independiente. Como se ha mencionado con anterioridad, sólo existe otro sistema con tres componentes en *S. coelicolor* y está formado por dos RRs (*SCOs0870/0872*) y una HK (*SCO0871*) en disposición RR-HK-RR formando un operón.

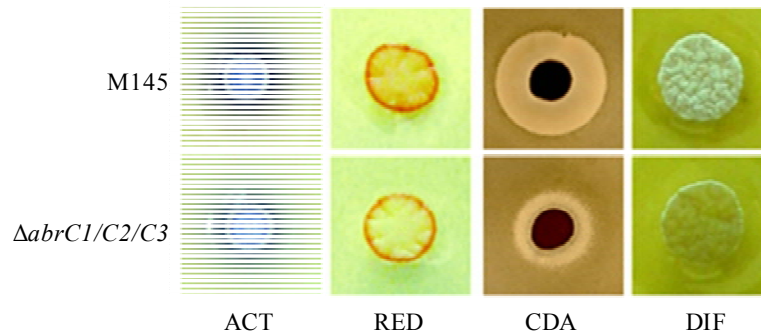
El sistema AbrC1/C2/C3 está altamente conservado en otros *Streptomyces* (Hsiao y Kirby, 2009), por ejemplo, el RR AbrC3 (*SCO4596*) posee ortólogos en más de 15 especies con más de un 90 % de identidad de secuencia (Figura I.11).

Además, al menos el regulador y una de las HKs están conservados en otros géneros de actinomicetos destacando, entre otros, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Frankia*.



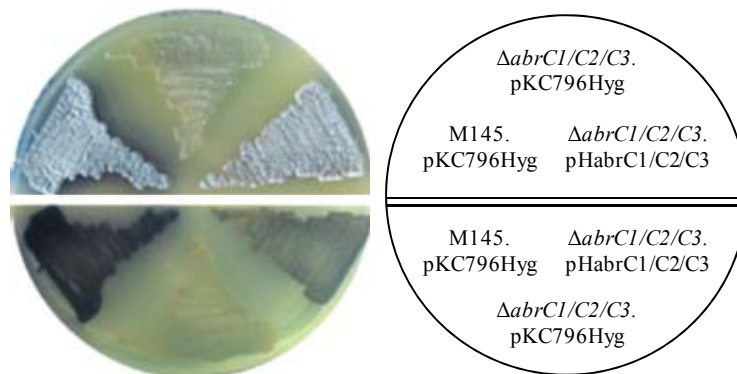
**Figura I.11.** Representación del entorno génico del TCS *abrC1/C2/C3* en diferentes especies de *Streptomyces*.

La cepa mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *abrC1/C2/C3* presentaba diferencias fenotípicas significativas con respecto a la parental M145, así, mostraba una disminución en la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA y un retraso en la diferenciación morfológica.



**Figura I.12.** Producción de antibióticos y diferenciación morfológica de las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$  en medio sólido. Modificado de Yepes *et al.*, 2011. La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento, la de RED y CDA a los 2 días y la diferenciación a los 3 días.

Los ensayos de complementación de esta cepa mutante mostraron que la integración en el genoma de los genes *abrC1/C2/C3* bajo el control de sus promotores restauraba el fenotipo de producción de ACT, sin embargo, no se alcanzaban los niveles de la cepa M145 debido a que la integración de los genes era ectópica y no se produjo en sus *loci* originales (Figura I.13).



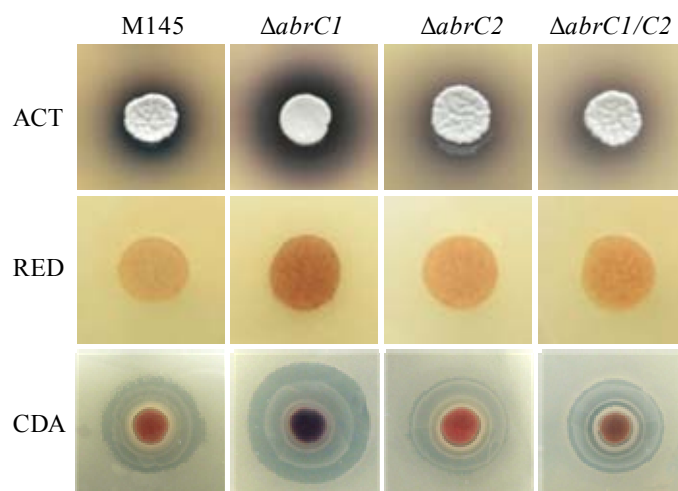
**Figura I.13.** Ensayo de complementación del mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$ . Cepas utilizadas: M145.pKC796Hyg,  $\Delta abrC1/C2/C3$ .pKC796Hyg y  $\Delta abrC1/C2/C3$ .pHabrC1/C2/C3. Producción de ACT y diferenciación morfológica en medio sólido NA a los 3 días de crecimiento.

Con estos resultados se clasificó al sistema codificado por los genes *SCOs 4598/97/96* como un regulador positivo de la producción de antibióticos en *S. coelicolor* y se le denominó AbrC1/C2/C3 (*Antibiotic Regulator*).

## 6.2. AbrC1 Y AbrC2, LAS HISTIDINA QUINASAS DEL TCS

Además, en el Trabajo de Fin de Grado (TFG) “Efecto fenotípico de la delección de los genes codificantes de las quinasas AbrC1 y AbrC2 en *Streptomyces coelicolor*”

(Franco, 2013) se estudió la importancia individual de cada una de las HKs en el fenotipo observado en la cepa mutante triple. Para ello se construyeron las cepas mutantes individuales y doble de las quininas del sistema y se llevó a cabo su caracterización fenotípica y ensayos de complementación (Figura I.14).



**Figura I.14.** Producción de ACT, RED y CDA de las cepas M145,  $\Delta abrC1$ ,  $\Delta abrC2$  y  $\Delta abrC1/C2$ . Modificado de Franco, 2013. La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento y la de RED y CDA a los 2 días.

Sólo la cepa  $\Delta abrC1$  presentaba un fenotipo claro de incremento en la producción de antibióticos y la delección de estos genes no influía en la diferenciación morfológica

El análisis de la expresión de los genes *abrC1* y *abrC2* en diferentes condiciones de cultivo mediante RT-qPCR (manuscrito en preparación) (Rodríguez *et al.*) permitió determinar que ambas HKs se expresan de forma similar en los medios y tiempos estudiados. Por otro lado, utilizando oligonucleótidos que hibridaban en el ORF de una de las dos HKs se pudo comprobar que también existía un transcrito correspondiente a las dos HKs, indicando que el primer promotor delante de la *abrC1* era capaz de transcribir eficientemente ambos genes pudiendo formar una unidad transcripcional. Además, se detectaron transcritos individuales de *abrC2* en el mutante  $\Delta abrC1$  y de *abrC1* en el mutante  $\Delta abrC2$ , lo cual indica que la región anterior al gen *abrC2* tiene también capacidad promotora. Sin embargo, no se detectó el transcrito de todo el sistema y sí de *abrC3* individual, sugiriendo que el RR era una unidad transcripcional independiente a las HKs.

Por otro lado, en la Tesis Doctoral (Yepes, 2010) se purificaron los dominios citoplasmáticos de AbrC1 y AbrC2 y se comprobó que ambas HKs eran capaces de autofosforilarse “in vitro”. Sin embargo, los resultados de los ensayos de transferencia de fosfato desde las HKs a AbrC3 “in vitro” no fueron claros ya que ambas proteínas tenían un tamaño similar y la transferencia de fosfato al RR era muy débil. En este trabajo también se demostró que la HK AbrC2 era capaz de fosforilar “in vitro” al RR huérfano SCO2281 tal y como habían sugerido Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2009b). Este regulador comparte una identidad del 59 % con AbrC3 y su relación con la regulación de la producción de antibióticos se estudia en este trabajo.



# Objetivos |





El objetivo principal de este trabajo es establecer la red de regulación ejercida por el RR AbrC3 sobre la producción de antibióticos y analizar el papel de cada uno de los miembros del sistema AbrC1/C2/C3 en su funcionalidad. Para ello se han abordado los siguientes puntos:

1. Estudio de la relevancia biológica de AbrC3 en la producción de antibióticos en *S. coelicolor* M145 con independencia de las dos HKs del sistema.
2. Estudio del papel ejercido por AbrC1, AbrC2 en la función del TCSs “in vivo”.
3. Análisis de las diferencias de expresión génica entre la cepa mutante  $\Delta abrC3$  y la cepa parental *S. coelicolor* M145.
4. Identificación de las dianas moleculares de AbrC3 “in vivo”.
5. Determinar la importancia de AbrC3 en la activación del metabolismo secundario en otras especies de *Streptomyces*.
6. Estudio de genes relacionados con el TCS AbrC1/C2/C3 y su implicación en la regulación de la producción de antibióticos.



# Resultados |



# CAPÍTULO 1

## RELEVANCIA BIOLÓGICA DE *AbrC3* EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN *S. coelicolor*

### 1.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA MUTANTE *S. coelicolor* $\Delta$ *abrC3*

El primer objetivo planteado en el trabajo fue la obtención del mutante simple del RR del sistema *AbrC1/C2/C3* para su posterior estudio. La deleción del gen *abrC3* se llevó a cabo siguiendo el sistema REDIRECT (Gust *et al.*, 2003), con el que se reemplaza el gen deseado por un *cassette* mutagénico generado por PCR que confiere resistencia a apramicina (*PCR Targeting System*).

Este método se realiza en dos etapas, en la primera el reemplazamiento del gen por recombinación homóloga se realiza en *E. coli* sobre un cósmido portando ADN de *Streptomyces*. En la segunda etapa, el cósmido mutado se transfiere a *Streptomyces* mediante conjugación intergenérica y se produce una segunda recombinación homóloga, en este caso entre el cósmido mutado y el ADN genómico de *Streptomyces* que provoca el reemplazamiento del gen por el *cassette* mutagénico. Por último, los clones de *Streptomyces* donde se ha producido la recombinación se seleccionan por su resistencia a apramicina.

A continuación se describen los diferentes pasos llevados a cabo durante el proceso de mutación.

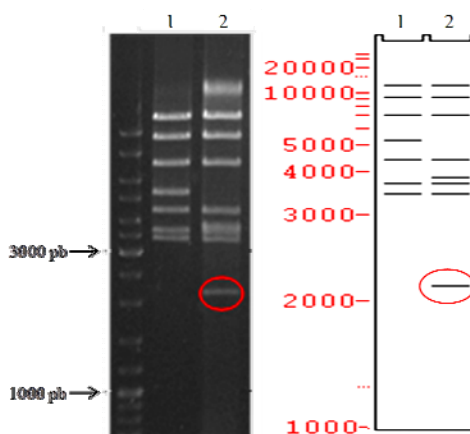
La **construcción del *cassette* de interrupción** se llevó a cabo por PCR utilizando como ADN molde un fragmento del plásmido pIJ773 que contenía el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*), la secuencia específica del origen de transferencia (OriT) para el posterior traspaso del cósmido de *E. coli* a *S. coelicolor* y los extremos FRT de reconocimiento de la recombinasa. Los oligonucleótidos utilizados correspondían en su extremo 3' a dicho fragmento del plásmido y en el extremo 5' a las zonas flanqueantes del gen *abrC3*, y para que se produjese la posterior recombinación, esta última región debía de ser de al menos 39 nucleótidos (Poteete, 2001). Para asegurar esta longitud se llevó a cabo una primera reacción de PCR (SRG-20/AY-07) (Anexo Tabla Oligonucleótidos), y a continuación una segunda (SRG-21/AY-16) para elongar los

extremos del primer fragmento resultante, obteniendo el denominado *cassette* mutagénico (Figura R.1).



**Figura R.1.** Representación esquemática del *cassette* mutagénico.

El **reemplazamiento del gen *abrC3*** en el cósmido correspondiente (SCD20) se llevó a cabo en la cepa *E. coli* BW25113 que contenía el plásmido de recombinación pIJ790 termosensible en el que están clonados tres genes del fago  $\lambda$  (*gam*, *bet* y *exo*) bajo el promotor *araBAD*, inducible por arabinosa. Estos genes codifican las proteínas Red $\gamma$ , Red $\beta$  y Red $\alpha$  implicadas en el proceso de recombinación entre secuencias de ADN homólogo de una longitud de 30-50 nucleótidos. Inicialmente, el cósmido SCD20 se introdujo por electroporación en *E. coli* BW25113 y a continuación el *cassette* mutagénico se introdujo mediante una segunda electroporación. Los clones en los que se produjo la recombinación tras la inducción con arabinosa, se seleccionaron de forma positiva por las resistencias a antibióticos conferidas por el cósmido y el *cassette* de mutación ( $amp^R$ ,  $kn^R$  y  $apra^R$ ) y para comprobar que el reemplazamiento se produjo correctamente se aisló el cósmido de varios clones y se analizaron en ensayos de restricción utilizando la endonucleasa XhoI (Figura R.2).



**Figura R.2.** Comprobación mediante cortes con la enzima de restricción XhoI del reemplazamiento génico en el cósmido SCD20. En el carril número 1 se muestra el patrón obtenido del cósmido original y en el carril número 2 del cósmido mutado. A la derecha se muestran las bandas esperadas según el programa *Gene Construction Kit* (GCK). Una de las bandas diferenciales se resalta en rojo.

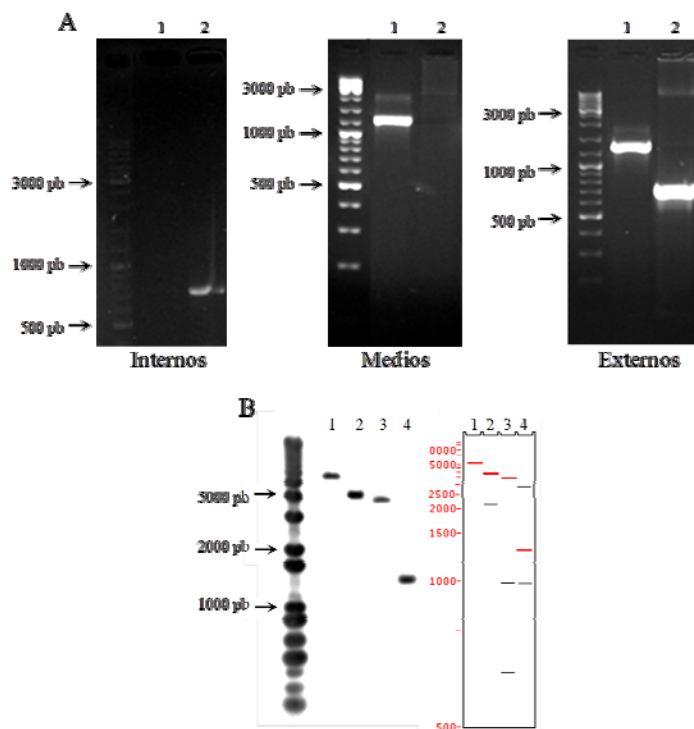
Una vez comprobado que el reemplazamiento del gen se había producido correctamente, el cósmido mutado ( $\Delta SC20-2$ ) se transfirió a *S. coelicolor* M145 por **conjugación intergenérica** entre *E. coli* ET12567/pUZ8002 y *S. coelicolor*. La cepa de *E. coli* utilizada era no metilante ya que *S. coelicolor* posee un potente sistema de restricción contra ADN metilado, además porta el plásmido pUZ8002 con los genes *tra* necesarios para la transferencia del ADN y previamente se le había introducido el cósmido mutado por electroporación.

La selección de los conjugantes de *Streptomyces* se realizó en placas SFM+MgCl<sub>2</sub> y los antibióticos apramicina y ácido nalidíxico para seleccionar conjugantes de *Streptomyces* y eliminar *E. coli* respectivamente.

En el evento de recombinación entre el cósmido mutado y el ADN de *Streptomyces* lo más probable es que en primer lugar se dé un sólo sobrecruzamiento y se integre todo el cósmido en el genoma adquiriendo la doble resistencia  $kn^R+apra^R$  conferidas por el cósmido y el *cassette* respectivamente. Para **seleccionar los dobles recombinantes** los clones conjugantes se sometieron a sucesivas rondas de esporulación y posterior selección de los clones  $kn^S+apra^R$  en medio NA. Esto es debido al desarrollo sincitial de *Streptomyces*, donde en un mismo compartimento celular existen varios genomas pudiendo coexistir copias con el reemplazamiento de gen correcto y otras con la integración completa del cósmido.

La **comprobación del reemplazamiento del gen** se llevó a cabo mediante el análisis del ADN genómico de los clones seleccionados por PCR y Southern-blot (Figura R.3). Para la comprobación por **PCR** se extrajo el ADN genómico de las cepas M145 y mutantes  $\Delta abrC3$  con el kit *Extract-N-Amp Plant PCR* (Sigma) y se hicieron las siguientes reacciones de amplificación. Se usaron tres parejas de oligonucleótidos diferentes: internos a *abrC3* (SRG-01/SRG-02) en los que sólo hubo amplificación del gen en la cepa M145 (669 nucleótidos); oligonucleótidos medios que hibridan parte en el *cassette* mutagénico y parte en los extremos del gen (SRG-20/AY-07) y que sólo amplificaron el *cassette* en los clones mutantes (1447 nucleótidos) indicando que el reemplazamiento génico se había producido en el lugar correcto del genoma; y oligonucleótidos externos (SRG-21/AY-16), adyacentes a *abrC3* con los que se amplificó tanto el gen en la cepa M145 (755 nucleótidos) como el *cassette* en los clones mutantes (1551 nucleótidos).

Para la comprobación por **Southern-blot** el ADN genómico se extrajo por el método modificado de “lisis neutra” (Kieser *et al.*, 2000) y se digirió con las enzimas de restricción XhoI y PstI por separado. Se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos utilizando el promotor de *abrC3* marcado con digoxigenina como sonda.



**Figura R.3.** A) Análisis por PCR del mutante *AbrC3*. Se muestran las bandas resultantes de las cepas M145 (1) y  $\Delta abrC3$  (2) usando oligonucleótidos internos, medios y externos. B) Análisis por Southern-blot del mutante *AbrC3*. Los carriles 1 y 2 muestran las bandas obtenidas tras la digestión del ADNg de las cepas M145 y  $\Delta abrC3$  con XhoI respectivamente y los carriles 3 y 4 tras la digestión con PstI. A la derecha se muestran las bandas esperadas según el programa GCK. Las bandas diferenciales se resaltan en rojo.

Las bandas obtenidas y su tamaño en cada ensayo correspondían con los esperados por lo que se concluyó que el reemplazamiento del gen *abrC3* en *S. coelicolor* M145 se había producido de forma correcta.

## 1.2. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LA CEPA $\Delta abrC3$

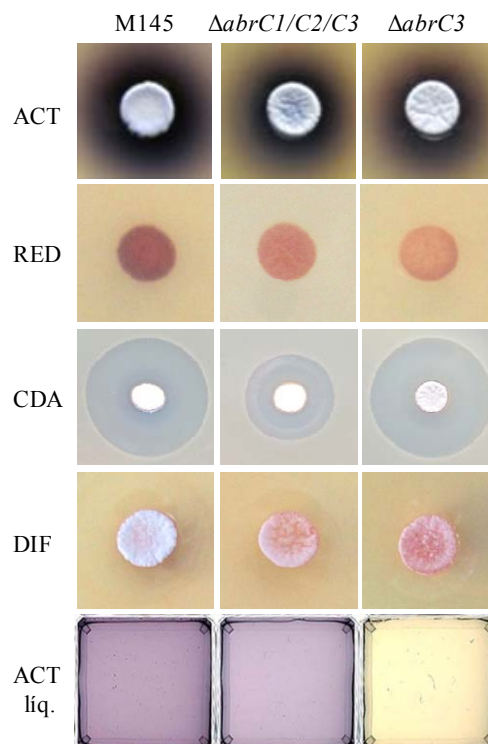
Una vez obtenido el mutante  $\Delta abrC3$  se llevó a cabo su estudio fenotípico para comprobar si, al igual que el mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$  carente del TCS completo, mostraba una reducción en la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA y un retraso en la diferenciación morfológica (Yepes *et al.*, 2011), o si la eliminación del RR y no de las HKs afectaba de diferente manera a *S. coelicolor*.



En un primer momento, se inocularon una serie de medios tanto sólidos como líquidos para comprobar si en alguno de ellos la cepa  $\Delta abrC3$  presentaba diferencias en la producción de antibióticos y desarrollo morfológico respecto a las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$ . El medio en el que se observaron mayores diferencias fue el Agar Nutritivo (NA) y su variante líquida Caldo Nutritivo (NB) por lo que estos fueron los medios elegidos para llevar a cabo este estudio en profundidad.

En medio sólido NA se sembraron gotas de 5  $\mu$ l que contenían  $10^5$  esporas y se incubaron durante distintos tiempos a 30 °C para observar la producción de ACT y RED y la diferenciación morfológica. En el caso del CDA se llevó a cabo el bioensayo frente a *B. subtilis* descrito en Materiales y Métodos.

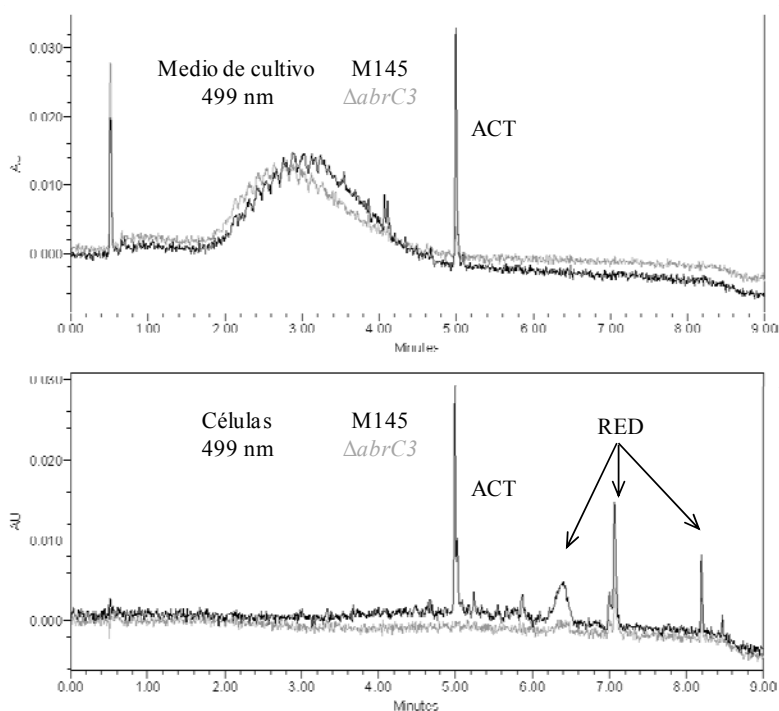
El mutante  $\Delta abrC3$  mostró una reducción en la producción de ACT, RED y en la diferenciación morfológica al igual que el mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$ . Sin embargo, la producción de CDA en el mutante simple no estaba disminuida mientras que sí lo estaba en el triple, hecho que indicaría que son las HKs del sistemas las implicadas en la regulación de la producción de este antibiótico y no el RR (Figura R.4).



**Figura R.4.** Producción de ACT, RED, CDA y diferenciación morfológica (DIF) en medio sólido NA y producción de ACT en medio líquido NB de las cepas M145,  $\Delta abrC1/C2/C3$  y  $\Delta abrC3$ . La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento, la de RED y CDA a los 2 días y la diferenciación a los 3 días.

Para estudiar el fenotipo en medio líquido se inoculó medio NB con  $4 \times 10^6$  e/ml y se incubó a 30 °C a diferentes tiempos para observar la producción de ACT. Se vio que el mutante  $\Delta abrC3$  era incapaz de producir este antibiótico, quedando los cultivos sin colorear de azul, al contrario que el mutante triple el cual, aún estando la producción disminuida alrededor del 30 %, era capaz de sintetizar ACT comparándolo con la cepa M145 (Figura R.4).

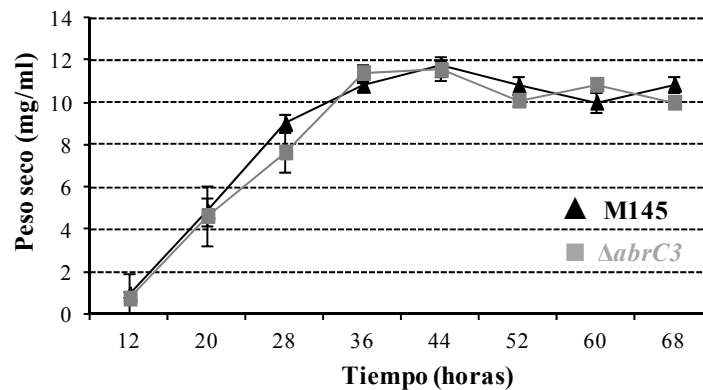
Para corroborar estos resultados se llevó a cabo un análisis cromatográfico mediante HPLC-MS de cultivos líquidos de las cepas M145 y  $\Delta abrC3$  (Figura R.5). La producción de ACT de la cepa mutante (representada en gris) era inexistente comparándola con la M145 (en negro) tanto intracelular como en el sobrenadante del cultivo y además, la producción de RED se encontraba disminuida en la cepa  $\Delta abrC3$ .



**Figura R.5.** Análisis mediante HPLC-MS de la producción de ACT y RED intracelular y en el sobrenadante de cultivos de las cepas M145 (negro) y  $\Delta abrC3$  (gris).

Para descartar que la diferencia de producción de antibióticos se debiese a defectos en el desarrollo de la cepa mutante, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio NB tomando muestras de cultivos líquidos cada 8 horas y cuantificando su peso seco como se indica en Materiales y Métodos. El mutante  $\Delta abrC3$  no mostraba defectos en crecimiento respecto a la cepa M145 (Figura R.6), por lo que la disminución de la

biosíntesis no se debía a esta razón, sino que el RR AbrC3 estaría implicado, directa o indirectamente, en la regulación de la producción de antibióticos.



**Figura R.6.** Curva de crecimiento de las cepas M145 (negro) y  $\Delta abrC3$  (gris) en medio NB (mg de peso seco/ml de cultivo). Las barras de error corresponden al error típico de la media.

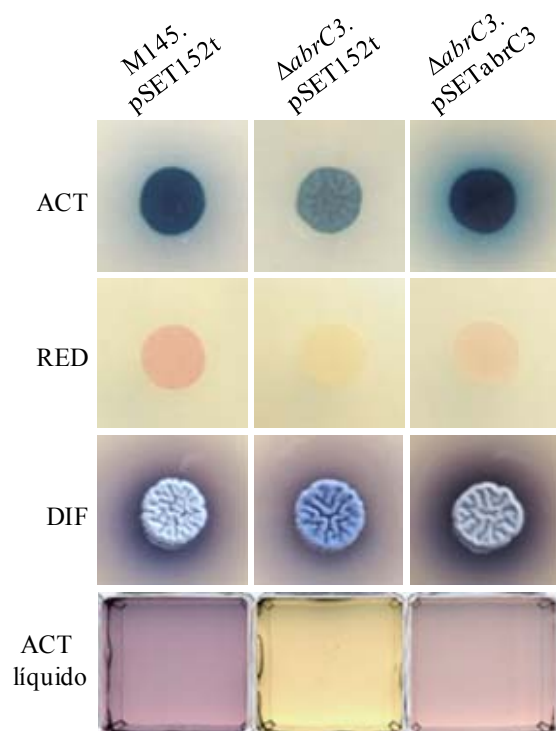
También se llevó a cabo el estudio del ciclo de vida de la cepa  $\Delta abrC3$  descrito por el grupo del Dr. Manteca (Manteca *et al.*, 2005) basado en técnicas de microscopía confocal, tinciones de viabilidad y marcadores bioquímicos de crecimiento, diferenciación y muerte celular. No se observaron diferencias entre la cepa carente de *abrC3* y la parental M145, indicando de nuevo la implicación de AbrC3 en el control de la síntesis de metabolitos secundarios.

### 1.3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE $\Delta abrC3$

Una vez obtenida la cepa mutante  $\Delta abrC3$  y estudiado su fenotipo era importante comprobar que la disminución en la producción de antibióticos y el retraso en la diferenciación morfológica observados se debían a la delección del gen *abrC3* y no a efectos polares derivados de la integración del *cassette* mutagénico en el genoma de *Streptomyces*.

Para ello y siguiendo la estrategia descrita en Materiales y Métodos, se construyó el plásmido pSETabrC3, derivado del vector pSET152t, un plásmido bifuncional *E. coli*-*Streptomyces* que se integra en el genoma de *Streptomyces* en el sitio del fago  $\phi C31$ , no en el *locus* original del gen. Una vez obtenido este plásmido, se transformó con él la cepa  $\Delta abrC3$  y se seleccionaron los clones resultantes por su resistencia a tioestreptona. También se transformaron la cepa mutante y la M145 con el vector pSET152t y se usaron como controles debido a que la integración del plásmido vacío en el sitio  $\phi C31$

provoca, por sí misma, una disminución en la producción de antibióticos (Baltz, 1998). Por último, se llevó a cabo el estudio fenotípico de estas cepas similar al descrito anteriormente (Figura R.7).



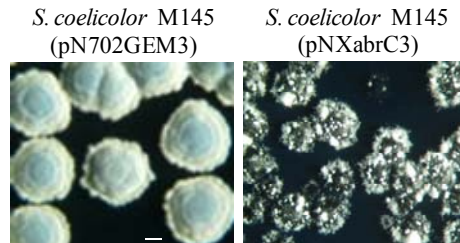
**Figura R.7.** Ensayo de complementación del mutante  $\Delta$ abrC3. Cepas utilizadas: M145.pSET152t,  $\Delta$ abrC3.pSET152t y  $\Delta$ abrC3.pSETabrC3. Producción de ACT, RED y diferenciación morfológica (DIF) en medio sólido NA y producción de ACT en medio líquido NB. La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento, la de RED a los 2 días y la diferenciación a los 4 días.

Los resultados de este ensayo indicaron que la integración de una copia del gen *abrC3* junto a su promotor en el genoma de la cepa mutante restauraba la producción de ACT y RED y la diferenciación morfológica. Por lo tanto, el fenotipo observado en la cepa  $\Delta$ abrC3 se debía realmente a la ausencia de *abrC3* y no a efectos polares, corroborando la implicación del RR en la regulación de estos procesos.

#### 1.4. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE *abrC3*

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, en la Tesis Doctoral (Yepes, 2010), se comprobó que la delección del TCS AbrC1/C2/C3 causaba una disminución en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*. Por esta razón, se pensó que la función de este sistema, y en particular del RR AbrC3, sería activar la expresión de genes implicados en la síntesis de antibióticos y por lo tanto, promover su producción. Con el objetivo de estudiar si la mayor dosis de *abrC3* induciría más producción, en dicha tesis

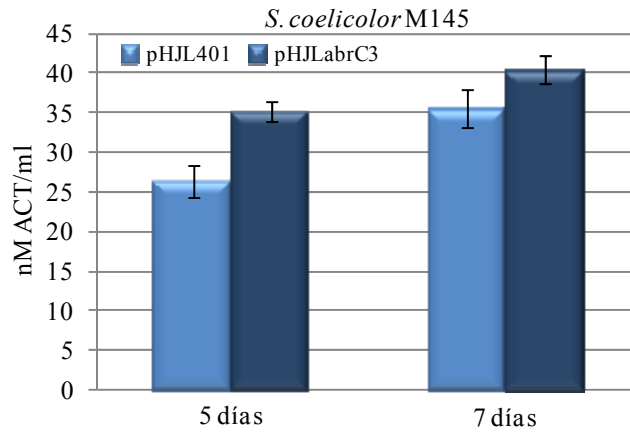
se llevó a cabo la sobreexpresión de *abrC3* en alto número de copias. Para ello, se transformó la cepa M145 con pNXabrC3, un plásmido multicopia (40-100 copias) en el que el gen quedó bajo el control del promotor fuerte de la xilanasa *xysA* de *S. halstedii* (Rodríguez *et al.*, 2005) (Figura R.8).



**Figura R.8.** Transformantes de la cepa M145 con los plásmidos pN702GEM3 y pNXabrC3 a los 6 días de crecimiento. La escala corresponde a 0,1 cm (Yepes, 2010).

Como se observa en la Figura R.8, las colonias que sobreexpresaban el RR presentaban un tamaño menor y un desarrollo morfológico lento y aberrante en comparación con las colonias que portaban el plásmido vacío (pN702GEM3). Debido a esta toxicidad, no se pudo obtener esporas de este transformante con las que inocular cultivos para cuantificar la producción de antibióticos.

Una vez comprobado que la sobreexpresión de *abrC3* en alto número de copias era tóxica en *S. coelicolor* M145, en este trabajo se estudió si la sobreexpresión del gen en bajo número provocaría los mismos efectos. Para ello, se construyó el plásmido pHJLabrC3 como se describe en Materiales y Métodos. Se trataba de un vector de 5-10 copias en el que el gen se encontraba bajo el control de su propio promotor. Se transformó la cepa M145 con este plásmido y el vector vacío pHJL401 y las colonias resultantes eran similares en aspecto en ambos casos. Al ser AbrC3 un regulador positivo de la producción de antibióticos y no ser tóxico en bajo número de copias, podría estar llevando a cabo su función de activar la biosíntesis. Así, se obtuvieron esporas de estos transformantes, se inocularon cultivos líquidos de NB y se cuantificó la producción de ACT a los 5 y 7 días (Figura R.9).

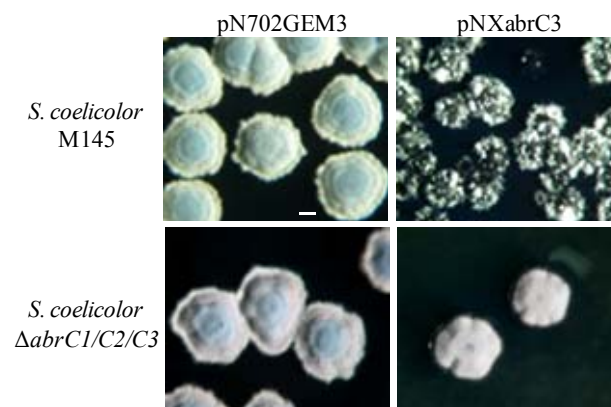


**Figura R.9.** Cuantificación de ACT (nM/ml de cultivo) de las cepas M145(pHJL401) y M145(pHJLabrC3) en medio NB a los 5 y 7 días de cultivo. Las barras de error corresponden al error típico de la media.

La sobreexpresión de *abrC3* provocaba un aumento de la producción de ACT de un 33 % a los 5 y un 14 % a los 7 días de cultivo, indicando que, a dosis bajas, *abrC3* tenía un efecto activador en la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor* y no provocaba toxicidad.

### 1.5. CONSTRUCCIÓN DE FORMAS MODIFICADAS DE *abrC3*

Como se ha mencionado anteriormente, en la Tesis Doctoral (Yepes, 2010) se observó que la sobreexpresión de *abrC3* en alto número de copias provoca toxicidad en *S. coelicolor* M145, sin embargo, también se comprobó que la sobreexpresión en la cepa carente de todo el sistema  $\Delta abrC1/C2/C3$ , no era tóxica (Figura R.10).



**Figura R.10.** Transformantes de las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$  con los plásmidos pN702GEM3 y pNXabrC3 a los 6 días de crecimiento. La escala corresponde a 0,1 cm (Yepes, 2010).

Este hecho podría deberse a que la cepa mutante carecía de las HKs del sistema por lo que el RR, aunque se encontraba en exceso, no era fosforilado y por lo tanto se encontraba inactivo sin provocar daño a las células.

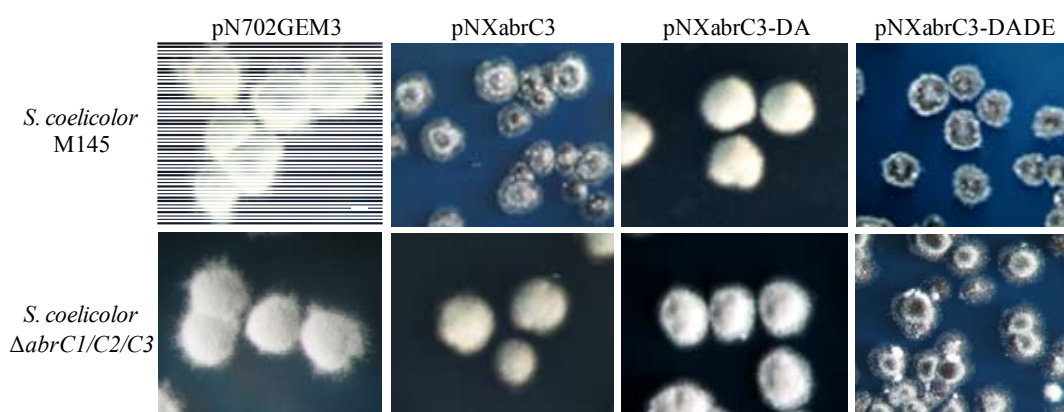
En este trabajo se propuso construir las versiones fosfoablative y fosfomimética del RR y utilizar su sobreexpresión en las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$  como herramienta para comprobar si estas formas modificadas de AbrC3 provocarían el efecto esperado. Así, la forma fosfoablative debería no provocar toxicidad, mientras que la fosfomimética debería ser tóxica en ambas cepas.

Como se ha mencionado en la Introducción, en los RRs existen tres aminoácidos Asp/Glu que forman el llamado bolsillo ácido y generan el entorno electronegativo adecuado para la unión del fosfato, destacando entre ellos el Asp fosforilable. En AbrC3 estos residuos clave correspondían al Glu en posición 11, el Asp 12 y el Asp 61, siendo este último el aceptor de fosfato. (Figura R.11).

**AbrC3** VEDRVRVVIA<sup>ED</sup>SVLLREGLTRLLTDRGHEVVAGVGDGEALVKTITELDAQGELPD  
 VVVV<sup>D\*</sup>VRMPP<sup>THT</sup>DEGV<sup>RSVRLRKAHPGLGVLVLSQYVEERYATELLAGSSRGV</sup>  
 GYLLKDRVAEVREFVDAVVRVAQGGTALDPEVVAQLLGRSRKQDVL<sup>AGLTPRERE</sup>  
 VLGLMAEGR<sup>TNSAIARQLVSDGAVEHVSNIFMKG<sup>L</sup>GLSPSDGDHRRVLA<sup>V</sup>LTYLNS</sup>

**Figura R.11.** Secuencia de aminoácidos del RR AbrC3. Los residuos marcados con el símbolo ^ forman el bolsillo ácido y el aminoácido marcado con \* es el Asp fosforilable.

La construcción de las formas modificadas de AbrC3 se basó en el estudio previo de PhoB de *E. coli* (Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007) y el proceso llevado a cabo se detalla en Materiales y Métodos. Así, en la versión fosfoablative se sustituyó el Asp 61 por el aminoácido no fosforilable Ala (D<sub>61</sub>A) dando lugar a la proteína AbrC3-DA. En el caso de la forma fosfomimética, se cambiaron el Asp 12 por Ala y el Asp 61 por Glu (D<sub>12</sub>AD<sub>61</sub>E) obteniendo la proteína AbrC3-DADE. Con las versiones modificadas de *abrC3* que dan lugar a estas proteínas, se sustituyó el gen original en el plásmido de sobreexpresión pNXabrC3 y se transformaron las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$  (Figura R.12).



**Figura R.12.** Transformantes de las cepas M145 y  $\Delta abrC1/C2/C3$  con los plásmidos pN702GEM3, pNXabrC3, pNXabrC3-DA y pNXabrC3-DADE a los 6 días de crecimiento. La escala corresponde a 0,1 cm.

La sobreexpresión del gen de la versión fosfoablativa AbrC3-DA no era tóxica en ninguna de las dos cepas. Así, este resultado indicaba que aunque en la cepa M145 estaban presentes las HKs, el RR no podía ser fosforilado debido al cambio del D<sub>61</sub>A. de este modo, AbrC3 se mantenía inactivo y no provocaba toxicidad.

En el caso de la versión fosfomimética AbrC3-DADE, la sobreexpresión de su gen era tóxica en ambas cepas indicando que este RR modificado no necesitaba ser fosforilado para adquirir su conformación activa y ejercer su función.

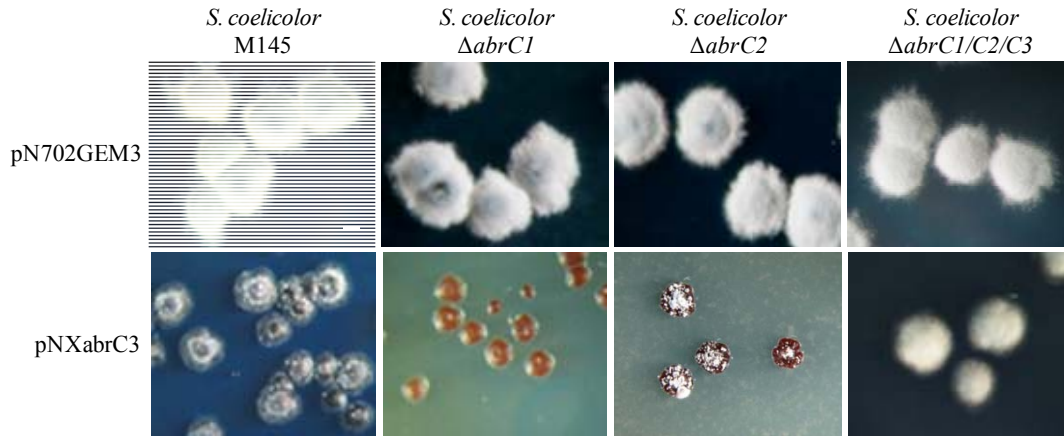
Todos estos resultados indican que la toxicidad observada era dependiente de la fosforilación del Asp 61 del AbrC3 y que esta fosforilación era dependiente de la presencia de las HKs del sistema.

## 1.6. ESTUDIO “IN VIVO” DE LA FUNCIÓN DE LAS HKs AbrC1 Y AbrC2 EN EL TCS

En el TFG (Franco, 2013) se construyeron las cepas mutantes individuales de las HKs del sistema ( $\Delta abrC1$  y  $\Delta abrC2$ ) y se estudió su fenotipo. Se observó que sólo la cepa  $\Delta abrC1$  presentaba un fenotipo de mayor producción de antibióticos lo que sugería que las HKs AbrC1 y AbrC2 ejercían diferentes funciones en el sistema. En este trabajo se llevó a cabo la sobreexpresión de *abrC3* en estas cepas mutantes y se complementó el mutante triple  $\Delta abrC1/C2/C3$  con el RR y cada una de las dos HKs de manera independiente. Estos estudios podrían considerarse como una medida indirecta de la implicación de cada HK en la fosforilación y activación de AbrC3 “in vivo”.



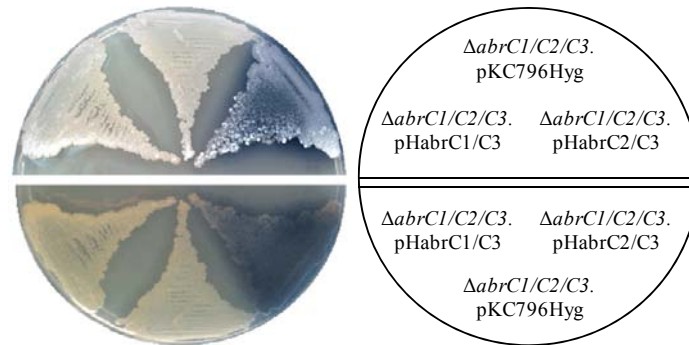
La sobreexpresión de *abrC3* se realizó como en los estudios anteriores, utilizando el plásmido de alto número de copas pNXabrC3 y pN702GEM3 como vector control (Figura R.13).



**Figura R.13.** Transformantes de las cepas M145,  $\Delta abrC1$ ,  $\Delta abrC2$  y  $\Delta abrC1/C2/C3$  con los plásmidos pN702GEM3 y pNXabrC3 a los 6 días de crecimiento. La escala corresponde a 0,1 cm.

La sobreexpresión de *abrC3* en las cepas  $\Delta abrC1$  y  $\Delta abrC2$  era incluso más tóxica que en la cepa M145. Así, el tamaño de las colonias era menor y no eran capaces de producir ACT en ningún caso. Además, la toxicidad era mayor en la cepa  $\Delta abrC1$  que en la cepa  $\Delta abrC2$ , siendo su desarrollo morfológico más aberrante si cabe, generando colonias pequeñas de micelio sustrato que no llegaban a producir los parches de micelio aéreo que sí que desarrollaban las cepas M145 y  $\Delta abrC2$  que sobreexpresaban *abrC3*. Estos resultados muestran, indirectamente, que ambas HKs eran capaces de fosforilar AbrC3 de forma independiente provocando toxicidad cada una por separado.

Por otro lado, se realizaron experimentos de complementación de la cepa mutante triple  $\Delta abrC1/C2/C3$  con el RR y cada una de las dos HKs de manera independiente para estudiar la implicación de cada HK en la activación de AbrC3 “in vivo”. Para este fin, se utilizaron los plásmidos integrativos pHabrC1/C3 y pHabrC2/C3 y el vector pKC796Hyg como control (ver Materiales y Métodos) (Figura R.14).



**Figura R.14.** Ensayo de complementación de la cepa  $\Delta abrC1/C2/C3$  con el RR y cada una de las HKs de forma independiente. Cepas utilizadas:  $\Delta abrC1/C2/C3.pKC796Hyg$ ,  $\Delta abrC1/C2/C3.pHabrC1/C3$  y  $\Delta abrC1/C2/C3.pHabrC2/C3$ . La parte superior de la placa muestra la diferenciación morfológica y la inferior la producción de ACT en medio sólido NA a los 3 días de crecimiento.

El fenotipo de menor producción de ACT mostrado por la cepa  $\Delta abrC1/C2/C3$  revertía al integrar en el genoma los genes  $abrC2/C3$  (situación equivalente a la cepa  $\Delta abrC1$ ) pero no los genes  $abrC1/C3$  (equivalente a la cepa  $\Delta abrC2$ ).

Estos resultados muestran que ambas HKs presentan distinta actividad en el funcionamiento del sistema, mostrando  $AbrC2$  una mayor relevancia a la hora de activar  $AbrC3$ .

## CAPÍTULO 2

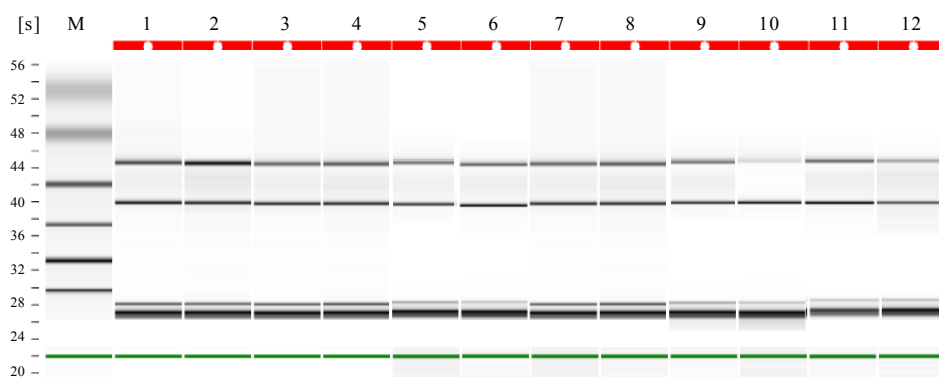
### DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LAS CEPAS MUTANTE $\Delta abrC3$ Y LA PARENTAL M145

El objetivo de esta parte del trabajo fue identificar qué genes se encontraban diferencialmente expresados en la cepa  $\Delta abrC3$  y por lo tanto, eran responsables de la disminución de la producción de antibióticos y del retraso en la diferenciación morfológica observados en dicha cepa. Para ello, se llevó a cabo el análisis de las diferencias de expresión génica comparando la abundancia de ARNm entre esta cepa y la parental M145 mediante *microarrays* de expresión.

#### 2.1. CONDICIONES DEL ENSAYO

Como se ha comentado anteriormente, en el medio líquido NB era donde se observaban mayores diferencias de producción de ACT y RED en la cepa mutante  $\Delta abrC3$ . Por esta razón, se eligió este medio para llevar a cabo tanto este estudio como el ensayo de ChIP-chip descrito en el siguiente capítulo de este trabajo. El material biológico empleado en ambos casos procedía de los mismos cultivos y fue recogido a los mismos tiempos. Se utilizaron dos réplicas biológicas de cada cepa y para ello se inocularon, para cada tiempo de estudio, matraces indentados de 500 ml con 160 ml de medio NB y  $4 \times 10^6$  e/ml y a las 36, 48 y 60 horas se tomaron muestras que se procesaron según los requerimientos de cada experimento.

Para este estudio, el micelio se trató con *RNA Protect* (Qiagen) y se congeló hasta la posterior extracción del ARN tal y como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de ARN obtenida se cuantificó utilizando el NanoDrop ND-1000 y su calidad se analizó mediante el *Bioanalyzer 2100* (Figura R.14).



**Figura R.14.** Análisis mediante *Bioanalyzer 2100* de la calidad del ARN extraído para llevar a cabo el estudio de diferencias de expresión génica. Las muestras 1 y 2 corresponden a las réplicas de la cepa M145 y las 3 y 4 a la cepa  $\Delta abrC3$  a las 36 horas, y las sucesivas en el mismo orden correspondientes a las 48 (carriles 5-8) y 60 horas (carriles 9-12).

Este experimento se basó en hibridaciones tipo ADNc *versus* ADNg en el que el ADNc representaba el transcriptoma de cada cepa en un determinado tiempo de cultivo, y se obtuvo y marcó con Cy3 a partir del ARN purificado previamente. Por otro lado, el ADNg de la cepa parental M145 marcado con Cy5 se utilizó como ADN de referencia en el estudio ya que representaba de forma equitativa todos los genes de *S. coelicolor*. Además, al utilizarlo como referencia en todas las hibridaciones, permitió realizar un análisis comparativo global entre ellas aunque se hubiesen realizado de manera independiente.

Se utilizaron *microarrays* IJISS 105K de *S. coelicolor*, cuyas características se describen en Materiales y Métodos (Lewis *et al.*, 2010). Sobre ellos se hibridó de forma simultánea ADNc-Cy3 y ADNg-Cy5 y una vez finalizado el proceso de hibridación, lectura y análisis de los datos se obtuvo un valor del ratio  $\log_2$  ADNc/ADNg para cada gen cuya inversa logarítmica representaba el *fold change* (cuántas veces un transcrito estaba subexpresado o sobreexpresado en la cepa  $\Delta abrC3$  respecto a la cepa M145). Como valores estadísticos se fijaron un *ppf* (probabilidad de falsa predicción) menor o igual a 0,15 y/o un *p*-valor menor o igual a 0,005, parámetros estadísticos que ya habían sido validados en estudios previos (Bucca *et al.*, 2009).

## 2.2. RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS

Tras el análisis de los datos, se observó que no existían grandes diferencias de expresión entre la cepa  $\Delta abrC3$  y la M145, de hecho, sólo 32 genes se encontraban subexpresados

y 8 sobreexpresados en la cepa mutante. Sin embargo, algunas de estas diferencias eran muy significativas.

### 2.2.1. GENES SUBEXPRESADOS

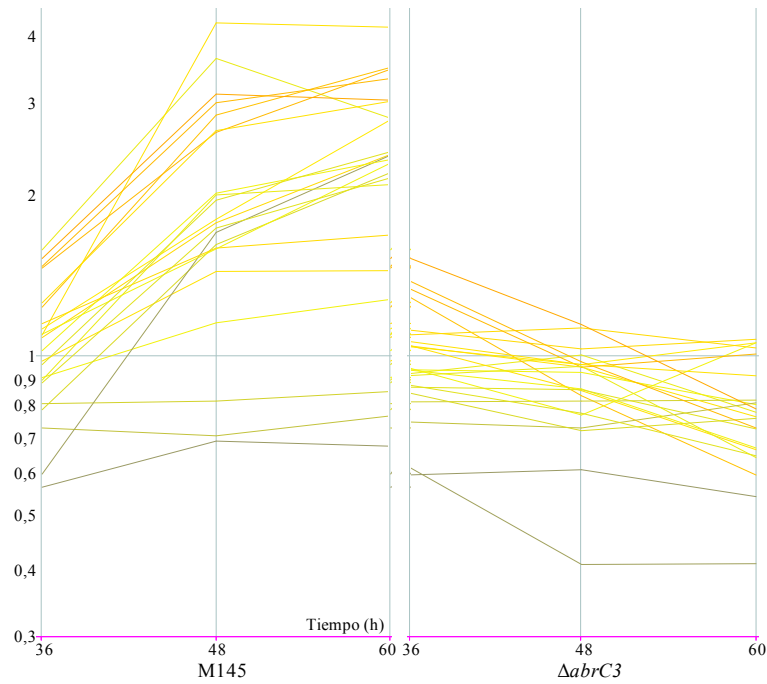
Como se ha mencionado anteriormente, sólo 32 genes se encontraban subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$  respecto a la cepa M145, y de ellos la mitad correspondían a los genes del *cluster* de ACT (Tabla R.1).

**Tabla R.1.** Genes del *cluster* de ACT diferencialmente subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$  respecto a la cepa M145 (*pdf*  $\leq 0,15$  y/o *p*-valor  $\leq 0,005$ ).

SCO / Nombre	Función	<i>pdf</i>	<i>p</i> -valor	Fold change
5071	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	0,002	0	-1,77
5072	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	0	0	-2,13
5073	Oxidoreductasa putativa	0	0	-2,09
5074	Deshidratasa putativa	0	0	-3,25
5075 / <i>OFR4</i>	Oxidoreductasa putativa	0	0	-2,23
5077 / <i>actVA2</i>	Proteína hipotética	0,001	0	-1,99
5078 / <i>actVA3</i>	Proteína hipotética	0	0	-2,28
5079 / <i>actVA4</i>	Proteína hipotética conservada	0	0	-2,28
5080 / <i>actVA5</i>	Hidrolasa putativa	0	0	-2,25
5081 / <i>actVA6</i>	Proteína hipotética	0	0	-2,59
5085 / <i>actII-ORF4</i>	Regulador activador del clúster de ACT	0	0	-2,85
5086 / <i>actIII</i>	Cetoacilreductasa	0	0	-2,80
5087 / <i>actI-ORF1</i>	Subunidad alfa de actinorrodina beta-cetoacilsintasa	0,008	0	-1,83
5088 / <i>actI-ORF2</i>	Subunidad beta de actinorrodina beta-cetoacilsintasa	0,003	0	-1,92
5089 / <i>actI-ORF3</i>	Portador de grupos acilo de actinorrodina sintasa	0	0	-3,11
5090 / <i>actVII</i>	Actinorrodina sintasa bifuncional ciclasa/deshidratasa	0,06	0,0002	-1,63

Como se observa en la Tabla R.1, la mayoría de los genes del *cluster* de ACT se encontraban subexpresados, hecho que explica la no producción de ACT por parte de la cepa  $\Delta abrC3$  en medio NB. Entre estos genes cabe destacar *actII-ORF4*, el CSR del *cluster*, que como se ha comentado en la introducción, es el regulador específico de la síntesis del antibiótico (Fernández-Moreno *et al.*, 1991).

En la cepa M145, entre las 36 y 48 horas se produce un incremento en la expresión de los genes del *cluster* de ACT que se mantiene hasta las 60 horas debido a que se está llevando a cabo el programa de expresión génica necesario para preparar la maquinaria implicada en la síntesis del antibiótico (Figura R.15). Sin embargo, en la cepa mutante  $\Delta abrC3$  no existe tal incremento en la expresión a partir de las 36 horas, sino que se mantiene a niveles muy bajos o incluso llega a disminuir en algunos casos lo que hace que la célula no esté preparada para producir ACT.



**Figura R.15.** Perfil de expresión de los genes del *cluster* de ACT de las cepas M145 y  $\Delta abrC3$  a las 36, 48 y 60 horas.

El resto de genes cuya expresión se encontraba disminuida en el mutante  $\Delta abrC3$  respecto a la cepa M145 se recoge en la Tabla R.2.

**Tabla R.2.** Genes no pertenecientes al *cluster* de ACT diferencialmente subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$  respecto a la cepa M145 ( $pfp \leq 0,15$  y/o  $p$ -valor  $\leq 0,005$ ).

SCO / Nombre	Función	<i>pfp</i>	<i>p</i> -valor	Fold change
0045	Proteína hipotética	0.127	0.0005	-1.23
0682	Proteína hipotética SCF15.03c	0.053	0.0001	-1.25
0736	Proteína de secreción putativa	0.019	0	-1.45
1480 / <i>sIHF</i>	Factor de integración	0.090	0.0003	-1.28
1550	Proteína de membrana pequeña putativa	0.070	0.0002	-1.35
1839	Regulador de transcripción putativo	0.120	0.0005	-1.40
2113 / <i>bfr</i>	Bacterioferritina putativa	0.050	0.0001	-1.24
2779 / <i>acdH</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	0.145	0.0006	-1.27
3218	Proteína pequeña conservada hipotética	0.018	0	-1.39
3327	Proteína hipotética	0.051	0.0002	-1.41
3328 / <i>bdtA</i>	Factor de transcripción putativo	0.055	0.0002	-1.47
4425 / <i>afsS</i>	Regulador tipo sigma	0.001	0	-1.83
5240 / <i>wblE</i>	Factor sigma putativo	0.158	0.0007	-1.36
5915	Ácidos grasos desaturasa	0.081	0.0003	-1.39
6205	Treonina deshidrogenasa putativa	0.158	0.0007	-1.43
6992 / <i>absRI</i>	Proteína reguladora	0.056	0.0001	-1.57

Entre estos genes cabe destacar la presencia de reguladores de la transcripción previamente relacionados con el control de la producción de antibióticos como *sIHF* (*SCO1480*) (Swiercz *et al.*, 2013), *afsS* (*SCO4425*) (Lian *et al.*, 2008) y *absRI* (*SCO6992*) (Park *et al.*, 2000), los cuales podrían ser responsables de la menor producción de RED de la cepa mutante  $\Delta$ *abrC3*. También el gen *SCO1839*, que codifica una proteína con un dominio HTH de unión al ADN por lo que podría tratarse de otro regulador transcripcional putativo. La menor expresión de los genes implicados en diferenciación morfológica *wblE* (*SCO5240*) (Homerova *et al.*, 2003; Fowler-Goldsworthy *et al.*, 2011), una proteína citoplasmática tipo factor sigma y *bdtA* (*SCO3328*) (Elliot *et al.*, 2001; den Hengst *et al.*, 2010), un factor de la transcripción putativo regulado por BldD, podría ser la responsable del retraso en el desarrollo observado en la cepa  $\Delta$ *abrC3*. También se encontraban subexpresados el gen *acdH* (*SCO2779*) que codifica una acil-CoA deshidrogenada implicada en el catabolismo de aminoácidos en *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (Zhang *et al.*, 1999) y *SCO3218*, gen sin función conocida situado en el *cluster* de CDA.

### 2.2.2. GENES SOBREENPRESADOS

Sólo 8 genes se encontraban sobreexpresados en la cepa  $\Delta$ *abrC3* respecto a la cepa M145 (Tabla R.3). Entre ellos, cabe destacar el gen de la proteína ribosomal *rplP* (*SCO4709*) y *chpE* (*SCO1800*), una chaplina de secreción implicada en el desarrollo de las hifas aéreas (Capstick *et al.*, 2011).

**Tabla R.3.** Genes diferencialmente sobreexpresados en la cepa  $\Delta$ *abrC3* respecto a la cepa M145 (*pfp*  $\leq$  0,15 y/o *p*-valor  $\leq$  0,005).

SCO / Nombre	Función	<i>Pfp</i>	<i>p</i> -valor	<i>Fold change</i>
1800 / <i>chpE</i>	Chaplina de secreción	0.145	0.0001	1.12
2605	Proteína hipotética SCC88.16	0.140	0.0002	1.36
4187	Proteína de membrana putativa	0.040	0	1.52
4709 / <i>rplP</i>	Proteína ribosomal 50S L16	0.119	0.0001	1.16
6329	Proteína hipotética SC10H5.05	0.115	0.0001	1.38
6809	Transportador integral de membrana putativo	0.124	0.0001	1.41
7665	Proteína hipotética	0.131	0.0002	1.07
7801	Proteína de membrana putativa	0.131	0.0002	1.39

### 2.3. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos en los *microarrays*, se decidió comprobar si alguno de estos genes también se encontraba diferencialmente expresado mediante análisis por qRT-PCR.

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se utilizaron sondas específicas para cada gen marcadas 5'FAM-3'TAMRA (6-carboxifluoresceína y 6-carboxitetrametilrodamina respectivamente) que, junto a los oligonucleótidos usados en cada caso, se recogen en el Anexo Tabla Oligonucleótidos. El protocolo seguido y las condiciones utilizadas en este estudio se detallan en Materiales y Métodos.

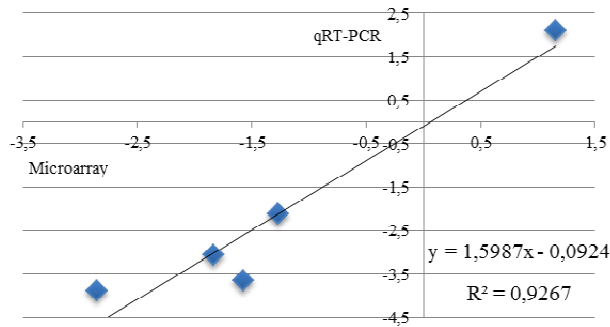
Los genes seleccionados para estudiar las diferencias de expresión entre las cepas  $\Delta abrC3$  y M145 mediante qRT-PCR fueron el CSR del *cluster* de la ACT *actII-ORF4*, los reguladores transcripcionales *afsS* y *absR1* y la enzima *acdH*, todos ellos subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$ , y *rplP*, que codifica una proteína ribosomal y se encuentra sobreexpresado (Tabla R.4).

**Tabla R.4.** Validación por qRT-PCR de cinco genes diferencialmente expresados identificados en el estudio de *microarrays*.

SCO / Nombre	Función	Fold change	
		Microarray	qRT-PCR
2779 / <i>acdH</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	-1,27	-2,13
4425 / <i>afsS</i>	Regulador tipo sigma	-1,83	-3,06
5085 / <i>actII-ORF4</i>	Regulador activador del clúster de ACT	-2,85	-3,90
6992 / <i>absR1</i>	Proteína reguladora	-1,57	-3,65
4709 / <i>rplP</i>	Proteína ribosomal 50S L16	1,16	2,11

Una vez obtenidos los *fold change* de cada gen tanto por *microarrays* como por qRT-PCR, se llevó a cabo una regresión lineal entre ellos (Figura R.16) y se obtuvo un coeficiente de correlación de  $R^2=0,93$ . Por lo tanto, existía una alta correlación entre los resultados obtenidos de ambos ensayos, validando así los datos de diferencias de expresión génica obtenidos en el estudio de *microarrays*.





**Figura R.16.** Regresión lineal obtenida al correlacionar los *fold change* de cada gen obtenidos por *microarrays* y qRT-PCR ( $y = 1,5987x - 0,0924$ ;  $R^2 = 0,9267$ ).

En el estudio de la expresión génica mediante *microarrays*, los genes *abrC1* y *abrC2*, pertenecientes a las HKs del sistema, no resultaron diferencialmente expresados en la cepa mutante  $\Delta abrC3$ . Para comprobar este dato se llevaron a cabo qRT-PCRs de estos genes (Tabla R.5) utilizando los oligonucleótidos recogidos en el Anexo Tabla Oligonucleótidos.

**Tabla R.5.** *Fold change* de los genes *abrC1* y *abrC2* obtenidos por *microarrays* y qRT-PCR.

SCO / Nombre	Función	<i>Fold change</i>	
		<i>Microarray</i>	qRT-PCR
4598 / <i>abrC1</i>	HK del TCS AbrC1/C2/C3	-1,04	-1,08
4597 / <i>abrC2</i>	HK del TCS AbrC1/C2/C3	-1,085	-1,12

Como se observa en la Tabla R.5, tampoco existían diferencias en la expresión de estos genes cuando se analizaban mediante RT-qPCR, correlacionando de nuevo los datos de ambos estudios. Además, este hecho indicaba que AbrC3 no ejercía ningún control sobre los genes de las HKs del sistema, siendo su expresión independiente al RR.



## CAPÍTULO 3

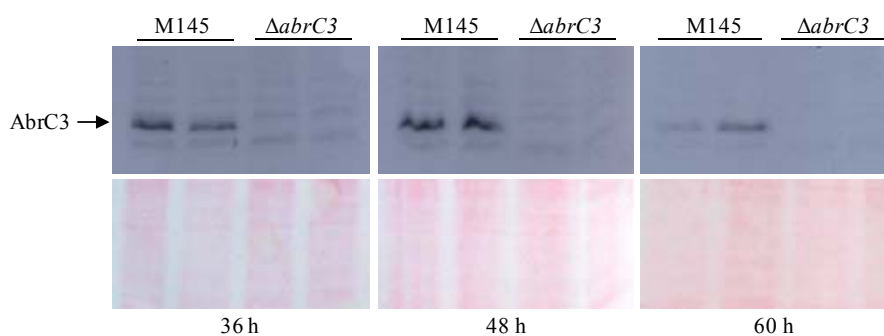
### BÚSQUEDA DE LAS DIANAS MOLECULARES DE AbrC3

De forma simultánea a la identificación de los genes diferencialmente expresados en la cepa mutante  $\Delta abrC3$ , se propuso buscar las dianas moleculares del regulador “in vivo” mediante ensayos ChIP-chip. El objetivo de este estudio fue identificar la expresión de qué genes se encontraba directamente regulada por AbrC3, o si el control de su expresión era ejercido de manera indirecta a través de otros reguladores que se encontrarían más abajo en una posible cascada de señalización.

#### 3.1. CONDICIONES DEL ESTUDIO

Los ensayos de ChIP-chip permiten identificar interacciones ADN-proteínas “in vivo” combinando las técnicas de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y los *microarrays* (chip). Para llevar a cabo este ensayo se tomaron muestras de los mismos cultivos y a los mismos tiempos que en el estudio de las diferencias de expresión génica descrito en el capítulo anterior y se trataron con formaldehído para fijar las uniones proteínas – ADN. A continuación se extrajo la cromatina y se sometió a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-AbrC3 y sin ellos, esta última muestra utilizada como control negativo. El ADN inmunoprecipitado de cada cepa se marcó con Cy3 o Cy5 y se hibridó sobre los *microarrays* 105K de *S. coelicolor*. Una vez procesados los *microarrays*, se obtuvieron las zonas del genoma que se encontraban enriquecidas en la cepa M145 respecto a la  $\Delta abrC3$  debido a la unión del regulador.

Previo al ensayo de ChIP-chip, se produjeron anticuerpos policlonales frente a AbrC3 en conejos para ser utilizados en la inmunoprecipitación de la cromatina. Para ello, se expresó la proteína AbrC3 de *S. coelicolor* en *E. coli* BL21(DE3) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Una vez purificada, se procedió a inocular a los conejos con ella y tras administrarles varias dosis se obtuvo el antisuero que se purificó mediante cromatografía de afinidad. Por último, para determinar la especificidad de los anticuerpos se realizaron ensayos de Western-blot utilizando extractos celulares de las cepas M145 y  $\Delta abrC3$ . (Figura R.17).



**Figura R.17.** Detección de la proteína AbrC3 en extractos celulares recogidos a las 36, 48 y 60 horas mediante Western-blot utilizando los anticuerpos anti-AbrC3 purificados (imágenes superiores). Membranas de los ensayos de Western-blot teñidas con rojo Ponceau S utilizadas como control de carga (imágenes inferiores).

La proteína AbrC3 era detectada por los anticuerpos purificados en los extractos celulares de la cepa M145 a las 36, 48 y 60 horas mientras que no había detección en los extractos de la cepa mutante  $\Delta abrC3$ . Por lo tanto, se había conseguido producir y purificar anticuerpos específicos frente a AbrC3 aptos para su uso en la inmunoprecipitación de la cromatina del estudio ChIP-chip.

Una vez obtenidos los anticuerpos, se llevó a cabo la búsqueda de las dianas moleculares de AbrC3 mediante ChIP-chip tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

### 3.2. DIANAS MOLECULARES DE AbrC3

Se identificaron un total de 617, 520 y 458 zonas de enriquecimiento en el genoma de la cepa M145 respecto al del mutante  $\Delta abrC3$  de cultivos recogidos a las 36, 48 y 60 horas respectivamente. Las zonas de unión de AbrC3 que mostraban un ratio de enriquecimiento mayor de 2 se recogen en la Tabla R.5.

**Tabla R.5.** Dianas moleculares de AbrC3 resultantes del ensayo ChIP-chip y seleccionadas por su alto ratio de enriquecimiento. Se muestra la función de las proteínas codificadas por estos genes y el tiempo al que se detectó unión de AbrC3.

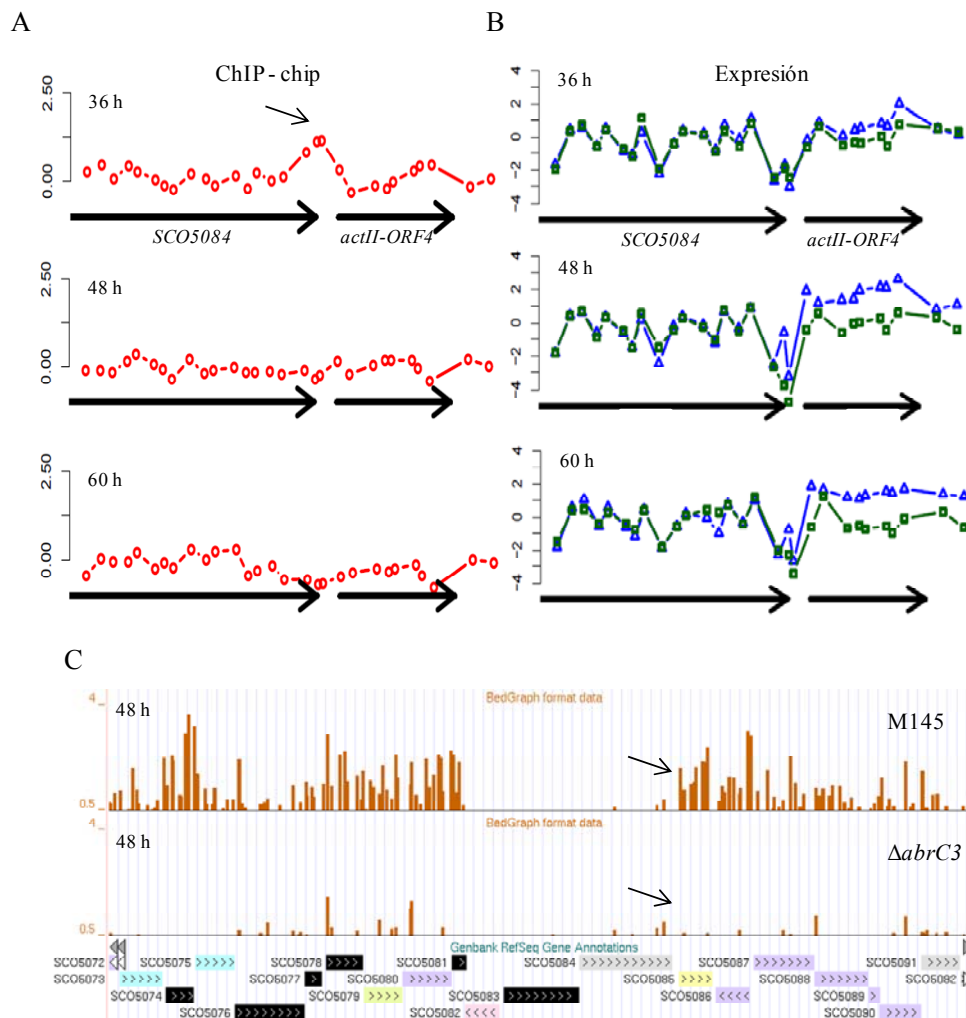
SCO de unión	Ratio de enriquecim.	Función	Tiempo (h)
0167	2.45	Proteína hipotética conservada SCJ1.16c	36
0951	2.22	Permeasa putativa	36
1391 / <i>crr</i>	5.44	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa	48
3020	4.22	Proteína integral de membrana putativa	48
3263	2.60	Proteína hipotética conservada	36
3334 / <i>trpS</i>	5.70	Triptofanil ARNt sintetasa	48
3590 / <i>vanR</i>	2.54	Regulador de respuesta putativo de TCS	36
3992	2.45	Proteína hipotética	36
4075 / <i>raga</i>	6.32	Subunidad de unión a ATP de transportador ABC	48
4123	5.02	Regulador de respuesta putativo de TCS	48
4596 / <i>abrC3</i>	2.24	Regulador de respuesta de TCS	60
4630	2.78	Proteína hipotética	36
5085 / <i>actII-ORF4</i>	2.23	Regulador activador del clúster de ACT	36
5236 / <i>nagB</i>	2.86	Glucosamina fosfato isomerasa putativa	48
5330	3.26	Proteína hipotética SC6G9.03c	36
5332	2.21	Proteína hipotética	36
5632	2.36	Proteína hipotética SC6A9.3	36
5638	2.76	Proteína integral de membrana	36
5691	2.24	Hidrolasa putativa de azúcares secretados	48
5729	2.33	Proteína conservada hipotética SC3C3.15c	36
5912	4.30	Posible proteasa de secreción	48
5966	2.24	Oxidasa putativa	48
6273 / <i>cpkC</i>	2.18	Poliquétido sintasa tipo I putativa	48
6732	2.29	Enzima multifuncional oxidativa de ácidos grasos putativa	36
6820	2.94	Oxidorreductasa putativa	48
6941 / <i>cvnC8</i>	2.55	Proteína hipotética SC1G8.13c	36
6951	2.55	Proteína conservada hipotética	36
6992 / <i>absR1</i>	2.78	Proteína reguladora	60
7077	2.24	Proteína integral de membrana putativa	36
7545	2.45	Subunidad de unión a ATP de transportador ABC putativo	48

Alguna de estas zonas de unión correspondía a promotores de genes diferencialmente expresados identificados en el ensayo anterior. También se detectó unión de AbrC3 a otros promotores de genes cuya expresión se encontraba modificada en la cepa  $\Delta$ *abrC3* aunque con un ratio de enriquecimiento menor. Todos ellos se recogen en la Tabla R.6.

**Tabla R.6.** Genes diferencialmente expresados y que a su vez son dianas moleculares de AbrC3. Se muestra el tiempo al que se detectó unión de AbrC3.

SCO de unión	Ratio de enriquecim.	Tiempo (h)
0736	1.50	60
2113 / <i>bfr</i>	1.59	48
3328 / <i>bdAt</i>	1.48	60
4596 / <i>abrC3</i>	2.24	60
4709 / <i>rplP</i>	1.89	36
5085 / <i>actII-ORF4</i>	2.23	36
6809	1.77	48
6992 / <i>absR1</i>	2.78	60

Entre estas dianas cabe destacar *actII-ORF4*, el CSR del *cluster* de ACT, detectando unión eficiente de AbrC3 a las 36 horas, pero no a las 48 o 60 horas (Figura R.18).



**Figura R.18.** A) Representación esquemática del ratio de enriquecimiento M145/ΔabrC3 en la región correspondiente al gen *actII-ORF4* a las 36, 48 y 60 horas (la flecha indica unión de AbrC3 al ADN). B) Perfil de expresión de *actII-ORF4* en las cepas M145 (azul) y ΔabrC3 (verde) a las 36, 48 y 60 horas. C) Perfil de expresión del *cluster* de ACT a las 48 horas (la flecha corresponde al gen *actII-ORF4*).

En la cepa M145, el regulador AbrC3 se une a la región del gen *actII-ORF4* a las 36 horas y es a las 48 cuando esta unión se traduce en un aumento de la expresión del gen que se mantiene hasta las 60 horas. Sin embargo, en la cepa  $\Delta abrC3$ , no existe el RR por lo que no se une a *actII-ORF4* para activar su expresión y se mantiene silenciado. Como *actII-ORF4* es el CSR del *cluster* de ACT y su expresión no es activada, el resto de genes presentes en el *cluster* y cuya expresión depende de ActII-ORF4, también van a permanecer silenciados y por lo tanto no va a haber producción del antibiótico.

Además, se detectó unión eficiente de AbrC3 a su propio promotor a las 60 horas, tratándose de un auto-regulador que participa en el control de su propia expresión. Sin embargo, no se observó unión al promotor de las HKs del sistema, genes cuya expresión no se encontraba modificada en la cepa mutante  $\Delta abrC3$ , indicando nuevamente que el RR no interviene en el control de la expresión de *abrC1* y *abrC2*.

La zona promotora del gen *absR1* también se identificó como diana molecular al unirse AbrC3 de manera eficiente a esta región a las 60 horas.

Además, se detectaron uniones menos fuertes de AbrC3 a los promotores de los genes que se encontraban subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$  como *SCO0736*, *bfr* y *bdtA* o genes sobreexpresados como *SCO6809* y *rplP*.

Sin embargo, el RR AbrC3 no se unía a las regiones promotoras de genes que se encontraban diferencialmente expresados como *afsS*, *SCO3218* o *SCO0682*. Este hecho podría deberse a que su expresión estaría controlada por reguladores transcripcionales inferiores en una posible cascada de regulación o porque AbrC3, en los promotores de estos genes, formase un complejo junto a otros factores y/o co-factores de la transcripción que bloqueasen el acceso de los anticuerpos a AbrC3, resultando estos promotores falsos negativos en el ensayo ChIP-chip.

### **3.3. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSAs)**

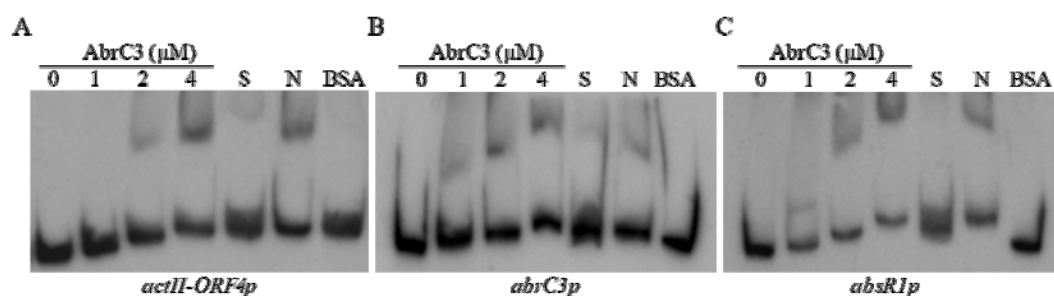
Para comprobar si AbrC3 era capaz de unirse “in vitro” a las dianas moleculares identificadas por ChIP-chip y validar los resultados obtenidos, se llevaron a cabo EMSAs con la proteína AbrC3 y las regiones promotoras de estos genes.

Estos ensayos se basan en la menor movilidad electroforética que presentan los fragmentos de ADN al formar un complejo de unión con el regulador transcripcional comparándola con la movilidad del ADN por sí solo.

Los fragmentos de ADN utilizados en estos ensayos comprendían la región promotora más los 100 primeros nucleótidos de cada gen y se denominaron *SCOXXXXp*. Estos promotores se amplificaron por PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos recogidas en el Anexo Tabla Oligonucleótidos, y los procesos llevados a cabo en su marcaje con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, en la reacción de unión con AbrC3 y las condiciones de la electroforesis se detallan en Materiales y Métodos.

En el estudio de cada diana molecular, 10 fmol de ADN se incubaron junto a AbrC3 a una concentración de 1, 2 y 4  $\mu$ M. Además, se llevaron a cabo 3 controles en cada EMSA con una concentración de proteína de 4  $\mu$ M: un control de especificidad de la unión de AbrC3 añadiendo a la reacción 100 veces el promotor sin marcar radioactivamente (S); otro de competencia añadiendo 100 veces de ADN de esperma de salmón (N); y un último control sin AbrC3 y con seroalbúmina bovina (BSA).

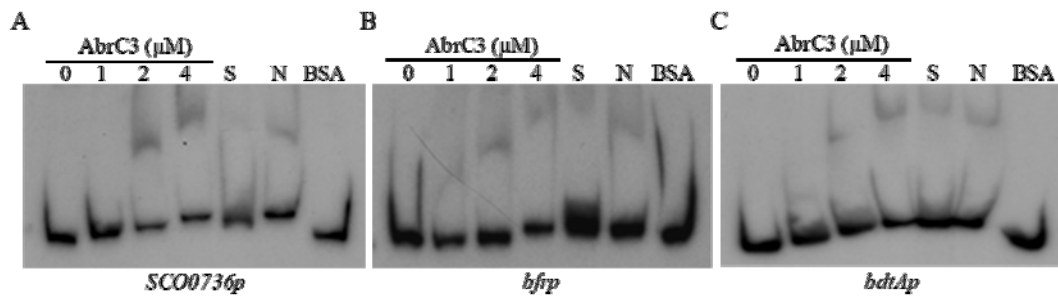
Entre los genes subexpresados en la cepa  $\Delta$ *abrC3* que eran dianas moleculares de AbrC3, se observó que la proteína se unía “in vitro” con alta afinidad a los promotores *actII-ORF4p*, *abrC3p* y *absR1p*, dianas moleculares identificadas mediante ChIP-chip con un mayor ratio de enriquecimiento (Figura R.19).



**Figura R.19.** EMSAs con diferentes concentraciones de la proteína AbrC3 y los promotores *actII-ORF4p* (A), *abrC3p* (B) y *absR1p* (C). S: control de especificidad. N: control de competencia. BSA: control con BSA.

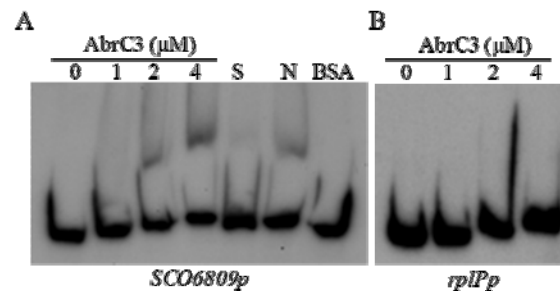
También se observó retardo en los EMSAs con los *SCO0736p*, *bfrp* y *bdtAp*, en los dos últimos con una menor afinidad que los anteriores (Figura R.20).





**Figura R.20.** EMSAs con diferentes concentraciones de la proteína AbrC3 y los promotores *SCO0736p* (A), *bfrp* (B) y *bdtAp* (C). S: control de especificidad. N: control de competencia. BSA: control con BSA.

Los *SCO6809p* y *rplPp* se habían identificado como dianas moleculares entre los genes sobreexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$ , sin embargo, sólo se observó retardo en el EMSA con *6809p* y no con *rplPp* (Figura R.21).



**Figura R.21.** EMSAs con diferentes concentraciones de la proteína AbrC3 y los promotores *SCO6809p* (A) y *rplPp* (B). S: control de especificidad. N: control de competencia. BSA: control con BSA.

El hecho de que AbrC3 no se uniese a *rplPp* “in vitro” podría deberse a que el RR necesitase factores y/o co-factores adicionales que no se encontraban en la reacción de unión o que esta diana molecular fuese un falso positivo y la regulación de la expresión de *rplPp* por parte de AbrC3 se llevase a cabo de forma indirecta.

### 3.4. IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DIANA DE AbrC3

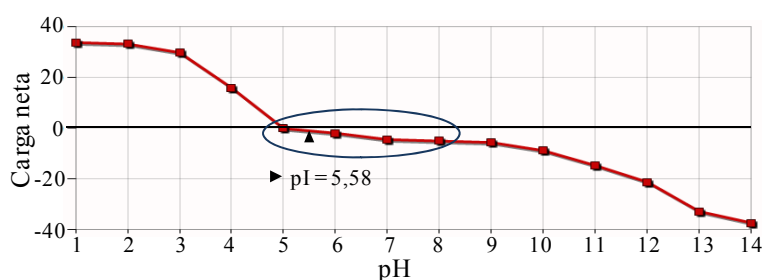
Una vez identificados los genes cuya expresión se encontraba regulada directamente por AbrC3, se propuso identificar la secuencia de reconocimiento del RR en los promotores diana.

#### 3.4.1. ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE a DNasa I

En un primer momento se llevó a cabo la identificación de la secuencia consenso mediante ensayos de protección frente a DNasa I (Foot-printing) siguiendo el protocolo

detallado en Materiales y Métodos. Esta técnica se basa en el impedimento estérico que supone la unión de una proteína a una determinada región de ADN de ser digerido por la enzima DNasa I. Tras la digestión, se generan fragmentos de ADN de diferentes tamaños que al ser sometidos a una electroforesis se ordenan formando un patrón de bandas en el que está representados todos los tamaños excepto los que resultarían tras la digestión en la zona del ADN protegida por la unión de la proteína. Sin embargo, no fue posible identificar dicha secuencia mediante esta técnica.

Probablemente, este hecho se debía a la baja solubilidad de la proteína AbrC3 purificada. Su punto isoeléctrico es de 5,58, y a este pH, su carga neta es 0 por lo que se mantiene insoluble. Como se observa en la Figura R.22, la carga neta también es cercana a 0 desde pH 5,0 a 8,0, siendo su solubilidad muy baja en este intervalo de pH entre los que tienen lugar los procesos fisiológicos y los ensayos “in vitro”.



**Figura R.22.** Representación de la carga neta de la proteína AbrC3 en función del pH.

Este hecho también podría explicar los retardos parciales obtenidos en los EMSAs, resultando en todos los casos una banda de ADN no unida a la proteína.

### 3.4.2. IDENTIFICACIÓN “IN SILICO” DE LA SECUENCIA DIANA DE AbrC3

Dado que mediante foot-printing no fue posible identificar la secuencia de reconocimiento de AbrC3, se llevó a cabo un alineamiento de las regiones promotoras identificadas como dianas moleculares de los genes que a la vez se encontraban diferencialmente expresados en la cepa mutante  $\Delta abrC3$ . Se alinearon 8 promotores (6 de genes subexpresados y 2 de genes sobreexpresados) utilizando el servidor informático online RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*, <http://rsat.ulb.ac.be/>) y se obtuvo la secuencia consenso de 10 nucleótidos 5-GAASGSGRMS-3 (S: G o C; R: A o G; M: A o C) (Figura R.23).



**Figura R.23.** Secuencia consenso obtenida al alinear los promotores diana de AbrC3 mediante RSAT. En el eje de abscisas se indica la posición de cada nucleótido en la secuencia y en el eje de ordenadas la probabilidad de aparición.

Como se muestra en la Tabla R.7, de los 8 promotores alineados, 7 de ellos presentaban dicha secuencia. El único que carecía de ella era *rplPp*, promotor que tampoco había sido retardado por AbrC3 en el EMSA, lo que indicaría que la regulación de la expresión de este gen sería indirecta y no que AbrC3 precisase de factores adicionales para su unión.

**Tabla R.7.** Secuencia consenso identificada en los genes diferencialmente expresados y que a su vez son dianas moleculares de AbrC3. Los números indican la posición de la secuencia respecto al codón de inicio de cada gen.

SCO de unión	Ratio de enriquecim.	Tiempo (h)	Secuencia
0736	1.50	60	-53 GAAGGCGACC -44
2113	1.59	48	-26 GTTCCCGTTC -17
3328 / <i>bdAt</i>	1.48	60	-46 GAAGGGGAAG -37
4596 / <i>abrC3</i>	2.24	60	-137 CTTCCCGTTC -128
4709 / <i>rplP</i>	1.89	36	Ausente
5085 / <i>actII-ORF4</i>	2.23	36	72 GAAGGCGACC 81
6809	1.77	48	-112 GAAGGCGGAC -103
6992 / <i>absR1</i>	2.78	60	-321 GAAGGGGACG -312

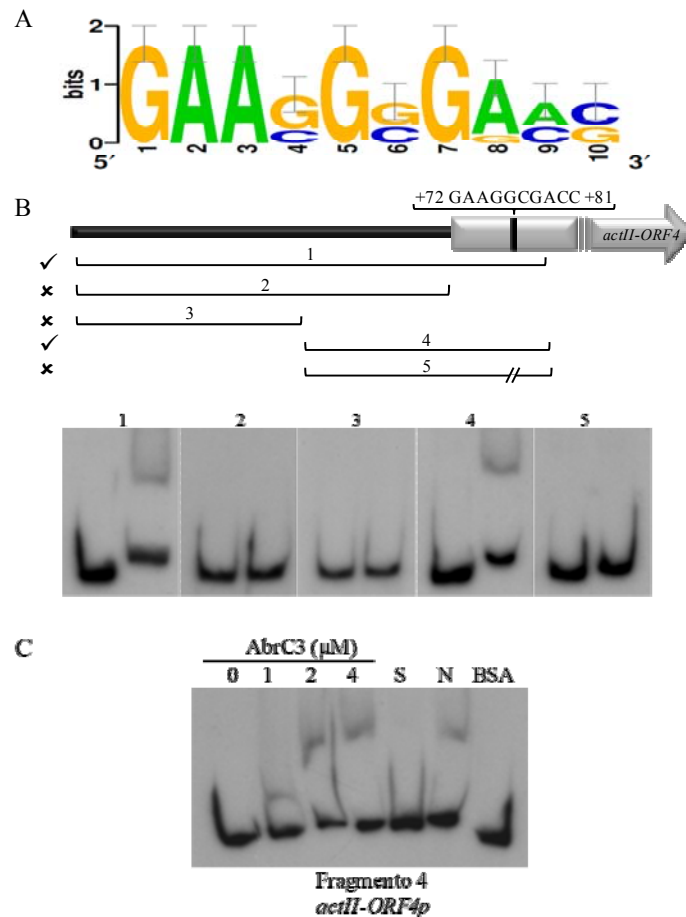
También se llevó a cabo la búsqueda de la secuencia consenso en las dianas moleculares con mayor ratio de enriquecimiento identificadas por ChIP-chip (Tabla R.8).

**Tabla R.8.** Secuencia consenso identificada en dianas moleculares de AbrC3 resultantes del ensayo ChIP-chip y seleccionadas por su alto ratio de enriquecimiento. Los números indican la posición de la secuencia respecto al codón de inicio de cada gen.

SCO de unión	Ratio de enriquecim.	Tiempo	Secuencia
0167	2.45	36	354 GAAGGGGGCG 363
0951	2.22	36	-329 GGTCGCCTTC -318
1391 / <i>crr</i>	5.44	48	1113 GAAGGCGGCG 1122
3020	4.22	48	Ausente
3263	2.60	36	-240 GTTCGCCTTC -231
3334 / <i>trpS</i>	5.70	48	-387 GGCCGCGTTC -378
3590 / <i>vanR</i>	2.54	36	Ausente
3992	2.45	36	Ausente
4075 / <i>raga</i>	6.32	48	Ausente
4123	5.02	48	-674 GAACGCGACC -665
4596 / <i>abrC3</i>	2.24	60	-137 CTCCCGTTC -128
4630	2.78	36	Ausente
5085 / <i>actII-ORF4</i>	2.23	36	72 GAAGGCGACC 81
5236 / <i>nagB</i>	2.86	48	-213 GGTCGCGTTC -204
5330	3.26	36	-975 GAAGGGGGCG -966
5332	2.21	36	1134 CTTCGCCTTC 1143
5632	2.36	36	-1261 GAACGGGACG -1252
5638	2.76	36	Ausente
5691	2.24	48	-777 GAACGCGGCG -768
5729	2.33	36	Ausente
5912	4.30	48	-54 CTCCCCCTTC -45
5966	2.24	48	-803 GAAGGCGGAC -794
6273 / <i>cpkC</i>	2.18	48	3138 CGCCCCGTTC 3147
6732	2.29	36	1140 GAAGGCGGCC 1149
6820	2.94	48	-519 GAACGCGGCC -510
6941 / <i>cvnC8</i>	2.55	36	-306 GGCCGCCTTC -297
6951	2.55	36	-411 CGCCGCGTTC -402
6992 / <i>absR1</i>	2.78	60	-321 GAAGGGGACG -312
7077	2.24	36	-294 GAAGGCGGCG -285
7545	2.45	48	-369 GGCCGCGTTC -360

Así, de las 35 dianas moleculares de AbrC3 analizadas, el 77 % presentaban la secuencia consenso propuesta.

Una vez establecida 5-GAASGSGRMS-3 como secuencia de reconocimiento de AbrC3, se llevó a cabo su estudio detallado mediante EMSAs utilizando distintas variantes del promotor del gen *actII-ORF4*. En esta diana, la secuencia presente era 5'-GAAGGCGACC-3' y se encontraba en la posición +72/+81 respecto al inicio del gen (Figura R.24).

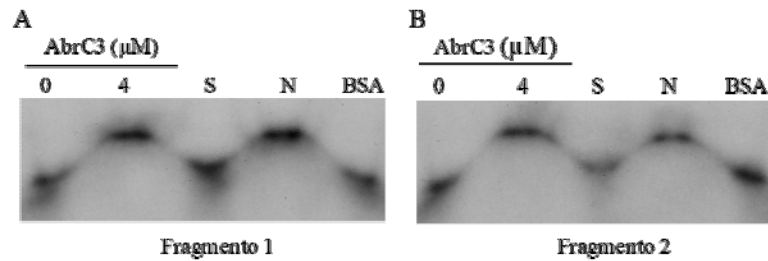


**Figura R.24.** A) Secuencia consenso identificada mediante RSAT. B) EMSAs con diferentes regiones de *actII-ORF4p* y AbrC3 a una concentración de 4 μM. C) EMSA con el fragmento 4 de *actII-ORF4p*. S: control de especificación. N: control de competencia. BSA: control con BSA.

Como se había demostrado en el apartado anterior, AbrC3 era capaz de retardar el fragmento 1, que incluía la región intergénica de *actII-ORF4* más los 100 primeros nucleótidos del gen. Sin embargo, no se detectó retardo cuando el EMSA se realizó con el fragmento 2, correspondiente solamente a la región intergénica previa a *actII-ORF4*. A continuación, el fragmento 1 se dividió en los fragmentos 3 y 4 y sólo en el número 4 resultó banda de retardo debido a que contenía la secuencia diana. Por último, mediante PCR solapantes (Materiales y Métodos) se eliminó la secuencia 5'-GAAGGCGACC-3' del fragmento 4 y se obtuvo el 5, que tampoco era retenido por AbrC3.

Se llevaron a cabo otros EMSAs con sondas de doble cadena de sólo 50 nucleótidos para comprobar que la secuencia 5'-GAAGGCGACC-3' de *actII-ORF4* era la diana molecular de AbrC3 (Figura R.25). El primer fragmento de ADN (oligonucleótidos SRG-119/SRG-120) correspondía al fragmento entre las posiciones +52/+101 de *actII-*

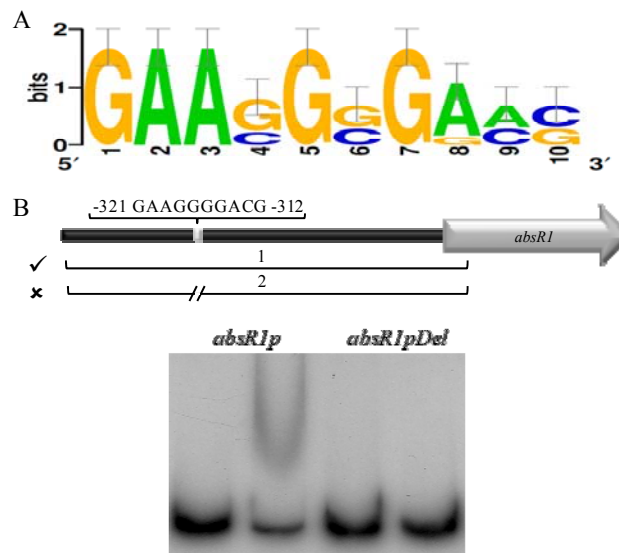
*ORF4* conteniendo la secuencia consenso en el centro y en el segundo fragmento (oligonucleótidos SRG-121/SRG-122) la secuencia quedaba flanqueada por ADN artificial no perteneciente a *Streptomyces*.



**Figura R.25.** EMSAs de la proteína AbrC3 con el fragmento *actII-ORF4p* de 50 nucleótidos con la secuencia de reconocimiento propuesta, 5'-GAAGGCGACC-3' (A) y con el fragmento artificial de 50 nucleótidos incluyendo dicha secuencia (B). S: control de especificidad. N: control de competencia. BSA: control con BSA.

Se obtuvo retardo con ambos fragmentos, lo que indicaría que la secuencia consenso propuesta era suficiente para el reconocimiento y unión de AbrC3 al ADN.

También se estudió la importancia de la secuencia diana 5'-GAAGGGGACG-3' en *absR1p*, y para ello se eliminó mediante PCRs solapantes obteniendo el fragmento *absR1pDel* con el que se realizaron EMSAs (Figura R.26).



**Figura R.26.** A) Secuencia consenso identificada mediante RSAT. B) EMSAs con *absR1p* y *absR1pDel* (mismo fragmento sin la secuencia de reconocimiento 5'-GAAGGGGACG-3') y AbrC3 a 4 μM.

La delección de la secuencia propuesta hacía que *absRIpDel* no fuese reconocido por AbrC3 y por lo tanto no se obtenía banda de retardo en este fragmento mutado.

De nuevo estos resultados corroboran que la secuencia consenso propuesta corresponde a la región de unión de la proteína AbrC3.





## CAPÍTULO 4

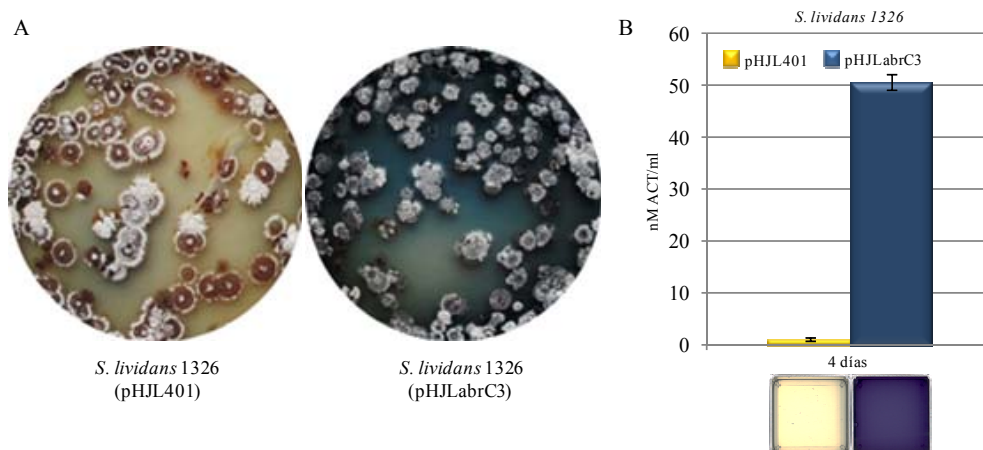
### AbrC3 Y LA ACTIVACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO

Como se ha descrito en el Capítulo I de Resultados, la sobreexpresión de *abrC3* en bajo número de copias en *S. coelicolor* provoca un incremento del 33 % en la producción de ACT a los 5 días de cultivo (Figura R.9). Además, el TCS AbrC1/C2/C3 es un sistema altamente conservado en *Streptomyces* y el RR AbrC3 tiene ortólogos en más de 20 especies en las que estos RRs, podrían activar la producción de antibióticos al igual que AbrC3 lo hace en *S. coelicolor*.

Por estas razones, el objetivo planteado en esta parte del trabajo fue estudiar si la sobreexpresión de *abrC3* en otras especies de *Streptomyces* también produciría la activación o el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios.

#### 4.1. SOBREEXPRESIÓN DE *abrC3* EN *S. lividans*

La primera especie en la que se llevó a cabo la sobreexpresión fue *S. lividans* 1326, especie en la que los *clusters* de ACT y RED se encuentran silenciados en la mayoría de las condiciones de laboratorio. Mediante transformación de protoplastos se introdujeron los plásmidos pHJL401 y pHJLabrC3, con los transformantes resultantes se inocularon cultivos líquidos de NB y se cuantificó la ACT producida por ellos (Figura R.27).



**Figura R.27.** A) Transformación de *S. lividans* 1326 con los plásmidos pHJL401 y pHJLabrC3 a los 6 días de crecimiento. B) Cuantificación de ACT (nM/ml de cultivo) en medio NB de las cepas *S. lividans* 1326(pHJL401) y *S. lividans* 1326(pHJLabrC3) a los 4 días. Las barras de error corresponden al error típico de la media. Los cuadros inferiores muestran los sobrenadantes de los cultivos que se cuantificaron.

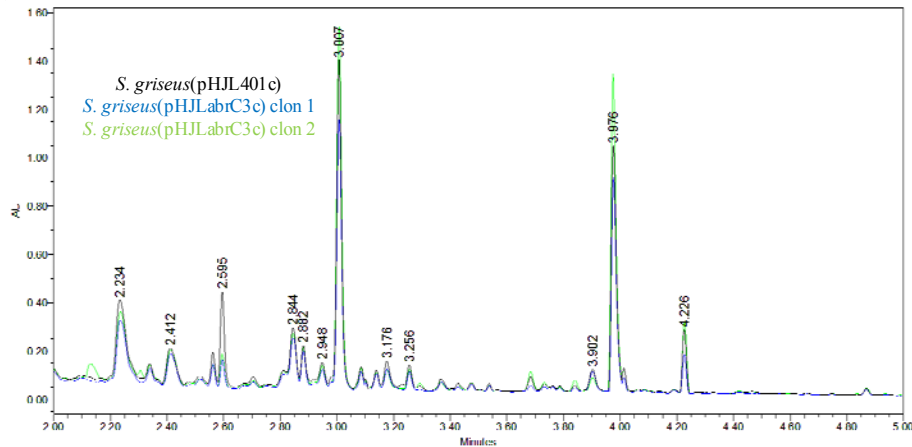
Así, la sobreexpresión de *abrC3* en *S. lividans* 1326 provocaba la activación del *cluster* de la ACT induciendo la producción del antibiótico incluso a mayores niveles que en *S. coelicolor* (52 nM/ml frente a 36 nM/ml).

#### **4.2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE *AbrC3* EN OTRAS ESPECIES DE *Streptomyces***

Tanto en *S. coelicolor* como en *S. lividans* el efecto observado en la sobreexpresión de *abrC3* en bajo número de copias fue un aumento en la producción de ACT. Así, el RR podría actuar de manera específica activando la expresión del *cluster* de este antibiótico sin afectar a la producción de otros metabolitos secundarios, o por el contrario y debido a su ubicuidad, podría activar otras rutas en diferentes especies. Por esta razón, se llevó a cabo la sobreexpresión de *abrC3* en otras especies de *Streptomyces* que no tuviesen el *cluster* de ACT y comprobar, si en alguna de ellas, provocaba un aumento de la producción de sus metabolitos secundarios o la síntesis de nuevos compuestos. Las especies utilizadas en este estudio fueron *S. albus*, *S. griseus*, *S. argillaceus*, *S. ambofaciens* y *S. rochei*.

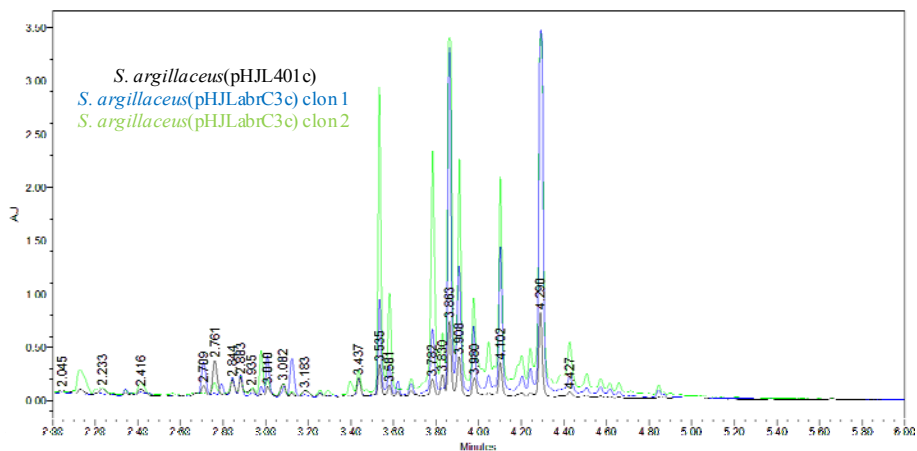
Para ello, se construyeron los plásmidos conjugativos pHJL401c y pHJLabrC3c clonando el origen de transferencia y el gen *aac(3)IV* de resistencia a apramicina en los plasmidos pHJL401 y pHJLabrC3 respectivamente como se describe en Materiales y Métodos. A continuación, estos plásmidos se introdujeron en las diferentes especies mediante conjugación intergenérica *E. coli* ET12567/pUZ8002 (pHJL401c o pHJLabrC3c) - *Streptomyces* sp. y por último, con los conjugantes resultantes de cada especie se inocularon los medios sólidos NA, R2YE y NMMP en placas multipocillo y se analizó la producción de metabolitos secundarios de estos cultivos mediante HPLC-MS.

La sobreexpresión de *abrC3* en bajo número de copias no tenía un efecto activador de la producción de metabolitos secundarios en la mayoría de las especies y condiciones estudiadas, como es el caso de *S. griseus*, en el que la producción era similar en la cepa que sobreexpresaba *abrC3* y la cepa control (Figura R.28).



**Figura R.28.** Análisis mediante HPLC-MS de la producción de metabolitos secundarios en medio NMMP de cultivos de las cepas de *S. griseus*(pHJL401c) (negro) y *S. griseus*(pHJLabrC3c) clon 1 y 2 (azul y verde).

Sin embargo, cuando la sobreexpresión de *abrC3* se realizaba en *S. argillaceus*, varios picos de metabolitos secundarios sin identificar aparecían en el análisis cromatográfico de los clones que sobreexpresaban el gen comparándolos con la cepa control (Figura R.29).



**Figura R.29.** Análisis mediante HPLC-MS de la producción de metabolitos secundarios en medio NMMP de cultivos de las cepas de *S. argillaceus*(pHJL401c) (negro) y *S. argillaceus*(pHJLabrC3c) clon 1 y 2 (azul y verde).

De esta forma, la sobreexpresión de *abrC3* podría utilizarse como herramienta para incrementar la producción y/o descubrir nuevos de metabolitos secundarios en diferentes especies de *Streptomyces* siendo una estrategia útil dada la creciente aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad y la necesidad de descubrir nuevos para combatir estas enfermedades infecciosas.



## CAPÍTULO 5

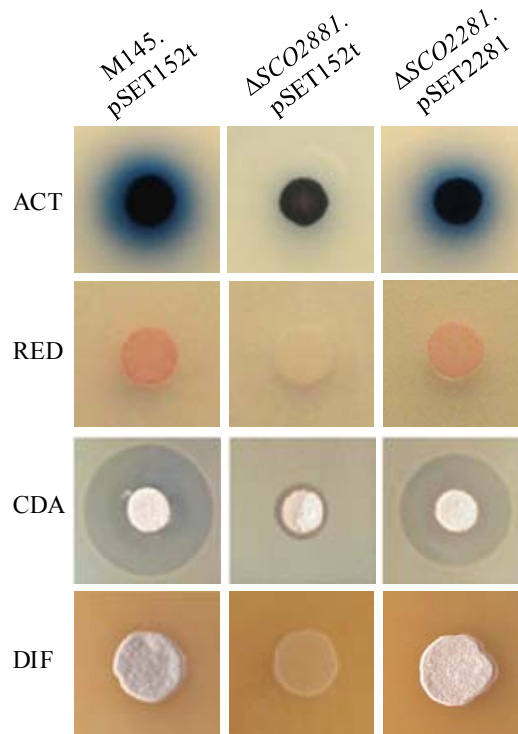
### GENES RELACIONADOS CON EL TCS AbrC1/C2/C3 Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Como se ha señalado en la Introducción, la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces* se compone de diversas redes de transducción de señales muy complejas y conectadas entre sí en las que participan numerosas proteínas a distintos niveles. En este apartado del trabajo se han estudiado dos reguladores transcripcionales que se encuentran relacionados con el sistema AbrC1/C2/C3: el RR huérfano SCO2281 y el factor de transcripción AbsR1.

#### **5.1. EL RR HUÉRFANO Aor1 (SCO2281)**

El RR SCO2281 comparte una identidad del 59 % con AbrC3, y en trabajos previos en los que se sugerían HKs implicadas en la fosforilación de RRs huérfanos en *S. coelicolor* (Wang *et al.*, 2009b), se identificó la posible fosforilación de SCO2281 por parte de la HK AbrC2. Esta reacción de fosfotransferencia se comprobó en la Tesis Doctoral (Yepes, 2010)

En este trabajo se construyó la cepa mutante de delección del gen *SCO2281* siguiendo el protocolo RE-DIRECT descrito en el Capítulo I de Resultados. A continuación, se realizó el estudio fenotípico de la cepa  $\Delta$ *SCO2281* empleando la misma metodología seguida en el estudio de la cepa  $\Delta$ *abrC3* y también se llevó a cabo la complementación de esta cepa con el plásmido integrativo pSET2281 derivado del vector pSET152t (Figura R.30).



**Figura R.30.** Estudio fenotípico y de complementación del mutante  $\Delta$ SCO2281. Cepas utilizadas: M145.pSET152t,  $\Delta$ SCO2281.pSET152t y  $\Delta$ SCO2281.pSET2281. Producción de ACT y RED en medio sólido NA. La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento, la de RED y CDA a los 2 días y la diferenciación (DIF) a los 3 días.

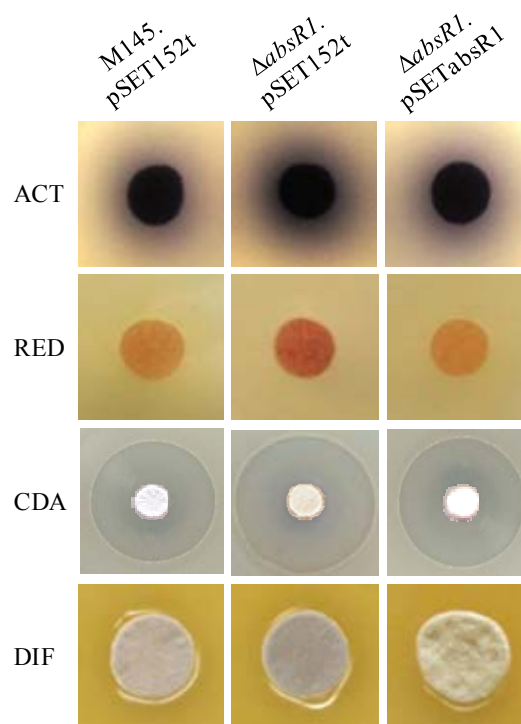
La cepa mutante  $\Delta$ SCO2281 mostraba una drástica disminución en la producción de ACT, RED y CDA, y además presentaba un retraso en la diferenciación morfológica. Cuando se integraba una copia del gen *SCO2281* junto a su promotor en el genoma de la cepa mutante, la menor producción de antibióticos y la diferenciación revertían, indicando que los efectos observados se debían a la delección del gen y no a efectos polares.

Estos resultados indicaban que *SCO2281* era una RR huérfano implicado en la activación de la síntesis de antibióticos y diferenciación morfológica en *S. coelicolor* y se le asignó el nombre de Aor1 (*Antibiotic Orphan Regulator*).

Actualmente, nuestro grupo de investigación está llevando a cabo un estudio más detallado de la función de Aor1 en *S. coelicolor*.

## 5.2. AbsR1, UN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL IMPLICADO EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Por otro lado, en este trabajo se describió que la expresión del gen *absR1* era activada directamente por AbrC3 (Resultados 3) así, AbsR1 sería un factor transcripcional que se encontraría en niveles inferiores en la vía de señalización del sistema AbrC1/C2/C3. Por esta razón, se llevó a cabo la delección del gen por el mismo método que en los casos anteriores y se realizó el estudio del fenotipo y complementación de la cepa mutante  $\Delta absR1$  utilizando el plásmido integrativo pSETabsR1 (ver Materiales y Métodos) (Figura R.31).



**Figura R.31.** Estudio fenotípico y de complementación del mutante  $\Delta absR1$ . Cepas utilizadas: M145.pSET152t,  $\Delta absR1$ .pSET152t y  $\Delta absR1$ .pSETabsR1. Producción de ACT y RED en medio sólido NA. La producción de ACT se observó a los 3 días de crecimiento, la de RED y CDA a los 2 días y la diferenciación (DIF) a los 3 días.

La cepa  $\Delta absR1$  presentaba efectos pleiotrópicos ya que producía mayor cantidad de ACT, RED y CDA y presentaba una diferenciación morfológica acelerada, fenotipo que revertía cuando se complementaba la cepa mutante integrando una copia del gen junto a su promotor en el genoma.

Este hecho indicaba que AbsR1 era un regulador transcripcional implicado en la síntesis de antibióticos y desarrollo del ciclo celular que formaba parte de la compleja red de regulación reprimiendo estos procesos.





# Discusión |



Los sistemas de dos componentes son la principal vía de señalización en bacterias permitiéndolas reconocer gran variedad de estímulos ambientales y fisiológicos, integrar la información y elaborar una respuesta rápida y adecuada frente a los distintos cambios. Así, en el genoma de *S. coelicolor* se han identificado 87 RRs y 100 HKs, lo que supone el 0,86 % de sus genes, una proporción mayor que en el resto de bacterias de vida libre en las que los TCSs representan el 0,65 % de sus genes (<http://www.p2cs.org>). Este hecho se debe a que el hábitat natural de *S. coelicolor* es el suelo, donde las condiciones son muy variables y precisa responder al amplio rango de estímulos a los que se enfrenta.

En *S. coelicolor* sólo se conoce la función de 17 TCSs, una HK huérfana y dos RRs huérfanos que se encuentran implicados en la regulación de procesos tan diversos como el mantenimiento de la pared celular (Paget *et al.*, 1999; Homerova *et al.*, 2002), la resistencia a vancomicina (Hong *et al.*, 2004), la secreción en respuesta a estrés (Gullón *et al.*, 2012), la osmoadaptación (Bishop *et al.*, 2004) o la esporulación (San Paolo *et al.*, 2006). Además, 15 de ellos están implicados en la regulación de la producción de antibióticos, indicando el importante papel que juegan los TCSs en el complejo control de la síntesis de metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.*, 2013).

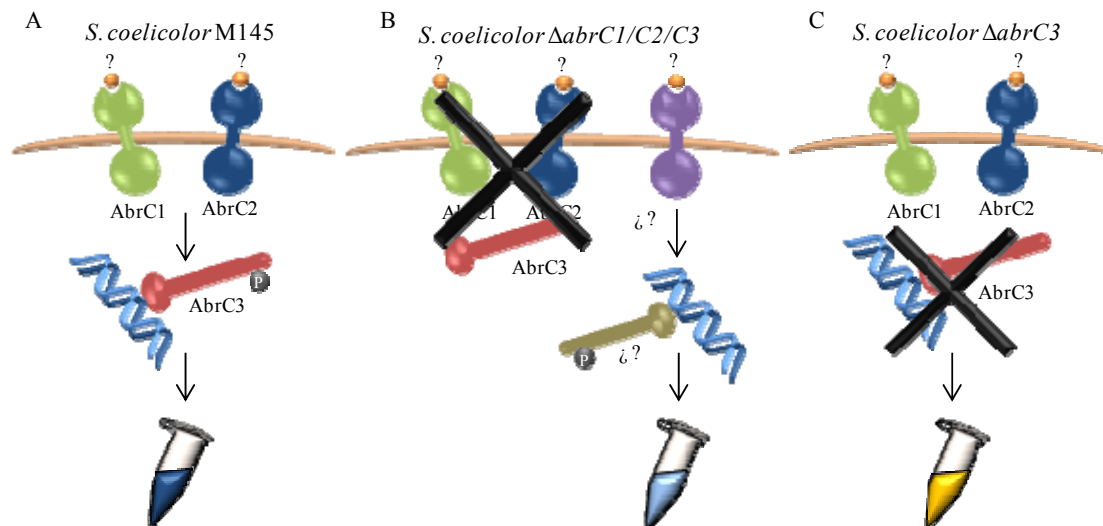
El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar el RR AbrC3 (*SCO4596*), que junto a dos HKs (*SCO4598/97*), forman el TCS atípico AbrC1/C2/C3 implicado en la regulación de la producción de antibióticos y diferenciación morfológica (Yepes *et al.*, 2011). Se trata de un sistema muy conservado en otras especies de *Streptomyces* y actinomicetos que presentan, al menos, el RR y una de las HKs, por lo que podría ejercer una función importante en la fisiología de estos microorganismos.

Para ello se ha construido la cepa mutante carente del gen *abrC3* y se ha realizado su estudio fenotípico comprobando su relación con dichos procesos. También se ha llevado a cabo el análisis global de las diferencias de expresión génica entre la cepa parental M145 y la cepa mutante  $\Delta$ *abrC3* y se han identificado las dianas moleculares de AbrC3 mediante ChIP-chip. Además, se ha propuesto una posible aplicación de AbrC3 para el aumento de la producción y descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios. Por último, se ha iniciado el estudio de genes relacionados con el sistema AbrC1/C2/C3 involucrados en el control de la síntesis de antibióticos.

## 1. AbrC3, UN RR CON EFECTOS PLEIOTRÓPICOS

El regulador AbrC3 ejerce un control positivo de la producción de antibióticos activando la síntesis de ACT y RED, así la cepa mutante carente de *abrC3* muestra una disminución de la producción de estos antibióticos dependiente de las condiciones de cultivo. Sin embargo, la producción de CDA no se encuentra afectada mientras que en el triple mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$  sí lo está. Este hecho podría deberse a que las HKs AbrC1 y AbrC2 también activen rutas alternativas a través de otro u otros RRs que no formen parte de su sistema y que serían los responsables de la activación de la producción de CDA. La existencia de 13 RR huérfanos (sin HK asociada) en el genoma de *S. coelicolor* hace necesaria la participación de HKs de TCSs y/o huérfanas en su activación. En trabajos previos en nuestro laboratorio se ha comprobado que el RR huérfano Aor1 (*SCO2281*), el cual comparte gran similitud con AbrC3 (59 %) y al que otros autores habían sugerido como posible diana de fosforilación de AbrC2 (Wang *et al.*, 2009b), es efectivamente fosforilado “in vitro” por la HK AbrC2 (Yepes, 2010). Además, en este trabajo se ha demostrado que la cepa  $\Delta aor1$  muestra una disminución en la síntesis de metabolitos secundarios, entre ellos el CDA. Por lo tanto, Aor1 parece ser uno de los posibles candidatos para activar la ruta de este antibiótico después de ser fosforilado y activado por AbrC2. Por otro lado, el hecho de que los genes de las HKs forman unidades transcripcionales independientes al RR, como se discutirá más adelante, sugiere que su expresión podría estar regulada de forma diferente a la de *abrC3* y se dieran situaciones en las que se expresaran ellas y no el RR, participando en la activación de otros RRs como Aor1.

AbrC3 juega un papel clave en la activación de la síntesis de ACT en determinadas condiciones de cultivo, como en medio líquido NB en el que la cepa  $\Delta abrC3$  no es capaz de producir este antibiótico, mientras que el mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$  produce en torno a un 70 % de los niveles de la cepa M145. Este hecho podría deberse a que cuando todo el TCS no está presente, actúan otras vías de señalización secundarias que activan la producción de ACT de forma menos eficiente (Figura D.1.B). Sin embargo, cuando sólo está ausente el RR, las HKs captarían la señal y activarían la ruta de ACT, por lo tanto no sería necesaria la activación del sistema secundario, pero al no estar presente AbrC3 la vía de señalización se interrumpiría y como resultado no se produciría la síntesis del antibiótico (Figura D.1.C).



**Figura D.1.** Esquema de la posible regulación de la producción de ACT en *S. coelicolor* M145 (A),  $\Delta$ *abrC1/C2/C3 (B) y  $\Delta$ *abrC3 (C).**

En concordancia con este fenotipo, la mayoría de los genes que forman el *cluster* de ACT se encuentran subexpresados en la cepa carente de *abrC3*, genes entre los que se encuentra *actII-ORF4*, el CSR encargado de controlar la expresión del *cluster* biosintético. Los ensayos ChIP-chip han permitido identificar a AbrC3 como un activador directo de la síntesis de ACT al detectarse su unión a *actII-ORF4* a las 36 horas, unión que se traduce en un aumento de la expresión del *cluster* a las 48 horas. Así, la posible función de AbrC3 sería participar en el reclutamiento de factores de iniciación y otras proteínas del complejo de transcripción que una vez establecido, se liberaría para permitir la expresión del gen.

A través del alineamiento de los promotores identificados como dianas de AbrC3, se ha establecido la secuencia de 10 nucleótidos 5'-GAASGSGRMS-3' como el sitio de unión del RR a *actII-ORF4*. Esta secuencia se encuentra en las posiciones +72/+81 del gen, sin embargo, no es el único activador de la expresión de *actII-ORF4* cuyo sitio de unión se encuentra dentro del ORF, tanto AtrA (Uguru *et al.*, 2005) como Crp (Gao *et al.*, 2012) se unen en posiciones +45/+69 y +24/+38 respectivamente.

Como se ha comentado en la introducción, la expresión de *actII-ORF4* está controlada por más de una docena de factores de transcripción, sin embargo, sólo se ha demostrado la unión e identificado la secuencia de reconocimiento en la región promotora del gen de alguno de ellos (Figura D.2).

***actII-ORF4p***

AGCCGTATCAGGAATGCCAGATTCTATTGATTCCGGAAGCCTCGACC  
AtrA

ACTGCCTCTCGGTAAAATCCAGCAAAAATTAATCAGTGCAGCTCGCT  
*actII-ORF3* ← DraR

GCACTGATTAATTTTTGATCAATAGGAGATCGCTTGTGACGGCAAG  
AfsQ1

CACATTGAAAATCTGTTGAGTAGGCCTGTTATTGTGCCCCCAGGAGA  
-35 -10

CGGAGAATCTCGACGGGGGCGCAGATGAGATTCAACTTATTGGGAC  
+1 → *actII-ORF4*

GTGCCATGTAATCACCGATGCGGGATGTGTAATTCCGCTTAAAT  
Crp AtrA

CCTCGAAGGCGACCCAGCTCCTGGTGCTGCTGCTCCTCAGGCGGCAC  
AbrC3

GAGGTGGTGGGATCGGGGGTGTCTATCGAGGAGTTGTGGCGGACC

ACCCGCCCCGCAGCGCCATGACGACGCTGCAGACGTACGTGTACCAC

ACCCGCCGGCTGCTGGGGGAGCACCGGGTGACGAGCGACGACCGG  
Crp

**Figura D.2.** Secuencias de reconocimiento de los reguladores transcripcionales que controlan la expresión del gen *actII-ORF4*.

Por ejemplo, mediante EMSAs se ha detectado unión a *actII-ORF4* de los reguladores AtrA, (Uguru *et al.*, 2005), DraR (Wang *et al.*, 2013) o AfsQ1 (Yu *et al.*, 2012). Además, ensayos de captura de ADN por afinidad han identificado a los reguladores SCO0310, SCO3932, SCO5405 y AdpA como reguladores directos del CSR (Park *et al.*, 2009). Sin embargo, “in vivo” sólo se han detectado uniones a *actII-ORF4* de tres reguladores transcripcionales: de AbsA2 en ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (McKenzie y Nodwell, 2007) y de Crp y AbrC3 por ChIP-chip (Gao *et al.*, 2012; Rico *et al.*, 2014).

Todos estos resultados apuntan a que la expresión del CSR *actII-ORF4* está controlada por diversos reguladores que responden a diferentes estímulos. Así un mismo proceso, como es la producción de ACT, es el efecto final de múltiples vías de señalización sugiriendo la importancia de esta molécula para la bacteria.

La cepa  $\Delta$ *abrC3* también muestra una disminución en la producción de RED pero los genes de este *cluster* biosintético no se encuentran subexpresados ni se ha detectado unión de AbrC3 a los CSRs *redD* y *redZ*. Sin embargo, la producción de RED comienza antes que la de ACT y la expresión de estos genes se produce alrededor de las 16 horas (Huang *et al.*, 2001). El primer tiempo de este estudio es a las 36 horas, por lo que puede no haberse detectado dicha unión ni la variación en los niveles de expresión del

*cluster* y no se puede descartar el control directo de AbrC3 sobre la síntesis de RED mediante estos estudios. En el caso de que la regulación fuese indirecta, podría llevarse a cabo a través de factores cuyos genes sí que se encuentra subexpresados en la cepa  $\Delta abrC3$ , por ejemplo AfsS, cuyo mutante de delección también muestra una disminución en la producción de RED (Lee *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2008), o sIHF, factor de integración que regula de manera directa la producción de RED a través de su unión a *redD* y *redZ* (Park *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012).

La cepa  $\Delta abrC3$  también muestra un retraso en la diferenciación morfológica que podría deberse a la subexpresión de genes implicados en la diferenciación morfológica como *sIHF*. La cepa carente de este factor de integración muestra un marcado retraso en el desarrollo morfológico y es prácticamente incapaz de producir esporas. Además mediante EMSA se ha demostrado que se une al promotor del gen *bldD*, un regulador clave en el desarrollo de *S. coelicolor* (Yang *et al.*, 2012). También se encuentran subexpresados los genes *wblE*, que codifica un factor sigma con función extracitoplásmica (Homerova *et al.*, 2003; Fowler-Goldsworthy *et al.*, 2011), *bdtA*, homólogo de *bldC* en *S. coelicolor* cuya expresión se encuentra regulada por BldD (Elliot *et al.*, 2001; den Hengst *et al.*, 2010) y *absR1*, que como se ha demostrado en este trabajo, también está implicado en la regulación de la diferenciación morfológica.

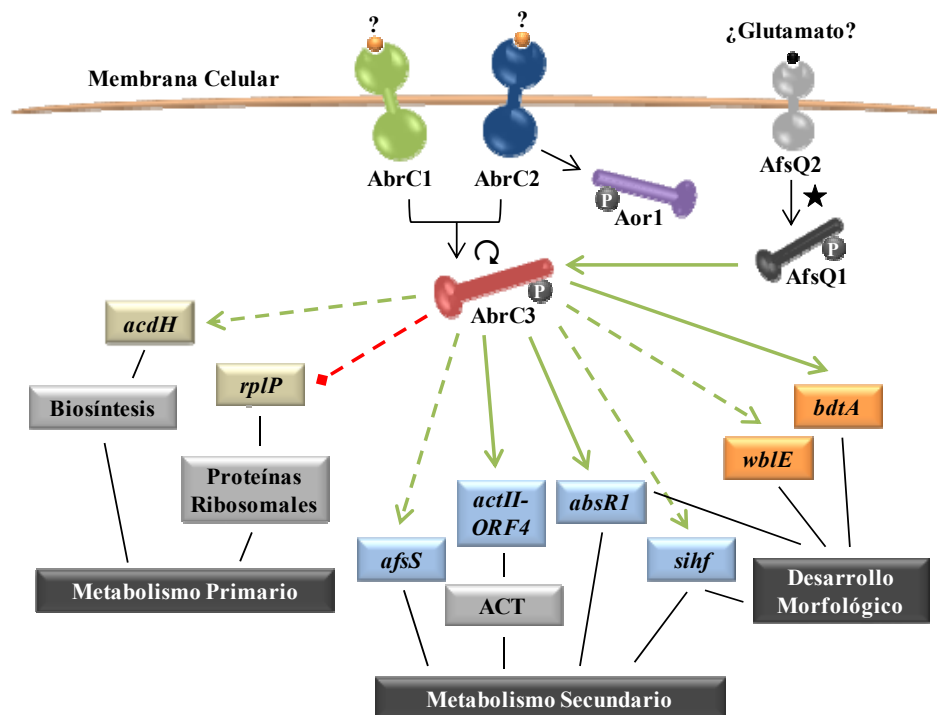
La secuencia de unión de AbrC3 5'-GAASGSGRMS-3' propuesta en este trabajo se encuentra en el 77 % de las 35 dianas identificadas en el estudio de CHIP-chip. En la mayoría de estos genes, la secuencia se encuentra en la región promotora, sugiriendo el control de la expresión del gen posterior, sin embargo, en alguno de estos genes la región se localiza dentro de la secuencia codificante, como en *actII-ORF4*. Este hecho se ha descrito en el estudio de otros reguladores como Crp, en el que más del 50 % de sus secuencias de unión se encuentran dentro de los ORFs (Gao *et al.*, 2012) o AtrA, cuyas dos secuencias de reconocimiento se localizan al final del gen *actII-ORF3* y al inicio de *actII-ORF4* (Uguru *et al.*, 2005) (Figura D.2). La función de estas secuencias se desconoce, y en algunos casos no intervienen en el control de la expresión del gen que las presenta, como ocurre en la regulación ejercida por AdpA, en el que el 75 % de las secuencias que se localizan dentro de los genes aparentemente no tienen relevancia biológica (Higo *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los ensayos ChIP-chip puede que algunas dianas moleculares de AbrC3 no hayan sido identificadas debido a que en los promotores de estos genes, el RR forme un complejo junto a otros factores y/o co-factores de la transcripción que bloqueen el acceso de los anticuerpos a AbrC3, resultando estos promotores falsos negativos (Bucca *et al.*, 2009).

Un esquema de las principales interacciones de AbrC3 identificadas en este trabajo se recoge en la Figura D.3. Este RR muestra un efecto global positivo sobre la síntesis de metabolitos secundarios de forma directa regulando la producción de ACT a través de su unión al gen del CSR *actII-ORF4*, y también de forma indirecta a través de genes implicados en el control de la síntesis de antibióticos como *afsS*, *absR1* o *sHIF*. Además, AbrC3 activa de manera indirecta la expresión de genes de enzimas como *acdH*, una Acil-CoA deshidrogenasa implicada en la síntesis de precursores de los antibióticos ACT y RED. Esta activación del metabolismo secundario podría estar favorecida a través del control negativo ejercido por AbrC3 sobre genes típicamente del metabolismo primario con el de la proteína ribosomal *rplP*. Por último, AbrC3 también regula la diferenciación morfológica a través de genes implicados en desarrollo como *bdtA*, *wblE*, *sIHF* y *absR1*.

Otras vías parecen confluir en la ruta de señalización propuesta en esta tesis. En el trabajo (Wang *et al.*, 2013) se ha descrito que el RR AfsQ1 activa directamente la expresión de *abrC3*, por lo que la regulación ejercida por el TCS AfsQ1/Q2 se lleva a cabo, en parte, a través de AbrC3. Además, el RR huérfano Aor1 es fosforilado por AbrC2 (Yepes, 2010) pudiendo participar en procesos de regulación diferentes a AbrC3 ampliando el número de efectores, y posiblemente de respuestas, activados por una misma HK. Así, todas estas interacciones del TCS AbrC1/C2/C3 muestran la gran complejidad de las rutas de señalización a la que está sometida la síntesis de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*.





**Figura D.3.** Esquema del posible modelo de regulación ejercido por AbrC3 sobre el metabolismo primario, secundario y diferenciación morfológica.  $\longrightarrow$  control positivo;  $\longleftarrow$  control negativo;  $\longrightarrow$  control directo;  $\dashrightarrow$  control indirecto. (★) datos de Wang *et al.*, 2013.

Además, para intentar comprender mejor esta red de interacciones se ha realizado el estudio detallado del mutante  $\Delta absR1$  obtenido en este trabajo. Los resultados han demostrado que AbsR1 ejerce una función negativa sobre los procesos de diferenciación celular y de la producción de los tres antibióticos. Este hecho parece contradecir que en el mutante  $\Delta abrC3$ , en el cual hay una disminución en estos eventos, esté subexpresado el gen *absR1*. Así, AbrC3 estaría activando directamente el *cluster* de producción de ACT y además estaría inhibiendo su producción a través de la activación de *absR1*. Todos estos resultados apuntan a una regulación muy fina en la que intervienen muchos factores y el equilibrio final entre todos ellos es el desencadenante de la producción de antibióticos final.

## 2. SISTEMA AbrC1/C2/C3, UN TCS ATÍPICO DE *S. coelicolor*

El modelo típico de TCS está formado por una HK y un RR que actúan en conjunto y cuyos genes se encuentran adyacentes en el genoma formando una única unidad transcripcional. Sin embargo, en el genoma de *S. coelicolor* se han identificado dos sistemas compuestos por tres componentes, uno de ellos es el TCS AbrC1/C2/C3, compuesto por dos HKs y un RR y que es objeto de este estudio.

En un primer momento se creyó que cada gen del sistema formaba una unidad transcripcional independiente ya que se encontraban separados por regiones intergénicas que podrían corresponder a las zonas promotoras de cada gen. Así, se ha llevado a cabo el análisis de la expresión de los genes de manera individual en diferentes condiciones de cultivo mediante RT-qPCR (manuscrito en preparación) (Rodríguez *et al.*). Los niveles de expresión de ambas quinasas eran muy similares en todas las condiciones y tiempos del análisis lo que podría indicar que forman una única unidad transcripcional, hecho que se ha comprobado posteriormente al detectarse el transcrito conjunto de las dos HKs. Sin embargo, no se ha detectado el transcrito de todo el sistema y sí de *abrC3* individual, sugiriendo que el RR es una unidad transcripcional independiente.

La búsqueda de las dianas moleculares del RR AbrC3 mediante ChIP-chip ha permitido identificarlo como un auto-regulador debido a que se ha detectado unión a su propio gen. Sin embargo, se desconoce si lo hace como activador o represor de su expresión, pudiendo actuar como ambos en función de las condiciones de cultivo y necesidades fisiológicas como ocurre en otros RRs (Ray y Igoshin, 2010). Así, AbrC3 presenta una regulación semi-autónoma en función de la clasificación establecida por (Olivera *et al.*, 2010), es decir, la expresión de su gen está controlada por él mismo y por otros factores transcripcionales como el RR AfsQ1, que se une a la región promotora de *abrC3* activando su expresión (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha detectado unión de AbrC3 en la región promotora de los genes *abrC1-abrC2* ni su expresión se encontraba modificada en la cepa mutante  $\Delta abrC3$  a ningún tiempo de estudio lo que indica que el RR no ejerce ningún control en la expresión de los genes de las HKs del TCS.

En el TGF (Franco, 2013) se observó una mayor producción de antibióticos en la cepa mutante  $\Delta abrC1$  mientras que en la cepa  $\Delta abrC2$  la producción era similar a la cepa M145. Estos resultados apuntan a que las HKs, aunque son muy similares ya que los genes *abrC1* y *abrC2* comparten un 83 % de homología de secuencia, actúan de manera diferente a la hora de activar a AbrC3. La mayor influencia de la HK AbrC2 en la activación de AbrC3 también se ha demostrado en los ensayos de complementación del triple mutante  $\Delta abrC1/C2/C3$  ya que el fenotipo de esta cepa también revertía al integrar en el genoma los genes *abrC2/C3* (situación equivalente al mutante  $\Delta abrC1$ ) pero no los genes *abrC1/C3* (situación equivalente al mutante  $\Delta abrC2$ ) (Yepes *et al.*, 2011).

Por otro lado, los estudios de sobreexpresión de *abrC3* y sus versiones fosfoablativa y fosfomimética han permitido establecer una relación directa entre la toxicidad inducida por la sobreexpresión del gen en la cepa M145 y los niveles de fosforilación de AbrC3. La mayor participación de AbrC2 en la activación del RR también se ha podido observar en estos ensayos ya que la toxicidad ha resultado ser superior al sobreexpresar *abrC3* en la cepa  $\Delta\text{abrC1}$  que en  $\Delta\text{abrC2}$ . Además, la toxicidad en estas dos cepas mutantes ha sido incluso mayor que en la cepa M145, por lo que la sobreexpresión de *abrC3* es más tóxica cuando el RR se encuentra en exceso y está presente sólo una HK para fosforilarlo y activarlo. Así, la conclusión es que parece ser necesaria la presencia de ambas HKs para mantener el equilibrio en la cinética de fosforilación-desfosforilación de AbrC3 por parte de AbrC1 y AbrC2 y haya cantidades correctas del RR fosforilado para activar la producción de ACT.

### **3. AbrC3 COMO ACTIVADOR DEL METABOLISMO SECUNDARIO**

En la actualidad, el descubrimiento de nuevos compuestos antibióticos y la mejora de los procesos de producción son una prioridad en la biotecnología microbiana debido a la aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos disponibles. Además, AbrC3 se encuentra en las cuatro especies secuenciadas que han sido utilizadas en este trabajo (*S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. griseus* y *S. albus*) y también es posible que esté presente en las otras tres especies cuyo genoma aún no está disponible (*S. argillaceus*, *S. ambofaciens* y *S. rochei*) ya que el TCS AbrC1/C2/C3 es un sistema muy conservado en el género *Streptomyces* y en otros actinomicetales.

En este trabajo, teniendo en cuenta que AbrC3 es un RR muy conservado en el género *Streptomyces* y su función activadora de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, se ha descrito una posible aplicación de AbrC3 para el descubrimiento y optimización de la producción de metabolitos secundarios. Así, la mayor dosis de *abrC3* ha mostrado tener un claro efecto activador de la producción de ACT en *S. coelicolor*, resultado esperable ya que en este trabajo se ha demostrado que AbrC3 es un activador directo de la síntesis del antibiótico. El mismo efecto se ha observado en *S. lividans*, induciendo la producción de ACT incluso a niveles mayores que en *S. coelicolor*, hecho importante ya que esta especie tiene en su genoma el *cluster* de ACT pero no lo expresa de forma

natural en las condiciones de laboratorio. Además, la sobreexpresión de *abrC3* en la especie no productora de ACT *S. argillaceus* ha mostrado un efecto activador del metabolismo secundario al producir varios metabolitos secundarios no identificados en este trabajo.

Por lo tanto, AbrC3 también actúa como activador de la producción de otros compuestos diferentes a ACT y podría ser utilizado en estudios similares a mayor escala utilizando más cepas de *Streptomyces* y condiciones de cultivo.

# Conclusiones |



1. El RR AbrC3 es un regulador pleiotrópico que ejerce un control positivo sobre la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodiginina y sobre la diferenciación morfológica en *S. coelicolor* M145. Los efectos negativos exhibidos por el mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *abrC3* en ambos procesos se deben a la delección del gen y no a efectos polares derivados de la mutación.
2. Entre los genes regulados, directa o indirectamente, por AbrC3 se encuentran algunos relacionados con el metabolismo primario como *acdH* y *rplP*, con el metabolismo secundario como *absR1*, *afsS*, *sIHF* y *actII-ORF4* y con la diferenciación morfológica como *bdtA* y *wblE*.
3. AbrC3 reconoce la secuencia de diez nucleótidos 5'-GAASGSGRMS-3' en los genes cuya expresión regula como *actII-ORF4*, *abrC3*, *absR1*, *SCO0736*, *bfr*, *bdtA* y *SCO6809*.
4. AbrC3 activa de forma directa la producción de actinorrodina al unirse al gen del CSR *actII-ORF4*, promoviendo su expresión y por lo tanto la del *cluster* biosintético.
5. El residuo fosforilable de AbrC3 es el Asp 61. Su cambio por Ala genera la versión fosfoablativa del RR que no puede ser fosforilada y ejercer su función. La versión fosfomimética se produce con las modificaciones Asp 12 por Ala y Asp 61 por Glu, siendo siempre activa, independiente de su fosforilación.
6. La sobreexpresión de *abrC3* en bajo número de copias muestra un efecto inductor de la producción de ACT en *S. coelicolor* y *S. lividans*, y en *S. argillaceus* estimula la síntesis de nuevos metabolitos secundarios no identificados.
7. Los genes de las HKs del sistema AbrC1 y AbrC2 forman una unidad transcripcional independiente al RR y su expresión no está controlada por AbrC3.
8. La HK AbrC2 presenta mayor actividad que AbrC1 a la hora de fosforilar a AbrC3. Así, la integración de los genes *abrC2/abrC3* en la cepa mutante triple  $\Delta$ *abrC1/C2/C3* es suficiente para revertir su fenotipo de menor producción de antibióticos.
9. El RR huérfano Aor1 y el regulador transcripcional AbsR1 muestran efectos pleiotrópicos positivos y negativos respectivamente sobre la producción de los antibióticos actinorrodina, undecilprodiginina y antibióticos dependiente de calcio y sobre la diferenciación morfológica. Estos efectos se deben a las delecciones de los genes y no a efectos polares derivados de las mutaciones.





# Materiales y Métodos |



## 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla M&M.1.

**Tabla M&M.1.** Microorganismos utilizados en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>S. coelicolor</i> A3(2)M145	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ abrC1/C2/C3	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ abrC1	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145	(Franco, 2013)
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ abrC2	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145	(Franco, 2013)
<i>S. lividans</i> 1326	SLP1 <sup>+</sup> SLP2 <sup>+</sup>	(Hopwood <i>et al.</i> , 1983)
<i>S. albus</i> J1074	<i>val, ile, salGI</i>	(Chater y Wilde, 1980)
<i>S. griseus</i> IMRU 3570	Cepa silvestre	IMRU
<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	Cepa silvestre	ATCC
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	Cepa silvestre	(Pinnert-Sindico, 1954)
<i>S. rochei</i> CECT 3329	Cepa silvestre	CECT
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80dlacZ[M15, [( <i>lacZYAargF</i> )U169, <i>recA1, endA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BW25113	Derivada de <i>E. coli</i> K12: $\Delta$ araBAD, $\Delta$ rhaBAD	(Datsenko y Wanner, 2000)
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>dcm, ompT, hsdS (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-)</i> gal $\lambda$ (DE3)	(Studier y Moffatt, 1986)
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 4522	Cepa silvestre	CECT

## 2. VECTORES UTILIZADOS

Los vectores utilizados y generados se muestran en la Tabla M&M.2.

**Tabla M&M.2.** Vectores utilizados y generados en este trabajo.

Vector	Características	Referencia
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam, beta, exo</i> ), <i>cat, araC, rep101<sup>ts</sup></i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ773	<i>aac(3)IV, oriT</i> , sitios FRT	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pUZ8002	<i>tra, neo, RP4</i>	(Paget <i>et al.</i> , 1999)
SCD20	Derivado del Supercos-1: <i>bla, neo</i> . Contiene los genes <i>SCO4596/97/98</i>	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
$\Delta$ SCD20-2	SCD20 $\Delta$ SCO4596:: <i>aac(3)IV</i>	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
SCC30	Derivado del Supercos-1: <i>bla, neo</i> . Contiene el gen <i>SCO2281</i>	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
$\Delta$ SCC30-1	SCC30 $\Delta$ SCO2281:: <i>aac(3)IV</i>	Este trabajo
SC8F11	Derivado del Supercos-1: <i>bla, neo</i> . Contiene el gen <i>SCO6992</i>	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
$\Delta$ SC8F11-1	SC8F11 $\Delta$ SCO6992:: <i>aac(3)IV</i>	Este trabajo
pXHis1	Plásmido de <i>E. coli</i> , <i>bla</i>	(Adham <i>et al.</i> , 2001)
pN702GEM3	Vector bifuncional de alto número de copias, <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> , <i>neo</i>	(Fernández-Ábalos <i>et al.</i> , 2003)

pNX24	Derivado del pN702GEM3. Promotor <i>xysA</i> de <i>S. halstedii</i> controlando la expresión de xylanasa	(Díaz <i>et al.</i> , 2005)
pNXabrC3	Derivado del pN702GEM3, expresa el RR <i>abrC3(His)<sub>6</sub></i> clonado bajo el promotor <i>xysA</i>	(Yepes, 2010)
pNXabrC3-DA	Similar a pNXabrC3 pero AbrC3 presenta el cambio de Asp-61 por Ala	Este trabajo
pNXabrC3-DE	Similar a pNXabrC3 pero AbrC3 presenta el cambio de Asp-61 por Glu	Este trabajo
pNXabrC3-DADE	Similar a pNXabrC3 pero AbrC3 presenta los cambios Asp-61 por Glu y el Asp-12 por Ala	Este trabajo
pHJL401	Vector bifuncional de bajo número de copias <i>E. coli-Streptomyces</i> , <i>bla</i> y <i>tsr</i>	(Larson y Hershberger, 1986)
pHJLabrC3	Derivado de pHJL401, expresa el RR <i>abrC3</i> clonado bajo su propio promotor	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pHJL401c	Vector conjugativo de bajo número de copias <i>E. coli-Streptomyces</i> , <i>bla</i> , <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i>	Este trabajo
pHJLabrC3c	Derivado de pHJL401c, expresa el RR <i>abrC3</i> clonado bajo su propio promotor	Este trabajo
pSET152t	Plásmido bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , integrativo en $\phi$ C31, <i>tsr</i> y <i>aac(3)IV</i>	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pSETabrC3	Derivado de pSET152t, expresa el RR <i>abrC3</i> clonado bajo su propio promotor	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pKC796Hyg	Plásmido bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , integrativo en $\phi$ C31, <i>hyg</i>	(Díaz <i>et al.</i> , 2005)
pHabrC1/C2/C3	Derivado de pKC796Hyg, expresa los genes <i>abrC1/C2/C3</i> clonados bajo sus propios promotores	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
pHabrC1/C3	Derivado de pKC796Hyg, expresa los genes <i>abrC1/C3</i> clonados bajo sus propios promotores	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
pHabrC2/C3	Derivado de pKC796Hyg, expresa los genes <i>abrC2/C3</i> clonados bajo sus propios promotores	(Yepes <i>et al.</i> , 2011)
pET22(b)	Promotor T7, <i>lacI</i> , etiqueta con 6xHis, <i>bla</i>	Novagen
pETabrC3	Derivado del pET22b, expresa el RR AbrC3(His) <sub>6</sub>	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pGEM-TEasy	Promotor T7 y SP6, <i>lacZ</i> , <i>bla</i>	Promega
pGEM-TactII-ORF4p	Derivado de pGEM-TEasy, contiene la segunda mitad de <i>actII-ORF4p</i>	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pGEM-TactII-ORF4pDel	Derivado de pGEM-TEasy, contiene la segunda mitad de <i>actII-ORF4p</i> sin la secuencia consenso de AbrC3	(Rico <i>et al.</i> , 2014)
pET2281	Derivado del pET22b, expresa el RR huérfano SCO2281(His) <sub>6</sub>	(Yepes, 2010)
pXHis2281	Derivado del pXHis1, expresa el RR <i>SCO2281</i> bajo el promotor <i>xysA</i>	Este trabajo
pHis2281	Derivado del pXHis1, expresa el RR <i>SCO2281</i> bajo su propio promotor	Este trabajo
pSET2281	Derivado de pSET152t, expresa el RR <i>SCO2281</i> bajo su propio promotor	Este trabajo
pSETabsR1	Derivado de pSET152t, expresa el RR <i>absR1</i> clonado bajo su propio promotor	Este trabajo

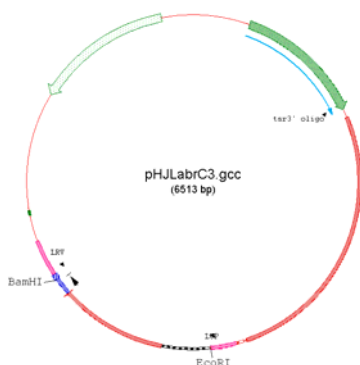
El vector **pSET152t** es un plásmido bifuncional, multicopia en *E. coli* e integativo en *Streptomyces* en el sitio de integración del fago  $\phi$ C31. Porta los genes *tsr* y *aac(3)IV* de resistencia a tiospreptona y apramicina respectivamente. Este plásmido se utilizó en los ensayos de complementación del mutante  $\Delta$ *abrC3*. El gen *abrC3* junto a su región promotora se clonó utilizando los oligonucleótidos SRG-01/SRG-02 con los sitios de corte NdeI y BamHI respectivamente y se obtuvo el plásmido **pSETabrC3** (Figura M&M.1).



**Figura M&M.1.** Plásmido pSETabrC3

La construcción de **pSET2281** se llevó a cabo en varias etapas ya que el *SCO2281* es el segundo gen de un operón que forma junto a otros tres. Así, partiendo del plásmido pET2281 (Yepes, 2010), el gen se clonó en el vector pXHis1 utilizando los sitios de corte NdeI y XhoI resultando pXHis2281 y quedando este gen bajo el promotor de *xysA*. A continuación, mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos SRG-37/SRG-38 se obtuvo su zona promotora con la que se sustituyó la de *xysA* mediante el corte con NdeI/EcoRI obteniendo el plásmido pHis2281. Por último, el fragmento correspondiente a *SCO2281* más su región promotora se digirió con BglII y se clonó sobre el sitio de corte BamHI previamente desfosforilado de pSET152t obteniendo el plásmido pSET2281.

El plásmido **pSETabsR1** se construyó amplificando el gen *absR1* junto a su promotor por PCR utilizando los oligonucleótidos LS-75/LS-76 y a continuación se clonó con los sitios de corte de NdeI y BglII en el vector pSET152t en los sitios NdeI y BamHI.

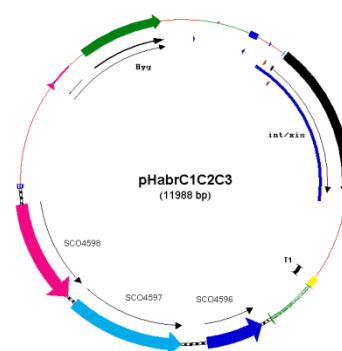


**Figura M&M.2.** Plásmido pHJLabrC3

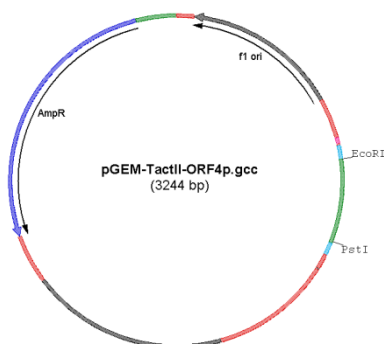
El vector **pHJL401** es bifuncional *E. coli*-*Streptomyces*, de bajo número de copias (5-10 copias) y porta los genes *bla* y *tsr* de resistencia a ampicilina y tiospreptona respectivamente. El gen *abrC3* se clonó junto a su promotor utilizando los sitios BamHI y EcoRI obteniendo el plásmido **pHJLabrC3**, usado en ensayos de sobreexpresión de *abrC3* en bajo número de copias

(Figura M&M.2). Para llevar a cabo las conjugaciones *E. coli-Streptomyces* con estos plásmidos se utilizaron los vectores **pHJL401c** y **pHJLabrC3c**. Para construirlos, sobre el sitio de corte EcoRV previamente desfosforilado, se clonó el fragmento del vector pIJ773 digerido en ambos extremos con PvuII y que contenía el origen de transferencia y el gen *aac(3)IV*.

El plásmido **pKC796Hyg** es un vector bifuncional, multicopia en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces* en el sitio de integración del fago  $\phi$ C31 y que porta el gen de resistencia a higromicina. Sobre él se clonaron los genes *abrC1/C2/C3* bajo el control de sus promotores para construir el plásmido **pHabrC1/C2/C3** (Figura M&M.3) utilizado en la complementación de la cepa triple mutante  $\Delta$ *abrC1/C2/C3* (Yepes, 2010). A partir del él derivan **pHabrC1/C3** y **pHabrC2/C3**. El primero se construyó eliminando un fragmento de 1180 nucleótidos del gen *abrC2* mediante el corte con las enzimas de restricción SfiI/AgeI y tratamiento con la polimerasa T4 previo a la ligación. El segundo se construyó eliminando un fragmento de 260 nucleótidos del gen *abrC1* digiriendo con la enzima XhoI y posterior religación.



**Figura M&M.3.** Plásmido pHabrC1/C2/C3



**Figura M&M.4.** Plásmido pGEM-TactII-ORF4p.

El vector **pGEM-TEasy** es un plásmido comercial (Promega) utilizado para clonar fragmentos de PCR. La segunda mitad de *actII-ORF4p*, amplificada por PCR con los oligonucleótidos SRG-95/SRG-98, se clonó en él utilizando los sitios de corte EcoRI y PstI. Como resultado se obtuvo el plásmido **pGEM-TactII-ORF4p**, usado para amplificar la sonda de ADN utilizada en los ensayos de protección frente a la DNasa I y la mutagénesis de la secuencia consenso de *AbrC3* (Figura M&M.4).

Todos los fragmentos de PCR utilizados en las clonaciones fueron secuenciados para comprobar la ausencia de mutaciones y el posterior análisis de estos se llevó a cabo con los programas *SeqMan*, *EditView* y *EditSeq*.

El programa *Gene Construction Kit* v3.0.1 (Textco, Inc) se utilizó para representar gráficamente los plásmidos, diseñar estrategias de clonación, determinar sitios de restricción y tamaño de fragmentos digeridos, diseñar oligonucleótidos sintéticos, etc.

### 3. CEPAS DE *Streptomyces* GENERADAS

En este trabajo se han generado las siguientes cepas de *Streptomyces* (Tabla M&M.3).

**Tabla M&M.3.** Cepas de *Streptomyces* generadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC3</i>	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta$ SCO4596
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>absR1</i>	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta$ SCO6992
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ 2281	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta$ SCO2281
<i>S. coelicolor</i> M145(pN702GEM3)	M145 con pN702GEM3
<i>S. coelicolor</i> M145(pNXabrC3)	M145 con pNXabrC3
<i>S. coelicolor</i> M145(pNXabrC3-DE)	M145 con pNXabrC3-DE
<i>S. coelicolor</i> M145(pNXabrC3-DADE)	M145 con pNXabrC3-DADE
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> (pN702GEM3)	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pN702GEM3
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> (pNXabrC3)	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pNXabrC3
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> (pNXabrC3-DE)	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pNXabrC3-DE
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> (pNXabrC3-DADE)	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pNXabrC3-DADE
<i>S. coelicolor</i> M145(pHJL401)	M145 con pHJL401
<i>S. coelicolor</i> M145(pHJLabrC3)	M145 con pHJLabrC3
<i>S. coelicolor</i> M145.pSET152t	M145 con pSET152t
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC3</i> .pSET152t	$\Delta$ <i>abrC3</i> con pSET15t
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC3</i> .pSETabrC3	$\Delta$ <i>abrC3</i> con pSETabrC3
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> .pHabrC1/C3	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pHabrC1/C3
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> .pHabrC2/C3	$\Delta$ <i>abrC1/C2/C3</i> con pHabrC2/C3
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ SCO2281.pSET152t	$\Delta$ SCO2281 con pSET152t
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ SCO2281.pSET2281	$\Delta$ SCO2281 con pSET2281
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>absR1</i> .pSET152t	$\Delta$ <i>absR1</i> con pSET152t
<i>S. coelicolor</i> $\Delta$ <i>absR1</i> .pSETabsR1	$\Delta$ <i>absR1</i> con pSETabsR1
<i>S. lividans</i> 1326(pHJL401)	<i>S. lividans</i> 1326 con pHJL401
<i>S. lividans</i> 1326(pHJLabrC3)	<i>S. lividans</i> 1326 con pHJLabrC3
<i>S. albus</i> (pHJL401c)	<i>S. albus</i> con pHJL401c
<i>S. albus</i> (pHJLabrC3c)	<i>S. albus</i> con pHJLabrC3c
<i>S. griseus</i> (pHJL401c)	<i>S. griseus</i> con pHJL401c
<i>S. griseus</i> (pHJLabrC3c)	<i>S. griseus</i> con pHJLabrC3c
<i>S. argillaceus</i> (pHJL401c)	<i>S. argillaceus</i> con pHJL401c
<i>S. argillaceus</i> (pHJLabrC3c)	<i>S. argillaceus</i> con pHJLabrC3c
<i>S. ambofaciens</i> (pHJL401c)	<i>S. ambofaciens</i> con pHJL401c
<i>S. ambofaciens</i> (pHJLabrC3c)	<i>S. ambofaciens</i> con pHJLabrC3c
<i>S. rochei</i> (pHJL401c)	<i>S. rochei</i> con pHJL401c
<i>S. rochei</i> (pHJLabrC3c)	<i>S. rochei</i> con pHJLabrC3c

## 4. MEDIOS DE CULTIVO Y ADITIVOS

### 4.1. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en el autoclave antes de su uso.

#### 4.1.1. Medios para *E. coli*

- Medio **LB** (Sambrook y Green, 2012): bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,5. Empleado líquido o sólido añadiendo agar 2 %. De uso general para el crecimiento de *E. coli*.
- Medio **SOB** (Sambrook y Green, 2012): bacto triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM, pH 7,0. Antes de usar se añadió MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Utilizado para obtener mayor masa celular.

#### 4.1.2. Medios para *Streptomyces*

- Medio **TSB** (Hopwood *et al.*, 1985): peptona de caseína 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, NaCl 5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/l, dextrosa 2,5 g/l, pH 7,3. Medio rico utilizado para crecer cultivos y aislar ADN.
  - Medio **2XYT** (Kieser *et al.*, 2000; Sambrook y Green, 2012): bacto triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,0. Utilizado para obtener mayor masa celular.
  - Medio **YES**: extracto de levadura 10 g/l, sacarosa 10,3 %. Suplementado con glucosa 0,5 %, glicina 0,5 % y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Medio utilizado para la obtención de protoplastos.
  - Medio **R2YE (R5)** (Kieser *et al.*, 2000): sacarosa 103 g/l, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g/l, Cl<sub>2</sub>Mg.6H<sub>2</sub>O 10 g/l, glucosa 10,12 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. Antes de utilizarlo se añadió por cada 100 ml: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 %, 1 ml, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 5 M, 0,4 ml, L-prolina 20 %, 1,5 ml.
- \*Elementos traza (en un litro de agua): ZnCl<sub>2</sub> 40 mg, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 200 mg, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 10 mg, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 10 mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O 10 mg y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 10 mg. Medio sólido de uso general y para la regeneración de protoplastos.
- Medio **SFM (MSA)** (Kieser *et al.*, 2000): manitol 20 g/l, harina de soja 20 g/l, agar 2 %. Medio de esporulación.
  - Medio **NMMP** modificación de (Hopwood *et al.*, 1985): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,6 g/l, casaminoácidos 5 g/l, elementos traza\*\* 1 ml/l, pH 7,2. Después



de autoclavar se añadió: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,8 15ml/l, glucosa 0,5 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %. Medio utilizado para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos.

\*\*Elementos traza (en un litro de agua): ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 g, CaCl<sub>2</sub> 1 g.

- Medio **YEPD** (Rose, 1990): extracto de levadura 10 g/l, glucosa 10 g/l, peptona 20 g/l, agar 2 %. Medio para el recuento de esporas viables.

- 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 (**NB**) como sólida, añadiendo agar 2 %, para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos. También se utilizó en forma semisólida (**agar nutritivo blando**) añadiendo agar 0,5 % para inocular *B. subtilis* en el bioensayo de actividad del CDA.

## 4.2. ADITIVOS PARA MEDIOS DE CULTIVO

Los **antibióticos** y concentraciones utilizadas para seleccionar y mantener cepas portando plásmidos se muestran en la Tabla M&M.4.

**Tabla M&M.4.** Concentraciones de los antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico	Concentración final <i>E.coli</i> (µg/ml)	Concentración final <i>Streptomyces</i> (µg/ml)
Ampicilina	100	-
Kanamicina	50	-
Apramicina	50	10
Cloranfenicol	25	-
Tioestreptona	-	10
Neomicina	50	20
Higromicina	200	20
Ácido nalidíxico	25	-

- **IPTG** (Sigma): La solución stock se preparó a 1 M en agua y para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes se utilizó a una concentración final de 1 mM.

## 5. CONSERVACIÓN DE CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Streptomyces* se conservaron en forma de suspensiones de esporas o micelio en glicerol al 20 % y a -20 °C o -80 °C respectivamente. Las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* se conservaron en glicerol al 20 % y congeladas a -80 °C.

Los cultivos de *Streptomyces* en medio **líquido** se llevaron a cabo en matraces de vidrio indentados a partir de suspensiones de esporas cuantificadas y la concentración final por

matraz fue de  $4 \times 10^6$  e/ml. La incubación se realizó a 30 °C y a 200 rpm en un incubador orbital Kühner. Los cultivos **sólidos** de *Streptomyces* se incubaron en placas Petri en estufa a 30 °C.

En el estudio de la sobreexpresión de *abrC3* en las diferentes especies de *Streptomyces*, los cultivos se realizaron en placas multipocillo con 3 ml de cultivo en cada uno y se inocularon con bastoncillos de algodón a partir parches de los distintos conjugantes.

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C, los líquidos en matraces de vidrio en un incubador orbital a 200 rpm y los sólidos en placas Petri incubados en estufas.

## 6. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ADN

### 6.1. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Streptomyces*

Para llevar a cabo los ensayos Southern-blot y comprobar que los mutantes estaban contruidos correctamente, así como para el estudio de las diferencias de expresión génica mediante *microarrays*, se extrajo ADN genómico (ADNg) a partir de cultivos en medio TSB líquido crecidos durante 36 horas de las cepas M145 y los diferentes mutantes siguiendo el método modificado de “lisis neutra” (Kieser *et al.*, 2000). En cada caso se partió de 500 mg de micelio que se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisis (lisozima 2 mg/ml, sacarosa 0,3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0, RNasa 10 mg/ml). Tras incubar a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron 2,5 ml de SDS 2 %. Se agitó con vortex y se añadieron 5 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) equilibrado (PCI). Tras la centrifugación se recuperó la fase acuosa facilitando la separación usando tubos *Phase Lock Gel* (5 Prime). La fenolización se repitió dos veces más y el ADNg se precipitó con un volumen de isopropanol y 0,1 volumen de AcNa 3 M pH 4,8. Por último se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6).

Las cepas mutantes también se comprobaron mediante PCR y para ello se extrajo el ADNg partiendo de 200 mg de micelio utilizando el kit *Extract-N-Amp Plant PCR* (Sigma).

La cantidad de ADN obtenido se cuantificó usando el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific).

## 6.2. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO Y DE CÓSMIDOS DE *E.coli*

La obtención de ADN plasmídico de *E.coli* se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para muestras que fueron secuenciadas se usó el kit *NucleoSpinRR Plasmid* (Macherey-Nagel). Para aislar cósmidos se llevó a cabo el mismo método de lisis introduciendo un paso de fenolización previo a la precipitación del ADN.

## 6.3. TÉCNICAS BÁSICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA DE ADN

Las técnicas de digestión con endonucleasas de restricción, desfosforilación de extremos y relleno de extremos 5' cohesivos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en el manual (Sambrook y Green, 2012). El uso de todas las enzimas se realizó siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales (Fermentas, New England Biolabs, Promega o Roche).

## 6.4. PCR

Para la construcción de los *cassettes* mutagénicos, la obtención de las sondas de ADN empleada en los Southern-Blot, ensayos de protección frente a DNasa I y la clonación de genes se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific).

Los oligonucleótidos empleados se diseñaron utilizando el programa *Gene Construction Kit* y la temperatura de hibridación de cada oligonucleótido se determinó mediante la siguiente fórmula:  $T_m = 4(GC)+2(AT)-10$ .

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Desnaturalización: 98 °C, 1 minuto    | } 30 ciclos |
| 2. Desnaturalización: 98 °C, 30 segundos |             |
| 3. Hibridación: $T_m$ , 20 segundos      |             |
| 4. Extensión: 72 °C, t segundos          |             |
| 5. Extensión final: 72 °C, 10 minutos    |             |

$T_m$ : temperatura de hibridación de cada pareja de oligonucleótidos.

t: tiempo de extensión, 30 segundos por cada kilobase a amplificar.

Para la comprobación de los mutantes por PCR se utilizaron los reactivos del kit *Extract-N-Amp Plant PCR* (Sigma) y las condiciones de la reacción fueron similares a las anteriores.

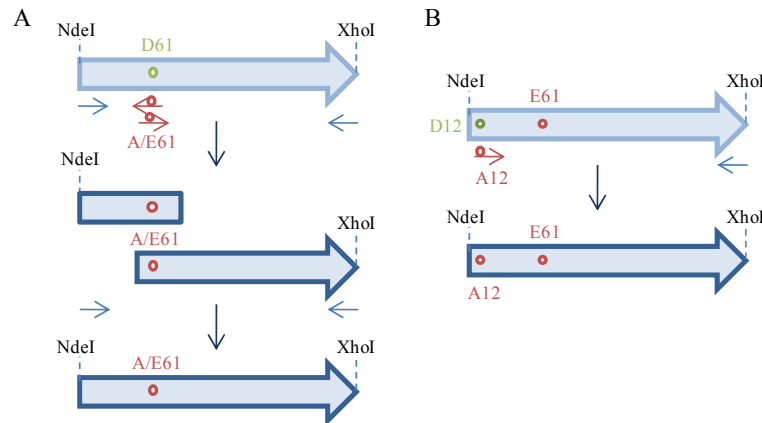
Para comprobaciones de plásmidos construidos y obtención de promotores para ensayos de retardo en gel se utilizó la *DNA polymerase* de Biotools.

## 6.5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Los plásmidos multicopia pNXabrC3, pNXabrC3-DA, pNXabrC3-DE y pNXabrC3-DADE derivaron del vector pN702GEM3 (Fernández-Ábalos *et al.*, 2003). En este plásmido bifuncional *E. coli-Streptomyces*, las diferentes versiones del gen *abrC3* quedaron bajo el control del promotor de la xilanaso *xysA* de *S. halstedii* (Rodríguez *et al.*, 2005). Para construir el plásmido pNXabrC3, el gen se amplificó usando los oligonucleótidos SRG-11/SRG-12 con los sitios de corte NdeI y XhoI respectivamente (Anexo Tabla Oligonucleótidos). El fragmento amplificado se clonó en el vector pXHis1 (Adham *et al.*, 2001) utilizando los mismos sitios y obteniendo el plásmido intermediario pXabrC3His. El fragmento resultante de la digestión de este plásmido con las enzimas NdeI y HindIII se clonó en el vector pNX24 (derivado del pN702GEM3) utilizando los mismos sitios y se obtuvo la construcción pNXabrC3 (Yepes, 2010).

Para obtener los plásmidos pNXabrC3-DA y pNXabrC3-DE, las mutaciones puntuales D<sub>61</sub>A o D<sub>61</sub>E se introdujeron usando una pareja de oligonucleótidos específica para cada mutación en las primeras reacciones de **PCR solapantes**. Para introducir la mutación D<sub>61</sub>A se utilizaron los oligonucleótidos SRG-11/AY-94 para amplificar el fragmento del gen desde el extremo 5' a la mutación puntual y los oligonucleótidos AY-93/SRG-12 para amplificar desde la mutación hasta el extremo 3'. En el caso de D<sub>61</sub>E, las parejas de oligonucleótidos usadas fueron SRG-11/SRG-55 y SRG-54/SRG-12. A continuación, estos dos fragmentos solapantes que contenían la mutación correspondiente se utilizaron como molde en una tercera reacción de PCR usando los oligonucleótidos SRG-11/SRG-12 y finalmente, los fragmentos resultantes se introdujeron usando los sitios NdeI y XhoI en el plásmido pNXabrC3 reemplazando la copia original del gen por la mutada (Figura M&M.5).

El plásmido pNXabrC3-DADE (mutación D<sub>12</sub>A/D<sub>61</sub>E) se construyó utilizando el oligonucleótido SRG-61 que portaba el cambio y SRG-12 y usando como ADN molde el plásmido pNXabrC3-DE. Por último, el fragmento obtenido se utilizó para reemplazar el gen original en el plásmido pNXabrC3.



**Figura M&M.5.** Estrategias llevadas a cabo para introducir mutaciones puntuales dirigidas. A: PCRs solapantes. B: PCR convencional.

Para llevar a cabo la delección de la secuencia consenso en *actII-ORF4p* se llevaron a cabo PCRs solapantes usando como ADN molde el plásmido pGEM-TactII-ORF4p y utilizando las parejas de oligonucleótidos SRG-95/SRG-97 y SRG-96/SRG-98 en la primera y segunda reacción de PCR y SRG-95/SRG-98 en la reacción final.

La delección de la secuencia en *absR1p* se realizó mediante PCR tradicional con los oligonucleótidos SRG-116/SRG-73, portando el oligonucleótido directo la delección de dicha secuencia.

## 6.6. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos y sondas marcadas con 5'FAM-3'TAMRA específicos para cada gen a analizar usando el servidor online Primer3 (Anexo Tabla Oligonucleótidos).

Cinco  $\mu\text{g}$  del ARN aislado en el estudio de las diferencias de expresión génica mediante *microarrays* (ver más adelante) se trataron con DNasa libre de RNasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un  $\mu\text{g}$  del ARN resultante se utilizó como molde para la síntesis del ADNc en 20  $\mu\text{l}$  de volumen final de *iScript Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad) y las muestras resultantes se diluyeron 1:1 con agua destilada para conseguir una concentración de ADNc óptima para la posterior reacción.

Para llevar a cabo las qRT-PCRs se usaron 5  $\mu\text{l}$  de ADNc junto a 10 pmoles de oligonucleótidos directo y reverso, 2,5 pmoles de sonda y 12,5  $\mu\text{l}$  de *SsoFast™ Probes Supermix* con *ROX master mix* (Bio-Rad) en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Cada reacción de PCR se hizo por duplicado en el termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR*

*Detection System* (Bio-Rad) y se incluyó un control negativo (sin síntesis previa de ADNc) para verificar que no había contaminación por ADN en las muestras.

La expresión relativa de cada gen se cuantificó con el **método**  $\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen, 2001). Primero se calculó la diferencia de los valores de Ct de los correspondientes genes en las cepas M145 y  $\Delta abrC3$  ( $\Delta Ct^1$ ) y por otro lado la diferencia en ambas cepas de los valores Ct del gen de referencia *hrdB* (*SCO5820*) cuya expresión permanece constante ( $\Delta Ct^2$ ). A continuación se obtuvo la diferencia  $\Delta Ct^1 - \Delta Ct^2 = \Delta\Delta Ct$  y el *fold-change* resultante de la expresión de cada gen corresponde a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 6.7. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

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

## 6.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN se separaron en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0,8 % conteniendo bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), excepto cuando las bandas de ADN eran menores de 500 nucleótidos en cuyo caso el porcentaje de agarosa era del 1,6 %. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en *buffer* TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM) (Sambrook y Green, 2012) y las bandas se observaron en el transiluminador de luz ultravioleta *Gel Doc 2000* de Bio-Rad. Como marcador de referencia se utilizó *0'GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific).

## 6.9. SOUTHERN-BLOT

- **Digestión y electroforesis.** Tres  $\mu\text{g}$  de ADNg de la cepa M145 y de los diferentes mutantes se digirieron con dos enzimas de restricción en dos reacciones independientes. Posteriormente fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %.

- **Marcaje de la sonda.** Como sonda se utilizaron los promotores de los genes *abrC3*, *SCO2281* y *absR1* amplificados mediante PCR. Para su marcaje con digoxigenina se utilizó el kit comercial *DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche). Para ello 1  $\mu\text{g}$  de sonda se desnaturalizó por calor y se pasó rápidamente a hielo. Seguidamente se añadieron 4  $\mu\text{l}$  de *Dig High Prime* y se incubó a 37 °C durante toda la noche. La reacción se paró a 65 °C durante 10 minutos.

• **Transferencia.** Una vez realizada la electroforesis el gel se incubó en solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) y posteriormente en solución de neutralización (Tris-HCl 1 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4) durante 45 minutos en ambos casos. El ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) (Sambrook y Green, 2012) y para ello se realizó el siguiente montaje: en un recipiente adecuado que contenía SSC 6X (NaCl 900 mM, citrato sódico 45 mM, pH 7,0) se colocó un puente de papel Whatman 3MM que conectaba con el SSC 6X. A continuación dos papeles Whatman 3MM, el gel de agarosa con la cara inferior hacia arriba, la membrana de nylon previamente humedecida en SSC 10X, otros dos papeles Whatman 3MM y por últimos una pila de papeles de filtro y un peso encima, todo ello de la medida del gel de agarosa. La transferencia se realizó a lo largo de toda la noche y el ADN se fijó de forma covalente a la membrana mediante radiación UV (*UV Stratalinker 2400*, Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

• **Hibridación.** La membrana se prehibridó en solución *DIG Easy Hyb* durante 4 horas a 65 °C. Para la hibridación la sonda marcada se desnaturalizó por calor, se pasó a hielo rápidamente y a continuación se añadió a la solución de prehibridación y se incubó a 65 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se retiró la solución de hibridación y se lavó la membrana 2 veces con una solución de SSC 2X y SDS 0,1 % a 65 °C durante 5 minutos y otras dos veces en SSC 0,1X y SDS 0,1 %.

• **Detección:** La detección de los ácidos nucleicos marcados con digoxigenina se realizó a temperatura ambiente usando el kit *DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, la membrana se lavó durante 1 minuto con tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween 20 0,3 %) y a continuación se bloqueó durante 30 minutos en *Blocking Solution*. Seguidamente, se incubó con una dilución 1:10.000 de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en solución de bloqueo durante 30 minutos. Se lavó 2 veces durante 15 minutos con el tampón de lavado y la membrana se incubó durante 5 minutos en el tampón de detección (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1M). El revelado se hizo por quimioluminiscencia incubando la membrana durante 5 minutos con el sustrato *CSPC ready-to-use* y se expuso en un *cassette* con una película radiográfica durante un tiempo variable en función de la señal obtenida.

## 7. INTRODUCCIÓN DE ADN EN MICROORGANISMOS

### 7.1. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO

Se llevó a cabo utilizando células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , ET12567 o BL21 (DE3) siguiendo el protocolo descrito por (Hanahan, 1983).

### 7.2. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

Las células electrocompetentes de *E. coli* se obtuvieron a partir de cultivos que contenían MgSO<sub>4</sub> 20 mM (Gust *et al.*, 2003). La electroporación con los cósmidos correspondientes se llevó a cabo en un electroporador *Micropulser*<sup>TM</sup> de Bio-Rad. Las células electroporadas se incubaron durante 1 hora en agitación a 37 °C y se sembraron en placas de medio sólido con el antibiótico de selección.

### 7.3. TRANSFORMACIÓN DE *Streptomyces*

El protocolo seguido se basa en la obtención de protoplastos, transformación y posterior regeneración en placas de R2YE (Kieser *et al.*, 2000). Tras 12 horas de crecimiento se añadió en cobertera de H<sub>2</sub>O el antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes

### 7.4. CONJUGACIÓN

El proceso de conjugación se llevó a cabo entre *E. coli* y las diferentes especies de *Streptomyces* según el protocolo especificado en el manual “REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*” (Gust *et al.*, 2003).

En la construcción de las cepas mutantes, la selección de las colonias de *S. coelicolor* portadoras del cósmido mutado de interés se realizó usando los antibióticos apramicina y ácido nalidíxico. En el caso de la sobreexpresión de *abrC3* en *Streptomyces* sp., los conjugantes se seleccionaron por su resistencia a apramicina. En ambos casos, la cepa donadora fue *E.coli* ET12567/pUZ8002, portadora de los cósmidos mutados o el plásmido de sobreexpresión de *abrC3*.

## 8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 8.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. coli*

• **Expresión.** La secuencia codificante de *abrC3* se clonó en el plásmido pET22b bajo el control del promotor de la polimerasa T7 y quedó etiquetada con una cola de seis



histidinas en su extremo C-terminal. La cepa utilizada para la expresión de la proteína fue *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido anterior y se creció en cultivos de un litro de LB + ampicilina 100 µg/ml. Cuando el cultivo alcanzó una D.O<sub>600</sub> ~ 0,6, la expresión se indujo añadiendo IPTG 1 mM y se incubó durante 4 horas más. Tras este tiempo, las células se recogieron, se lavaron con H<sub>2</sub>O estéril y resuspendieron en *buffer* de lisis (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM). Para la ruptura celular se utilizó el homogeneizador ultrasónico *Labsonic M* (Sartorius) aplicando 10 ciclos de ultrasonidos de 10 segundos a 100 % de amplitud con pausas de un minuto en hielo entre los ciclos. Las fracciones soluble e insoluble se separaron mediante centrifugación a 26712 xg durante 30 minutos (centrífuga *Sorvall RC6 Plus*).

- **Purificación.** Se realizó mediante cromatografía de afinidad de metales en condiciones nativas. La fracción soluble se pasó por una matriz de cobalto (*HisPur Cobalt Resin*, Thermo Scientific) previamente equilibrada e inmovilizada en una columna cromatográfica (Bio-Rad). La columna se lavó 4 veces para eliminar proteínas unidas inespecíficamente con 10 ml de *buffer* de lavado cada vez (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM). La elución se hizo con dos fracciones de 500 µl de *buffer* de elución 1 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM) y con otras dos de *buffer* de elución 2 (igual composición pero con imidazol 1 M). Las distintas fracciones se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida para comprobar la cantidad de proteína recuperada en cada una de ellas.

- **Diálisis.** Se hizo utilizando tubos de diálisis *D-Tube TM Dialyzer Maxi* (Novagen) con un tamaño de poro de 6-8 kDa. Se llevó a cabo en 2 l de *buffer* de diálisis Tris-HCl 50 mM pH 7,5, cambiándolo cada 6 horas durante un día.

- **Cuantificación.** La cantidad de proteína obtenida se determinó colorimétricamente por el método de Lowry utilizando el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 8.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Las proteínas se separaron en función de su tamaño por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con un sistema vertical de geles *Mini-Protean II* (Bio-Rad). Los geles de separación eran de una concentración final de acrilamida del 15 % y los de empaquetamiento del 4 %. Las muestras de proteína se prepararon en *buffer* de carga 4x (glicerol 40 %, Tris HCl 0,25M pH 6,8, SDS 8 %, azul de

bromofenol 0,05 %, DTT 0,05 M). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de la electroforesis y ésta se llevó a cabo a un amperaje constante de 30 mA/gel. Los marcadores de bajo peso molecular usados fueron *Low molecular Weight Marker* (Bio-Rad).

Para la visualización de las proteínas los geles se tiñeron con azul de Coomassie (0,5 % Coomassie R, 10 % ácido acético, 50 % metanol) y se destiñeron en una solución de 10 % ácido acético y 25 % metanol.

### 8.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

Una vez llevada a cabo la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante el sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) durante una hora a voltaje constante de 300 V. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con seroalbumina bovina (BSA) al 1 % en *buffer* TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05 %, pH 7,6) durante una 1 hora. A continuación se incubó durante 2 horas con el anticuerpo primario policlonal frente a AbrC3 (dilución 1/100.000) a temperatura ambiente y en agitación. Después de tres lavados con TBST, para eliminar restos de anticuerpo primario no unido, la membrana se incubó 30 minutos con el anticuerpo secundario (IgG contra conejo-HRP) diluido 1/ 5.000 y el exceso de anticuerpo se eliminó con tres lavados de TBST. Para la detección se utilizó el *kit Novex®ECL HRP Chemiluminiscent substrate reagent* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las membranas utilizadas en estos ensayos se tiñeron con rojo Ponceau S (0,5 % rojo Ponceau, 1 % ácido acético) como control de carga.

### 8.4. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

• **Preparación de antígenos, inoculación y extracción de sangre.** La obtención se llevó a cabo en conejos hembras de dos meses que se inmunizaron varias veces con la proteína contra la que se obtuvieron los anticuerpos.

En la primera inmunización se inyectaron 300 µg de la proteína AbrC3 purificada como se ha detallado anteriormente. Para ello, esta cantidad se llevó a un volumen de 500 µl con PBS y se añadió 500 µl de adyuvante de Freund Completo (Sigma), el cual hace que la reacción inmune en los conejos sea mayor ya que contiene extractos de *Mycobacterium*. La mezcla se emulsionó por sonicación, 5 pulsos de 10 segundos a 100 % de amplitud. Previo a la inmunización se extrajeron 10 ml de suero preinmune por

canulación de la arteria central de la oreja de los animales para comprobar que no producían anticuerpos inespecíficos contra la proteína y la inmunización se llevo a cabo de forma intradérmica repartiendo la dosis de antígeno en 6-8 puntos dorsales.

Después de cuatro semanas, se inmunizó por segunda vez a los conejos. En este caso la cantidad de proteína inoculada fue la mitad, 150 µg, la cual se llevó hasta 500 µl con PBS y se incorporaron otros 500 µl de adyuvante de Freund Incompleto (Sigma). El antígeno se inyectó de forma subcutánea en las axilas de las patas delanteras.

A las 2 semanas se procedió a la extracción del primer suero, unos 30 ml de sangre para comprobar el título de producción de anticuerpos alcanzado. Después se volvió a inmunizar a los conejos al igual que en la segunda inmunización. Este paso se repitió una tercera y cuarta vez cada dos semanas.

A los 15 días de la última inmunización se sacrificaron los conejos. En primer lugar se anestesiaron con Midazolam (3 mg/kg) y Ketamina (1 mg/kg) para después extraer el mayor volumen posible de sangre por punción cardiaca muriendo los conejos por choque hipovolémico.

- **Procesamiento de la sangre.** La sangre obtenida en las diferentes extracciones y en el sacrificio de los conejos se dejó coagular durante toda la noche a 10 °C. Posteriormente se centrifugó a baja velocidad y se recogió el suero que se clarificó mediante centrifugación a 16800 xg durante 2 minutos. Este suero se guardó a -20 °C para la posterior purificación.

- **Purificación de los sueros.** Se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad usando como soporte columnas *Econo-Column Chromatography* (BioRad) que contenía *CNBr-activated sepharose 4B* (Sigma). A esta matriz se unió la proteína contra la que se produjeron los anticuerpos y posteriormente se incubó con el suero para que los anticuerpos la reconocieran y quedasen unidos a ella. Por último, los anticuerpos específicos retenidos se eluyeron. A continuación se detalla el procedimiento seguido.

Se pesaron 0,5 g de sefarosa y se depositaron en la columna. Se hidrataron con 100 ml de HCl 1 mM dejando pasar el HCl por gravedad y posteriormente se lavó con *buffer* de acoplamiento para estabilizarla (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaCl 0,5M, pH 8,3).

Una vez lista la matriz, se añadieron 5 µg de la proteína AbrC3 a la columna en un volumen de 10 ml de *buffer* de acoplamiento (previamente dializada en este *buffer* y medida la D.O<sub>280</sub>) y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Se recogió la fase móvil de la columna y se midió la D.O<sub>280</sub> para comprobar que la proteína quedaba unida a la sefarosa. Una vez comprobada esta unión la columna se lavó con *buffer* de acoplamiento.

Después se saturaron los sitios activos de la sefarosa incubando con 10 ml de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se dejó pasar este Tris-HCl y se lavó la columna con 3 ciclos alternativos de pH: 15 ml de acetato sódico 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0 y 15 ml de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0. Por último se lavó la columna con PBS.

Una vez montada la columna de cromatografía de afinidad se procedió a purificar los anticueros. Se lavó la columna con PBS y se incubó con 15 ml de suero a 4 °C durante toda la noche. Se recogió la fracción no retenida y se guardó. A continuación se lavó con Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5 hasta que la D.O<sub>280</sub> fue menor de 0,010. Los anticueros unidos se eluyeron con 10 ml de glicina 0,1 M, pH 2,6 y se recogieron fracciones de 1 ml habiendo echado previamente a los tubos 100 µl de Tris-HCl, pH 8,0 (para neutralizar inmediatamente el pH ácido de la glicina ya que puede desnaturalizar los anticueros). Se midió la D.O<sub>280</sub> de las fracciones para determinar el pico de anticueros purificados usando como blanco 1 ml de glicina 0,1 M pH 2,6, 100 µl Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Se mezclaron las fracciones que contenían el pico de anticueros, se añadió azida sódica al 0,05 % y se guardaron a -20 °C. La columna se lavó con PBS y se añadió PBS más azida sódica al 0,05 % para su conservación a 10 °C y su posterior uso. Para comprobar la cantidad de anticuerpo obtenida y la especificidad de éstos frente la proteína de interés se realizaron ensayos de Western-blot con la proteína purificada y extractos celulares totales de *Streptomyces*.

### 8.5. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo incubando el RR AbrC3 purificado junto a promotores marcados radiactivamente en el extremo 5' para comprobar “in vitro” si estos fragmentos de ADN eran dianas moleculares del regulador. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar los diferentes promotores se recogen en el Anexo Tabla Oligonucleótidos.

- **Marcaje de la sonda:** Una vez obtenidos los promotores mediante PCR, 5 pmol de ADN se incubaron con 5 µl de isótopo [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (6.000 Ci/mmol) y 20 unidades de T4 Polinucleótido Quinasa en el *buffer* de esta enzima y en un volumen final de 50 µl.

Tras 30 minutos a 37 °C se añadió 2 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción y el isótopo no incorporado se eliminó mediante columnas *Illustra ProbeQuant G-50* (GE Healthcare).

Por último se midió la incorporación del isótopo en el contador de centelleo *Wallac 1409*.

- **Reacción de unión ADN-Proteína:** Previo a esta reacción, las proteínas purificadas fueron incubadas a 30 °C durante 30 minutos en *buffer* de incubación (Tris-HCl 50 mM pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, NaCl 0,1 M) para eliminar los posibles agregados formados al mantener las proteínas a 4 °C.

A continuación, 10 fmol de ADN se incubaron con diferentes cantidades de la proteína en un volumen final de 20 µl durante 30 minutos a 30 °C en *buffer* de unión (Tris-HCl 10 mM pH 7,8, DTT 2 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10 % y 45 ng de esperma de salmón).

- **Electroforesis:** Se llevó a cabo en geles de acrilamida al 5 % en tampón TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Antes de cargar las muestra los geles se pre-corrieron 10 minutos a 70 V. A continuación se llevó a cabo la electroforesis a 70 V durante 200 minutos en un baño de hielo.

- **Revelado:** tras la electroforesis, los geles se secaron en un secador con vacío Bio-Rad 593 durante 45 minutos a 80 °C, se expusieron a películas radiográficas en un *cassette* con pantallas intensificadoras a -80 °C y después de un tiempo variable las películas fueron reveladas.

## 8.6. ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A DNasa I

Se llevó a cabo la técnica no radiactiva de protección frente a DNasa I (Rodríguez-García *et al.*, 1997). En primer lugar, se clonó la segunda mitad *actII-ORF4p* en el plásmido pGEM-TEasy como se ha detallado anteriormente. Mediante PCR y utilizando este plásmido como ADN molde, se obtuvieron las sonda marcadas con FAM en el extremo 5' o en el extremo 3' (Anexo Tabla Oligonucleótidos). Una vez purificados los fragmentos de ADN marcados se llevó a cabo la reacción de unión con la proteína AbrC3. Las condiciones utilizadas fueron las mismas que en los EMSAs pero escalando las reacciones a 56 µl y utilizando 0,28 pmoles de ADN en cada una. A continuación, se añadió 0,01 unidades de DNasa I de páncreas bovino liofilizada (Roche) reconstituida en *buffer* Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, BSA 100 µg/ml, DTT 1 mM, glicerol 50 %, pH 7,0. Se dejó actuar entre 30 segundos y 2 minutos y la digestión se paró añadiendo

120 µl de *buffer* de parada (Tris-HCl 9 mM, EDTA 40 mM, pH 8,0). Los fragmentos de ADN resultantes se purificaron por extracción con PCI seguida de una precipitación con etanol al 70 % y se resuspendieron en formamida. Por último, las muestras se cargaron en un secuenciador *ABI 3130* (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron mediante el programa *Peak Scanner* (Applied Biosystems).

## **9. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CEPA $\Delta$ *abrC3* MEDIANTE *MICROARRAYS***

El procedimiento llevado a cabo en este estudio es una modificación del descrito en (Bucca *et al.*, 2009).

### **9.1. Aislamiento de ARN**

El ARN fue obtenido de dos réplicas biológicas por cada cepa a partir de cultivos líquidos de 160 ml de NB en matraces de 500 ml inoculados con  $4 \times 10^6$  e/ml por cada tiempo. Se recogieron muestras por triplicado de 20 ml a 36, 48 y 60 horas y el micelio se trató con 4 ml de *RNA Protect* (Qiagen) antes de ser congelado a -20 °C.

La rotura del micelio se hizo en dos fases: en la primera se incubó con *buffer* TE más lisozima (15 mg/ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos y en la segunda se añadió 0,6 ml de *buffer* RLT (Qiagen) junto con una bola de acero y se rompió mecánicamente utilizando el *Tissuelyser* (Qiagen) con dos ciclos de dos minutos a 30 rpm. La mezcla resultante se centrifugó a 16.800 xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se llevaron a cabo dos extracciones PCI más otra con cloroformo y la fase acuosa se hizo pasar por una columna *gDNA eliminator* (RNeasy mini Plus, Qiagen). A continuación, se añadió 0,6 ml de etanol 96 % y se continuó la purificación con el kit *mirVana<sup>TM</sup>* (Life Technologies) que permitió aislar también el ARNm, moléculas de 19 a 25 nucleótidos que regulan la expresión génica al actuar como moléculas antisentido del ARNm. Para cuantificar el ARN se utilizó el *Nanodrop ND-1000* y para conocer su calidad se analizó con el *Bioanalyzer 2100* (Agilent).

### **9.2. SÍNTESIS Y MARCAJE DE ADNc**

El ADNc se sintetizó y marcó con Cy3 usando el kit *Bio-Prime* (Invitrogen) por transcripción inversa a partir de las muestras de ARN aisladas previamente.

Se usaron 10 µg de ARN en un volumen final de 30 µl con 5,1 µg de *Random Primers* (Invitrogen). Esta mezcla se desnaturalizó 10 minutos a 70 °C y se enfrió rápidamente en hielo. Después se añadieron 6 µl de *buffer First Strand*, 3 µl de DTT 100 mM, 0,6 µl de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP 25 mM y dCTP 10 mM), 400 unidades de *Superscript III* (Invitrogen) y 1,5 µl de Cy3-dCTP. La mezcla se incubó en oscuridad a 25 °C durante 10 minutos para permitir la hibridación de los oligonucleótidos y a continuación se incubó 4 horas a 42 °C. Por último se llevó a cabo un tratamiento para degradar el ARN con NaOH y HCl y las reacciones se purificaron mediante el kit *Minelute PCR Purification* (Qiagen). La incorporación de Cy3 se verificó con el *Nanodrop ND-1000*.

### 9.3. MARCAJE DE ADN<sub>g</sub>

Se marcaron con Cy5 (Bio-Prime, Invitrogen) 2-3 µg de ADN genómico de la cepa parental *S. coelicolor* M145 en un volumen final de 41,5 µl junto a 3 µg de *Random Primers*. Esta mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. A continuación, se añadieron 1 µl de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP 5 mM y dCTP 2 mM), 1,5 µl Cy5-dCTP, 5 µl de fragmento Klenow de la polimerasa T4 y 1 µl del *buffer* de esta enzima. La reacción se incubó a 37 °C en oscuridad durante toda la noche, se purificó con el kit *Minelute PCR Purification* (Qiagen) y la incorporación de Cy5 se midió con el *Nanodrop ND-1000*.

### 9.4. HIBRIDACIÓN, LAVADO Y ESCANEADO DE LOS MICROARRAYS

Los *microarrays* *IJISS 105K* de *S. coelicolor* utilizados fueron diseñados por el Laboratorio de Genómica Funcional de la Universidad de Surrey en colaboración con Oxford Gene Technology y producidos por Agilent. Estos soportes contienen alrededor de 105.000 sondas de 60 nucleótidos cada una, con un espacio medio de 35 bases del genoma entre ellas. Las sondas representan la cadena de ADN codificante de todos los genes conocidos y ambas cadenas de todas las regiones intergénicas.

Para la hibridación de los *microarrays* de expresión se combinaron 30-40 pmoles de Cy3 ADN<sub>c</sub> con 30-40 pmoles de Cy5 ADN<sub>g</sub> en un volumen final de 260 µl junto a *buffer* de Bloqueo 10X y *buffer* de Hibridación 2X (kit *Agilent Oligo aCGH Hybridization*). La mezcla se desnaturalizó a 94 °C durante 3 minutos y se puso sobre la superficie del *microarray*. Una vez sellado el soporte se colocó en una cámara de

hibridación (Agilent Technologies) y se incubó a 65 °C durante 40 horas y con rotación de 20 rpm en un horno de hibridación (Agilent Technologies).

El lavado se llevó a cabo desmontando cada soporte en una cubeta que contenía *buffer* de Lavado aCGH 1 (Agilent Technologies) e incubado en esta solución durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se transfirió a *buffer* de Lavado aCGH 2 (Agilent Technologies) y se incubó 1 minuto a 37 °C, después a acetonitrilo durante 1 minuto a temperatura ambiente y por último 30 segundos a temperatura ambiente en *buffer* de Estabilización y Secado (Agilent Technologies).

La lectura de los *microarrays* se llevó a cabo en un scanner de Agilent Technologies utilizando unas longitudes de onda de 535 nm para el Cy3 y de 635 nm para el Cy5 y las imágenes resultantes se analizaron con el programa *Agilent Technologies Image Analysis* (versión 9.1.3.1) con corrección local de fondo.

## 9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los datos totales obtenidos en cada *microarray* se eliminaron las sondas cuya señal era muy débil utilizando el programa *Agilent Feature Extraction* y el protocolo modificado para expresión génica. A continuación, los datos de cada *microarray* se normalizaron con el programa R utilizando el paquete LIMMA y se aplicó la mediana como valor estadístico de referencia de los ratios  $\log_2$  ADNc/ADNg y por último se llevó a cabo una normalización entre los diferentes *microarrays*.

El análisis de los datos de expresión se realizó utilizando el servidor online *RankProdIt* (<http://strep-microarray.sbs.surrey.ac.uk/RankProducts>) que determina la expresión de un determinado gen haciendo un promedio de la intensidad de todas las sondas que lo representan y se estableció un *ppf* (probabilidad de *f*alsa *p*redicción) igual o menor a 0,15 y/o un *p*-valor igual o menor a 0,005 como valores estadísticos para identificar los genes diferencialmente expresados, valores previamente validados en otros estudios (Bucca *et al.*, 2009).

Se generaron archivos BED utilizando *Perl Scripts* para visualizar los datos de expresión a través del cromosoma de *S. coelicolor* en la web *UCSC Microbial Gene Browser* (<http://microbes.ucsc.edu/>) y también se utilizó el programa *GeneSpring X*



(Agilent) para visualizar estos resultados. Por último, los datos totales y normalizados obtenidos en el ensayo se depositaron en la base de datos *ArrayExpress* con el número de acceso E-MTAB-1453.

## 10. ENSAYOS DE ChIP-chip

El protocolo de ChIP-chip seguido en este estudio es una modificación del descrito en (Bucca *et al.*, 2009).

### 10.1. OBTENCIÓN DE CROMATINA

De los mismos cultivos utilizados en los estudios de expresión génica, se recogieron muestras de 20 ml por triplicado a las 36, 48 y 60 horas para llevar a cabo los ensayos ChIP-chip. El *cross-linking* ADN-proteínas “in vivo” se realizó añadiendo formaldehído a una concentración final del 1 % y se incubó durante 20 minutos a 30 °C en agitación. Para parar este proceso se añadió glicina a una concentración final de 0,5 M y se incubó 5 minutos a 30 °C en agitación. Por último, el micelio se lavó con agua estéril y las muestras se congelaron a -20 °C

La rotura del micelio se llevó a cabo utilizando el *Micro-Dismembrator U* (Sartorius Stedim Biotech). En el soporte de rotura se puso el micelio junto a una bola de cromo de 10 mm de diámetro y matriz B de lisis (Q-BIOgene), todo ello previamente congelado en N<sub>2</sub> líquido, y se sometió a un ciclo de rotura de 80 segundos a 2000 rpm. El micelio pulverizado resultante se resuspendió en 3 ml de *buffer* IP (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % deoxicolato sodico, 0,1 % SDS, pH 8,0) más una pastilla de cocktail inhibidor de proteasas (Roche) por cada 10 ml. A continuación, la cromatina se sometió a 4-6 rondas de 20 segundos de sonicación al 50 % de potencia (*Sonics VibraCell VCX130*) con periodos de 40 segundos en hielo entre cada ronda para obtener fragmentos de ADN de 300 a 600 nucleótidos y se centrifugó 25 minutos a 13.800 xg y 4 °C para recoger el sobrenadante y desechar los restos celulares y la matriz B de lisis.

Para comprobar el estado de la cromatina, a 70 µl se le añadieron 20 µl de *buffer* de elución 5x y 10 µl de Proteinasa K, se incubó a 42 °C durante 2 horas y a 65 °C 6 horas. A continuación se añadió RNasa, se incubó 30 minutos a 37 °C y se corrió una fracción en gel de agarosa al 1 % para comprobar que la calidad y tamaño de los fragmentos de ADN era la correcta para llevar a cabo la inmunoprecipitación.

## 10.2. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para realizar la inmunoprecipitación, cada muestra se trató en paralelo con anticuerpo y sin él como control.

En primer lugar, se clarificó la cromatina para eliminar posibles proteínas presentes en la muestra que reconociesen el RR AbrC3. Para ello, a 800 µl de cromatina se le añadieron 40 µl de *Ultralink immobilized Protein A Sepharose beads* (Pierce) y se incubó a 4 °C durante 4 horas en rotación a 20 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y a una muestra se le añadió 50 µg de anticuerpo anti AbrC3 y a la otra el mismo volumen de agua. Se incubó toda la noche a 4 °C en rotación y se añadió a todas las muestras 40 µl de *Ultralink immobilized Protein A Sepharose beads*. Tras 4 horas de incubación se procedió a los lavados y elución de los fragmentos de ADN unidos al anticuerpo.

Primero se eliminó el sobrenadante y las *beads* se resuspendieron en *buffer* IP más Cocktail Inhibidor de Proteasas (Roche). Las muestras se pasaron a tubos nuevos y sucesivamente se lavaron con *buffer* IP más NaCl (igual que el *buffer* IP pero con NaCl 500 mM), *buffer* de lavado (Tris-HCl 10 mM, LiCl 250 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-400 5 % y deoxicolato sodico 0,5 %, pH 8,0) y TE, todos ellos con Cocktail Inhibidor de Proteasas, con periodos de incubación de 3 minutos a 4 °C en rotación entre cada lavado.

Para eluir los fragmentos de ADN se añadió 240 µl de *buffer* de elución (Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, SDS 1 %, pH 7,6) más 10 µl de Proteinasa K 10 mg/ml y las muestras se incubaron a 55 °C toda la noche. Para romper la unión del anticuerpo a los fragmentos de ADN se incubó a 65 °C durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante al que se le añadió 500 µl de TE. Se realizaron dos extracciones PCI y otra más con cloroformo y el ADN se precipitó con 1/10 v de acetato sódico 3M, pH 5,2, etanol 100 % helado y 20 µg de glucógeno. Se incubó a -80 °C 30 minutos, se lavó con etanol 70 % helado y el ADN resultante se resuspendió en 25 µl de agua ultrapura. Por último, la concentración de ADN obtenida fue determinada con el *Nanodrop ND-1000*.

## 10.3. MARCAJE DEL ADN INMUNOPRECIPITADO

Se utilizó el kit *Bio-Prime* (Invitrogen) para marcar con Cy3-dCTP o Cy5-dCTP el ADN resultante de la inmunoprecipitación y el control. Se desnaturalizó 1 µg de ADN a 94 °C durante 3 minutos junto con 20 µl de 2,5x *Random Primers* en un volumen final de 40 µl y a continuación se enfrió rápidamente en hielo. Después se añadieron 5 µl

dNTPs (dATP, dGTP y dTTP 2 mM y dCTP 0,5mM), 1,5  $\mu$ l Cy5-dCTP, 3,75  $\mu$ l de Cy3-dCTP o Cy5-dCTP y 1,5  $\mu$ l de fragmento Klenow. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante toda la noche y el ADN marcado se purificó con el kit *MinElute PCR Purification* (Qiagen).

La incorporación de Cy3 o Cy5 se cuantificó por medición con el *Nanodrop ND-1000*.

#### **10.4. HIBRIDACIÓN, LAVADO Y ESCANEADO DE LOS MICROARRAYS**

Los *microarrays* utilizados fueron los mismos que en el estudio de las diferencias de expresión génica. En este caso, para la hibridación se incubaron 30-40 pmoles de muestra tratada con anticuerpo marcada con Cy3 junto a 30-40 pmoles de muestra sin tratar con anticuerpo y marcada con Cy5. Para compensar posibles diferencias en marcaje y detección de Cy3 y Cy5 (*Dye Swap*), otra réplica biológica se incubó al contrario, es decir, la muestra tratada con anticuerpo se marcó con Cy5 y la muestra control con Cy3. El protocolo de hibridación, al igual que el de lavado y escaneo de los *microarrays*, continúa de forma similar al descrito en el apartado 9.4.

Para llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos tras escanear los *microarrays*, en primer lugar, de los datos totales se eliminaron las sondas cuya señal era muy débil utilizando el programa *Agilent Feature Extraction* y el protocolo CGH. A continuación, los datos de cada *microarray* se normalizaron con el programa R utilizando el paquete LIMMA y se aplicó la mediana como valor estadístico de referencia de los ratios  $\log_2$  anticuerpo/no anticuerpo y por último se llevó a cabo una normalización entre los diferentes *microarrays*.

#### **10.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el análisis estadístico de los datos de ChIP-chip, las zonas de unión de AbrC3 a sus dianas se identificaron agrupando las sondas significativamente enriquecidas ( $p$ -valor = 0,05) en la cepa parental M145 comparada con la mutante  $\Delta abrC3$  utilizando el programa R y realizando un t-test no paramétrico. Para ello, el ratio [(M145 AC/No AC) / ( $\Delta abrC3$  AC/No AC)] se representó gráficamente y las zonas de enriquecimiento se seleccionaron a partir del hombro formado en la cola derecha de la distribución de los datos, conteniendo estas zonas, al menos, dos sondas de 3 kb cada una.

También se generaron archivos BED utilizando *Perl Scripts* para visualizar en la web *UCSC Microbial Gene Browser* (<http://microbes.ucsc.edu/>) las zonas de unión de AbrC3 en el cromosoma de *S. coelicolor* y los datos de este estudio se depositaron en la base de datos *ArrayExpress* con el número de acceso MTAB-1451.

## 11. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Las muestras procedentes de extractos celulares, sobrenadantes de los cultivos líquidos y tacos de agar de placas multipocillo se extrajeron con etilacetato conteniendo ácido fórmico al 1 % y tras una hora en agitación y evaporados los solventes, los residuos se resuspendieron en 100 µl de dimetil sulfóxido:metanol (50:50).

Para el análisis HPLC-MS se utilizó un sistema cromatográfico *Alliance* acoplado a un espectrofotómetro de masas *ZQ4000* y una columna *Symmetry C18* (Waters). Como solvente se usó acetonitrilo, en primer lugar 4 minutos al 10 % y después en gradiente de 10 a 88 % durante 26 minutos a 0,25 ml/min. El análisis MS se llevó a cabo por ionización por electrospray con un voltaje en el capilar de 3 kV y en el cono de 20 V. La detección y caracterización de los picos obtenidos se realizó mediante *microarray* de fotodiodos y el software *Empower* (Waters) (Pérez *et al.*, 2011).

## 12. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo cuantificando el peso seco del micelio de los distintos cultivos. Para ello se inocularon  $4 \times 10^6$  e/ml en 160 ml de NB, se incubaron en agitación a 30 °C y se tomaron muestras cada 8 horas. En cada tiempo se filtraron 10 ml del cultivo y se estimó el peso seco equivalente. Todas las muestras se hicieron por triplicado para calcular la media del peso seco y el error típico de la media.

## 13. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

### 13.1. CUANTIFICACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Para cuantificar la producción de ACT en medio líquido se realizaron cultivos por triplicado de cada cepa. Matraces de 100 ml se inocularon con 15 ml de medio con una concentración final de  $4 \times 10^6$  e/ml. Se tomaron muestras por duplicado de cada matraz a distintos tiempos y se cuantificó la ACT mediante colorimetría siguiendo un protocolo modificado del descrito por Kieser, 2000. Así, los cultivos fueron tratados con KOH (1 N), las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C, se centrifugó la mezcla (15000 xg,

10 minutos) y se midió la absorbancia del sobrenadante de cada muestra a 640 nm. A continuación, conociendo el coeficiente de extinción molar de la ACT  $\epsilon_{640} = 25320$ , se aplicó la ley de Lambert-Beer y se obtuvieron los datos de la concentración de ACT.

### 13.2. ENSAYOS EN MEDIO SOLIDO

Se inocularon como gotas de esporas ( $10^5$  e/5  $\mu$ l) sobre diferentes medios de cultivo y las placas se incubaron a 30 °C durante varios días. El nivel de producción de undecilprodiginina se observó a los 2-3 días de crecimiento a 30 °C y la detección de actinorrodina a los 2- 4 días, dependiendo del medio de cultivo.

### 13.3. BIOENSAYO EN MEDIO SÓLIDO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CDA

Se trata de una modificación del método descrito en (Uguru *et al.*, 2005). Las esporas se inocularon como gotas ( $10^5$  e/5  $\mu$ l) sobre medio solido AN y se incubaron a 30 °C durante 2 días. A continuación las placas se cubrieron con 5 ml de agar nutritivo blando +  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  60 mM que contenía 200  $\mu$ l *B. subtilis* (D.O<sub>600</sub> 0,25) como microorganismo sensible y se incubaron de nuevo a 30 °C durante 24 horas aproximadamente. Como control negativo, se hizo una réplica del experimento añadiendo la cobertera de agar nutritivo blando sin  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

## 14. BASES DE DATOS ONLINE

- **NCBI** - *National Centre of Biotechnology Information*. Para la búsqueda de referencias a través de **PubMed**, para comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante la herramienta **BLAST** y para acceder a información acerca de reguladores de la transcripción utilizando **RR census**.
- **StrepDB** - *The Streptomyces Annotation Server*. Para la consulta de genomas de *Streptomyces*.
- **P2CS** - *Prokaryotic 2-Component Systems*. Para buscar información sobre sistemas de dos componentes bacterianos.
- **RSAT** - *Regulatory Sequence Analysis Tools*. Para encontrar similitudes entre secuencias y definir secuencias consenso.



Anexos







## 1. ABREVIATURAS

**A:** Adenina

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ACT:** Actinorrodina

**Amp:** Ampicilina

**Apra:** Apramicina

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**C:** Citosina

**CDA:** Antibiótico Dependiente de Calcio

**ChIP:** Immunoprecipitación de la Cromatina

**Cln:** Cloranfenicol

**CSR:** Regulador Situado en el *Cluster*

**Cy3:** Cianina 3

**Cy5:** Cianina 5

**D.O:** Densidad Óptica

**e:** Esporas

**EMSA:** Ensayo de Retardo en Gel

**FAM:** 6-carboxifluoresceína

**G:** Guanina

**g:** Gramo

**HK:** Histidina Quinasa

**HyHK:** Histidina Quinasa Híbrida

**Kb:** Kilobase

**kDa:** Kilodalton

**Kn:** Kanamicina

**l:** Litro

**M:** Molar

**mA:** Miliamperios

**ORF:** Marco de Lectura Abierto

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qRT-PCR:** PCR Cuantitativa a Tiempo Real

**RED:** Undecilprodiginina

**rpm:** Revoluciones Por Minuto

**RR:** Regulador de Respuesta

**SARP:** Proteína Reguladora de Antibióticos de *Streptomyces*

**SCO:** *Streptomyces coelicolor* ORF

**TAMRA:** 6-carboxitetrametilrodamina

**TCS:** Sistema de Dos Componentes

**T:** Timina

**Tsr:** Tioestreptona

**URAP:** Regulador Final de la Producción de Antibióticos

**UV:** Ultravioleta

**V:** Voltios

**v:** Volumen

**yCPK:** Poliquétido Críptico Amarillo

**°C:** Grado Centígrado

**ε:** Coeficiente de extinción molar

## 2. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

NOMBRE	SECUENCIA	USO
SRG-01	TTTTTTCATATGCGGCACAGCGGGCCGTG	Oligonucleótido directo para amplificar el promotor de <i>abrC3</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
SRG-02	TTTTTTGGATCCGGAATTGAGATAGGTCAGCACCGC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>abrC3</i> . Con sitio <b>BamHI</b>
SRG-11	TTTTTTCATATGGAGGACAGGGTGCGGGTG	Oligonucleótido directo para amplificar <i>abrC3</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
SRG-12	TTTTTCTCGAGGGAATTGAGATAGGTCAGCACCGC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>abrC3</i> . Con sitio <b>XhoI</b>
SRG-20	TGCACAGGGCTGTGGGGCCGAGGA TCGTGATTCGGGGATCCGTCGACC	Oligonucleótido directo para construir el <i>cassette</i> de delección de <i>abrC3</i>
SRG-21	GGCCGTGAGGTGCACAGGGCTGTGGGGGCC	Oligonucleótido directo para elongar el <i>cassette</i> de delección de <i>abrC3</i>
AY-07	CCCGGTGCTGCTTCCGAGGCATGGGCC GCCGGTGCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Oligonucleótido reverso para construir el <i>cassette</i> de delección de <i>abrC3</i>
AY-16	CCTGGACCGGCCCGGGTCTGCTCCGAG	Oligonucleótido reverso para elongar el <i>cassette</i> de delección de <i>abrC3</i>
SRG-28	GGCCGCCGGGAGGACTGAGGAAG AAGTGATTCGGGGATCCGTCGACC	Oligonucleótido directo para construir el <i>cassette</i> de delección de <i>SCO2281</i>
SRG-29	GGCGACCCTGGCCGCCGGGAGGACTG	Oligonucleótido directo para elongar el <i>cassette</i> de delección de <i>SCO2281</i>
SRG-30	TCGCGCCGGCGTGGCGGCGCTCC GCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Oligonucleótido reverso para construir el <i>cassette</i> de delección de <i>SCO2281</i>
SRG-31	ACGGAACGTCTCGCGCCGGCCGTGGGCG	Oligonucleótido reverso para elongar el <i>cassette</i> de delección de <i>SCO2281</i>
LS-56	CCCCGACTCAGGCGCCGGACCGCCCGGACGGC ACCCTGATGCCATGATTCGGGGATCCGTCGACC	Oligonucleótido directo para construir el <i>cassette</i> de delección de <i>absR1</i>
LS-57	GGCGCCGTCTGTGGCCACGGCGACGGGTGCTTG TGAGCCGCGGGTACATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Oligonucleótido directo para elongar el <i>cassette</i> de delección de <i>absR1</i>
SRG-33	TTTTTTCATATGATCCTCGGCCCCACAGCC	Oligonucleótido reverso para amplificar el promotor de <i>abrC3</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
SRG-37	TTTTTTGAATTCGTCCGCGGGGGCGGGTGC	Oligonucleótido directo para amplificar el promotor de <i>SCO2281</i> . Con sitio <b>EcoRI</b>
SRG-38	TTTTTTCATATGCCGAGATTGTACGAGGCACTCC	Oligonucleótido reverso para amplificar el promotor de <i>SCO2281</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
LS-74	TTTTTTCATATGCCCTCGGGCAGCAGGTGGG	Oligonucleótido directo para amplificar el promotor de <i>absR1</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
LS-75	TTTTTTAGATCTCACCAGTACATGACCGCCGTC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>absR1</i> . Con sitio <b>BglII</b>
LS-80	CTCAAGTACCCTGTATCAGGG	Oligonucleótido directo para amplificar el promotor de <i>absR1</i>
LS-81	CCGGTACTCTTCGTCGCTGC	Oligonucleótido reverso para amplificar el promotor de <i>absR1</i>
AY-93	TCGTGGTGGCGGCCGTACGGATGCC	Oligonucleótido directo para mutación puntual D <sub>61</sub> A en <i>AbrC3</i>
AY-94	GGCATCCGTACGGCCGCCACCACGA	Oligonucleótido reverso para mutación puntual D <sub>61</sub> A en <i>AbrC3</i>
SRG-54	CGTGGTGGCGGAAGTACGGATGC	Oligonucleótido directo para mutación puntual D <sub>61</sub> E en <i>AbrC3</i>
SRG-55	GCATCCGTA CTCCGCCACCACG	Oligonucleótido reverso para mutación puntual D <sub>61</sub> E en <i>AbrC3</i>
SRG-61	TTTTTTCATATGGAGGACAGGGTGCGGG TGGTCATCGCCGAGGCGTCAGTGCTGC	Oligonucleótido directo para mutación puntual D <sub>12</sub> A en <i>AbrC3</i> . Con sitio <b>NdeI</b>
SRG-68	CGCTCGCCCGGCGGAGGAC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO5085p</i>
SRG-69	TGAGGAGCAGCAGCACCAGGAG	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO5085p</i>
SRG-70	GGACCGGTGGACGGGATCC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO4596p</i>
SRG-71	CGGCCACGACCTCGTGCCG	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO4596p</i>
SRG-72	CCCTCGGGCAGCAGGTGGGC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO6992p</i>

NOMBRE	SECUENCIA	USO
SRG-73	GGTGTGCCCGCCGAGGAAGC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO6992p</i>
SRG-74	CCGCCTGGATCACCGGGACC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO0736p</i>
SRG-75	TCGCGGCCTGGGCCGGTGC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO0736p</i>
SRG-76	CGTCGCGGCAGCCACCGCC	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO6809p</i>
SRG-77	AGCTGGTGATCTGGGTCAGACAC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO6809p</i>
SRG-78	GGGTGCACCTCTCCCATTCG	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO3328p</i>
SRG-79	ACCGGTACACGGTCATCTTGAC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO3328p</i>
SRG-80	CGGGCCAGCCGCGCTGCAG	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO2113p</i>
SRG-81	TGGTCTGCAGCTTCGCGTGC	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO2113p</i>
SRG-86	CGTGGACTACGGCTTCTTCGAG	Oligonucleótido directo para amplificar <i>SCO4709p</i>
SRG-87	GGCCGCTCGATCTGGCGG	Oligonucleótido reverso para amplificar <i>SCO4709p</i>
SRG-94	TTTTAAGCTTTGCTTGCCGTCACAAGCGATCTC	Oligonucleótido reverso para amplificar la región 5' de <i>SCO5085p</i> . Con sitio <b>HindIII</b>
SRG-95	TTTTGAATTCCATTGAAATCTGTTGAGTAGGCCTG	Oligonucleótido directo para amplificar la región 3' de <i>SCO5085p</i> . Con sitio <b>EcoRI</b>
SRG-96	CCGCTTAAATCCTCCAGCTCCTGGTGCTG	Oligonucleótido directo para eliminar la secuencia diana de <i>SCO5085p</i>
SRG-97	CAGCACCAGGAGCTGGAGGATTAAGCGG	Oligonucleótido reverso para eliminar la secuencia diana de <i>SCO5085p</i>
SRG-98	TTTTCTGCAGGCCCGCAGCGCCATGACGA	Oligonucleótido reverso para amplificar la región 3' de <i>SCO5085p</i> . Con sitio <b>PstI</b>
SRG-116	CCCTCGGGCAGCAGGTGGGCGAAGGCTGCTCCCGGTCTCG	Oligonucleótido directo para eliminar la secuencia diana de <i>SCO6992p</i>
SRG-119	GTAATTCGCTTAAATCCTCGAAGGC GACCAGCTCCTGGTGCTGCTGCT	Oligonucleótido directo de 50 bases de <i>SCO5085p</i> con la secuencia diana en el centro
SRG-120	AGCAGCAGCACCAGGAGCTGGGTGC CCTTCGAGGATTAAGCGGAATTAC	Oligonucleótido reverso de 50 bases de <i>SCO5085p</i> con la secuencia diana en el centro
SRG-121	CTAGGTGGCCGTTGTAAGCAGAAAGGC GACCTTTCCGACAACGAGAGGAA	Oligonucleótido directo de 50 bases de ADN artificial con la secuencia diana en el centro
SRG-122	TTCCTCTCGTTGTCGAAAAGGTCGC CTTCTGAGTACAACGGCCACCTAG	Oligonucleótido reverso de 50 bases de ADN artificial con la secuencia diana en el centro
Uni-F	ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG	Oligonucleótido universal directo con o sin marcaje FAM para Footprinting
Uni-R	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC	Oligonucleótido universal reverso con o sin marcaje FAM para Footprinting
2779-F	CGAACTGGAAGAACTG	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO2779</i>
2779-R	GAGGGCGAAGTAGTC	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO2779</i>
2779-P	AGTTCCCGTACGAGATCGTC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO2779</i>
4425-F	ACCGCAGGACAACCACA	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO4425</i>
4425-R	GGTTGTCCATCGTGGTGAT	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO4425</i>
4425-P	CCCCTCACGACGCTCGACAA	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO4425</i>
4596-F	AAGACCATCACCGAGCTG	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO4596</i>
4596-R	GTAGCGCTCCTCCACGTA	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO4596</i>
4596-P	GTCGTGGTGGCGGACGTAC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO4596</i>
4597-F	GCTGTGGTTCTGGGTGTT	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO4597</i>

NOMBRE	SECUENCIA	USO
4597-R	GATCTCGAAGGGGTTGTC	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO4597</i>
4597-P	AGGACGGGCTCCAGCTGTAC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO4597</i>
4598-F	GGCACACCTGGAAAGAGA	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO4598</i>
4598-R	ATCACCGTGACCGTCAAT	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO4598</i>
4598-P	CGGCTTACCTACGTGGTGA	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO4598</i>
4709-F	AGGTCTGGATCAACAT	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO4709</i>
4709-R	GCGATCTTCTCGTTG	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO4709</i>
4709-P	ATGTTGAGCTGCCTACCC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO4709</i>
5085-F	GTGTCCATGTAATCACC	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO5085</i>
5085-R	GTCAGGACCAATTC	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO5085</i>
5085-P	CTTAAATCCTCGAAGGCGAC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO5085</i>
6992-F	GACCGTACGATGAACTT	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del <i>SCO6992</i>
6992-R	CAGGATGTTGTGGAA	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del <i>SCO6992</i>
6992-P	GACGACGAGGCCGTCTAC	Sonda para qRT-PCR del <i>SCO6992</i>

# Bibliografía |



## | A

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.

Adham, S.A., Honrubia, P., Díaz, M., Fernández-Ábalos, J.M., Santamaría, R.I. y Gil, J.A. (2001). Expression of the genes coding for the xylanase Xys1 and the cellulase Cell1 from the straw-decomposing *Streptomyces halstedii* JM8 cloned into the amino-acid producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. *Arch Microbiol* *177*, 91-97.

Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P. y Pernodet, J.L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J Ind Microbiol Biotechnol* *41*, 251-263.

Allenby, N.E., Laing, E., Bucca, G., Kierzek, A.M. y Smith, C.P. (2012). Diverse control of metabolism and other cellular processes in *Streptomyces coelicolor* by the PhoP transcription factor: genome-wide identification of in vivo targets. *Nucleic Acids Res* *40*, 9543-9556.

Arribas-Bosacoma, R., Kim, S.K., Ferrer-Orta, C., Blanco, A.G., Pereira, P.J., Gomis-Ruth, F.X., Wanner, B.L., Coll, M. y Sola, M. (2007). The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol* *366*, 626-641.

Attwood, P.V. (2013). Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochem Soc Trans* *41*, 1023-1028.

## | B

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

Bao, K. y Cohen, S.N. (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev* *15*, 1518-1527.

Beier, D. y Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* *9*, 143-152.

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., Rabinowitsch, 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 *Streptomyces*. *Methods Enzymol* *458*, 93-116.

Bibb, M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* *8*, 208-215.

Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *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 Res* *14*, 893-900.

Boll, J.M. y Hendrixson, D.R. (2011). A specificity determinant for phosphorylation in a response regulator prevents in vivo cross-talk and modification by acetyl phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20160-20165.

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*. *Arch Microbiol*.

Bucca, G., Laing, E., Mersinias, V., Allenby, N., Hurd, D., Holdstock, J., Brenner, V., Harrison, M. y Smith, C.P. (2009). Development and application of versatile high density microarrays for genome-wide analysis of *Streptomyces coelicolor*: characterization of the HspR regulon. *Genome Biol* *10*, R5.

Buelow, D.R. y Raivio, T.L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* 75, 547-566.

Bunet, R., Song, L., Mendes, M.V., Corre, C., Hotel, L., Rouhier, N., Framboisier, X., Leblond, P., Challis, G.L. y Aigle, B. (2011). Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of kinamycins. *J Bacteriol* 193, 1142-1153.

| C

Cairns, L.S., Marlow, V.L., Bissett, E., Ostrowski, A. y Stanley-Wall, N.R. (2013). A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 90, 6-21.

Capra, E.J. y Laub, M.T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* 66, 325-347.

Capstick, D.S., Jomaa, A., Hanke, C., Ortega, J. y Elliot, M.A. (2011). Dual amyloid domains promote differential functioning of the chaplin proteins during *Streptomyces* aerial morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9821-9826.

Carballès, F., Bertrand, C., Bouché, J.-P. y Cam, K. (1999). Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rcsC-rcsB*. *Mol Microbiol* 34, 442-450.

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.

Craney, A., Ozimok, C., Pimentel-Elardo, S.M., Capretta, A. y Nodwell, J.R. (2012). Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chem Biol* 19, 1020-1027.

Challis, G.L. (2014). Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 219-232.

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. y Losick, R. (1997). Mycelial life style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. . In: *Bacteria as Multicellular Organism*.

Chater, K.F. y Wilde, L.C. (1980). *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *J Gen Microbiol* 116, 323-334.

| D

Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.

Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 185-201.

den Hengst, C.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K. y Buttner, M.J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* 78, 361-379.

Díaz, M., Esteban, A., Fernández-Ábalos, J.M. y Santamaría, R.I. (2005). The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 151, 2583-2592.

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. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 211-217.

Doull, J.L., Singh, A.K., Hoare, M. y Ayer, S.W. (1994). Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J Ind Microbiol* 13, 120-125.



## | E

Elliot, M.A., Bibb, M.J., Buttner, M.J. y Leskiw, B.K. (2001). BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 40, 257-269.

## | F

Feng, W.H., Mao, X.M., Liu, Z.H. y Li, Y.Q. (2011). The ECF sigma factor SigT regulates actinorhodin production in response to nitrogen stress in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 1009-1021.

Fernández-Ábalos, 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.

Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. y Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66, 769-780.

Fowler-Goldsworthy, K., Gust, B., Mouz, S., Chandra, G., Findlay, K.C. y Chater, K.F. (2011). The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 157, 1312-1328.

Franco, E. (2013). Efecto fenotípico de la delección de los genes codificantes de las quinasas AbrC1 y AbrC2 en *Streptomyces coelicolor*, Trabajo Fin de Grado. Universidad de Salamanca.

## | G

Galperin, M.Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13, 150-159.

Gao, C., Hindra, Mulder, D., Yin, C. y Elliot, M.A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *mBio* 3.

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

Gomez-Escribano, J.P. y Bibb, M.J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to

manipulation of biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 425-431.

Gopel, Y. y Gorke, B. (2012). Rewiring two-component signal transduction with small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 15, 132-139.

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.

Guerra, S.M., Rodríguez-García, A., Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Payero, T.D., Martín, J.F. y Aparicio, J.F. (2012). LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLOS ONE* 7, e31475.

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.

Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T. y Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1541-1546.

Guthrie, E.P., Flaxman, C.S., White, J., Hodgson, D.A., Bibb, M.J. y Chater, K.F. (1998). A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket. *Microbiology* 144 (Pt 3), 727-738.

## | H

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T. y Jung, K. (2009). The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress. *J Mol Biol* 386, 134-148.

- Hempel, A.M., Cantlay, S., Molle, V., Wang, S.B., Naldrett, M.J., Parker, J.L., Richards, D.M., Jung, Y.G., Buttner, M.J. y Flardh, K. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2371-2379.
- Higo, A., Hara, H., Horinouchi, S. y Ohnishi, Y. (2012). Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network. *DNA res* 19, 259-274.
- Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2008). Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 154, 905-914.
- Ho, T.F., Ma, C.J., Lu, C.H., Tsai, Y.T., Wei, Y.H., Chang, J.S., Lai, J.K., Cheuh, P.J., Yeh, C.T., Tang, P.C., Tsai Chang, J., Ko, J.L., Liu, F.S., Yen, H.E. y Chang, C.C. (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 225, 318-328.
- Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* 42, 47-238.
- Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P.J., Rudd, B.A., Hayes, M.A., Smith, C.P. y Micklefield, J. (2002). Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol* 9, 1175-1187.
- Homerova, D., Knirschova, R. y Kormanec, J. (2002). Response regulator ChiR regulates expression of chitinase gene, *chiC*, in *Streptomyces coelicolor*. *Folia Microbiol (Praha)* 47, 499-505.
- Homerova, D., Sevcikova, J. y Kormanec, J. (2003). Characterization of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) *wblE* gene, encoding a homologue of the sporulation transcription factor. *Folia microbiologica* 48, 489-495.
- 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.
- Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M. y Bibb, M.J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J Gen Microbiol* 129, 2257-2269.
- Hsiao, N.H. y Kirby, R. (2009). Two-component signal transduction systems in *Streptomyces* and related organisms studied using DNA comparative microarray analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95, 189-206.
- Huang, J., Lih, C.J., Pan, K.H. y Cohen, S.N. (2001). Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev* 15, 3183-3192.
- 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*. *Mol Microbiol* 58, 1276-1287.
- Hutchings, M.I., Hong, H.J. y Buttner, M.J. (2006). The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 59, 923-935.
- 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.

## | I

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. y Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21, 526-531.

Ikeda, H., Shin-Ya, K. y Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis*

genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* *41*, 233-250.

Iqbal, M., Mast, Y., Amin, R., Hodgson, D.A., Consortium, S., Wohlleben, W. y Burroughs, N.J. (2012). Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: characterizing key regulators of nutrient depletion responses in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* *40*, 5227-5239.

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.

## | J

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.

Joslin, S.N. y Hendrixson, D.R. (2009). Activation of the *Campylobacter jejuni* FlgSR two-component system is linked to the flagellar export apparatus. *J Bacteriol* *191*, 2656-2667.

Jung, K., Fried, L., Behr, S. y Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol* *15*, 118-124.

## | K

Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S. y Ochi, K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Lett* *274*, 311-315.

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

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

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

Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. y Ikeda, H. (2010). Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous

expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 2646-2651.

Kox, L.F., Wosten, M.M. y Groisman, E.A. (2000). A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J* *19*, 1861-1872.

## | L

Lakey, J.H., Lea, E.J., Rudd, B.A., Wright, H.M. y Hopwood, D.A. (1983). A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol* *129*, 3565-3573.

Larson, J.L. y Hershberger, C.L. (1986). The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid* *15*, 199-209.

Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L. y Aigle, B. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 6258-6263.

Lee, H.N., Kim, J.S., Kim, P., Lee, H.S. y Kim, E.S. (2013). Repression of antibiotic downregulator WblA by AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* *79*, 4159-4163.

Lee, P.C., Umeyama, T. y Horinouchi, S. (2002). *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* *43*, 1413-1430.

Lewis, R.A., Laing, E., Allenby, N., Bucca, G., Brenner, V., Harrison, M., Kierzek, A.M. y Smith, C.P. (2010). Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization. *BMC genomics* *11*, 682.

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.

Lian, W., Jayapal, K.P., Charaniya, S., Mehra, S., Glod, F., Kyung, Y.S., Sherman, D.H. y Hu, W.S. (2008). Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic

- regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics* 9, 56.
- Liu, G., Chater, K.F., Chandra, G., Niu, G. y Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 112-143.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lombó, F., Braña, A.F., Salas, J.A. y Méndez, C. (2004). Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chembiochem* 5, 1181-1187.
- 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*. *J Bacteriol* 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*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 625-635.
- Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C. y Sánchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett* 274, 118-125.
- Manteca, A., Fernández, M. y Sánchez, J. (2005). Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol* 5, 51.
- Martín, J.F. y Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 13, 263-273.
- Martín, J.F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L.T., Prieto, C. y Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol* 4, 165-174.
- Martínez-Antonio, A. y Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 482-489.
- McKenzie, N.L. y Nodwell, J.R. (2007). Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol* 189, 5284-5292.
- McKenzie, N.L., Thaker, M., Koteva, K., Hughes, D.W., Wright, G.D. y Nodwell, J.R. (2010). Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA1*. *J Antibiot (Tokyo)* 63, 177-182.
- Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B. y Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol* 31, 446-450.
- Mo, S., Sydor, P.K., Corre, C., Alhamadsheh, M.M., Stanley, A.E., Haynes, S.W., Song, L., Reynolds, K.A. y Challis, G.L. (2008). Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chem Biol* 15, 137-148.
- Möglich, A., Ayers, R.A. y Moffat, K. (2010). Addition at the molecular level: signal integration in designed per-ARNT-Sim receptor proteins. *J Mol Biol* 400, 477-486.

| N

- Nair, G.R., Lai, X., Wise, A.A., Rhee, B.W., Jacobs, M. y Binns, A.N. (2011). The integrity of the periplasmic domain of the VirA sensor kinase is critical for optimal coordination of the

virulence signal response in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* *193*, 1436-1448.

Nazari, B., Kobayashi, M., Saito, A., Hassaninasab, A., Miyashita, K. y Fujii, T. (2013). Chitin-induced gene expression in secondary metabolic pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *Appl Environ Microbiol* *79*, 707-713.

Neiditch, M.B., Federle, M.J., Pompeani, A.J., Kelly, R.C., Swem, D.L., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L. y Hughson, F.M. (2006). Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* *126*, 1095-1108.

Nothhaft, H., Rigali, S., Boomsma, B., Swiatek, M., McDowall, K.J., van Wezel, G.P. y Titgemeyer, F. (2010). The permease gene *nagE2* is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Mol Microbiol* *75*, 1133-1144.

## | o

Ochi, K. (2007). From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem* *71*, 1373-1386.

Ochi, K. y Okamoto, S. (2012). A magic bullet for antibiotic discovery. *Chem Biol* *19*, 932-934.

Ochi, K., Tanaka, Y. y Tojo, S. (2014). Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol* *41*, 403-414.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. y Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* *190*, 4050-4060.

Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K. y Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster. *Chem Biol* *16*, 226-236.

Olano, C., García, I., González, A., Rodríguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A.F., Méndez, C. y Salas, J.A. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol*.

Olivera, B.C., Ugalde, E. y Martínez-Antonio, A. (2010). Regulatory dynamics of standard two-component systems in bacteria. *J Theor Biol* *264*, 560-569.

Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. y Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol* *77*, 400-406.

Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. y Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. I Purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* *54*, 1036-1044.

## | P

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). *Mol Microbiol* *33*, 97-107.

Park, S.S., Yang, Y.H., Song, E., Kim, E.J., Kim, W.S., Sohng, J.K., Lee, H.C., Liou, K.K. y Kim, B.G. (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol* *36*, 1073-1083.

Park, U., Suh, J. y Hong, S. (2000). Genetic analysis of *absR*, a new *abs* locus of *Streptomyces coelicolor*. *J Microbiol Biotechnol* *10*.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A.F., Shimkets, L.J., Sevillano, L. y Santamaría, R.I. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* *4*, 175-183.

Pinnert-Sindico, S. (1954). Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp. caractères culturaux. *Ann Inst Pasteur (Paris)* *87*, 702-707.

Podgornaia, A.I. y Laub, M.T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* *16*, 156-162.

Poteete, A.R. (2001). What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and

biological function. *FEMS Microbiol Lett* 201, 9-14.

## | R

Raveh, A., Delekta, P.C., Dobry, C.J., Peng, W., Schultz, P.J., Blakely, P.K., Tai, A.W., Maitinaho, 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.

Ray, J.C. y Igoshin, O.A. (2010). Adaptable functionality of transcriptional feedback in bacterial two-component systems. *PLOS Comput Biol* 6, e1000676.

Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. y Hopwood, D.A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 21, 77-96.

Rico, S., Santamaría, R.I., Yepes, A., Rodríguez, H., Laing, E., Bucca, G., Smith, C.P. y Díaz, M. (2014). Deciphering the regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Appl Environ Microbiol* 80, 2417-2428.

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. y van Wezel, G.P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* 9, 670-675.

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 *delta phoP* mutant. *Proteomics* 7, 2410-2429.

Rodríguez-García, A., Ludovice, M., Martín, J.F. y Liras, P. (1997). Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol Microbiol* 25, 219-228.

Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M. y Santamaría, R.I. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb Cell Fact* 12, 127.

Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco, E., Santamaría, R.I. y Díaz, M. Functional characterization of the two kinases AbrC1 and

AbrC2 of the atypical two-component system AbrC1/C2/C3 from *Streptomyces coelicolor*.

Rodríguez, S., Santamaría, R.I., Fernández-Ábalos, J.M. y Díaz, M. (2005). Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 *xysA* promoter. *Gene* 351, 1-9.

Rose, M.D., F. Winston and P. Hieter. (1990). *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*.

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.

Ryding, N.J., Anderson, T.B. y Champness, W.C. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* 184, 794-805.

## | S

Salvado, B., Vilaprinyo, E., Karathia, H., Sorribas, A. y Alves, R. (2012). Two component systems: physiological effect of a third component. *PLOS ONE* 7, e31095.

Sambrook, J. y Green, M.R. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 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.

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

Santos-Beneit, F., Barriuso-Iglesias, M., Fernández-Martínez, L.T., Martínez-Castro, M., Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A. y Martín, J.F. (2011). The RNA polymerase omega factor RpoZ is regulated by PhoP and has an important role in antibiotic biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 77, 7586-7594.

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A. y Martín, J.F. (2009). Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*,

- pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol* **72**, 53-68.
- Scaramozzino, F., White, A., Perego, M. y Hoch, J.A. (2009). A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **191**, 687-692.
- Scott, K.A., Porter, S.L., Bagg, E.A., Hamer, R., Hill, J.L., Wilkinson, D.A. y Armitage, J.P. (2010). Specificity of localization and phosphotransfer in the CheA proteins of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **76**, 318-330.
- Schramm, A., Lee, B. y Higgs, P.I. (2012). Intra- and interprotein phosphorylation between two-hybrid histidine kinases controls *Myxococcus xanthus* developmental progression. *J Biol Chem* **287**, 25060-25072.
- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M. y Hutchings, M.I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev* **36**, 862-876.
- Sekurova, O.N., Brautaset, T., Sletta, H., Borgos, S.E., Jakobsen, M.O., Ellingsen, T.E., Strom, A.R., Valla, S. y Zotchev, S.B. (2004). In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **186**, 1345-1354.
- Sheeler, N.L., MacMillan, S.V. y Nodwell, J.R. (2005). Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **187**, 687-696.
- Shi, X. (2008). An analysis of two-component regulatory systems in *Myxococcus xanthus*.
- Sidda, J.D. y Corre, C. (2012). Gamma-butyrolactone and furan signaling systems in *Streptomyces*. *Methods Enzymol* **517**, 71-87.
- 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.
- Smith, C.L., Econome, J.G., Schutt, A., Klco, S. y Cantor, C.R. (1987). A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* **236**, 1448-1453.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Swiatek, M.A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y.H., Laing, E., Kim, B.G., Smith, C.P. y van Wezel, G.P. (2013). The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **195**, 1236-1248.
- Swiercz, J.P., Nanji, T., Gloyd, M., Guarne, A. y Elliot, M.A. (2013). A novel nucleoid-associated protein specific to the actinobacteria. *Nucleic Acids Res* **41**, 4171-4184.
- Szurmant, H. y Hoch, J.A. (2010). Interaction fidelity in two-component signaling. *Curr Opin Microbiol* **13**, 190-197.
- Szurmant, H., White, R.A. y Hoch, J.A. (2007). Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 706-715.
- | T
- Tahlan, K., Ahn, S.K., Sing, A., Bodnaruk, T.D., Willems, A.R., Davidson, A.R. y Nodwell, J.R. (2007). Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **63**, 951-961.
- Takano, E., Kinoshita, H., Mersinias, V., Bucca, G., Hotchkiss, G., Nihira, T., Smith, C.P., Bibb, M., Wohlleben, W. y Chater, K. (2005). A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **56**, 465-479.
- Thomason, P. y Kay, R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci* **113** ( Pt 18), 3141-3150.
- 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.
- Tomono, A., Mashiko, M., Shimazu, T., Inoue, H., Nagasawa, H., Yoshida, M., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2006). Self-activation of serine/threonine kinase AfsK on autophosphorylation at threonine-168. *J Antibiot (Tokyo)* **59**, 117-123.

Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C. y Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* 4.

| U

Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S. y McDowall, K.J. (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 58, 131-150.

Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 5, 67-74.

| V

van Keulen, G., Jonkers, H.M., Claessen, D., Dijkhuizen, L. y Wosten, H.A. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 185, 1455-1458.

van Wezel, G.P. y McDowall, K.J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep* 28, 1311-1333.

| W

Waksman, S.A. (1967). The Genus *Streptomyces*. In *The Actinomycetes. A Summary of Current Knowledge*, New York, 101-112.

Wang, C., Ge, H., Dong, H., Zhu, C., Li, Y., Zheng, J. y Cen, P. (2007). A novel pair of two-component signal transduction system *ecrE1/ecrE2* regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Biologia* 62, 511-516.

Wang, L., Tian, X., Wang, J., Yang, H., Fan, K., Xu, G., Yang, K. y Tan, H. (2009a). Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8617-8622.

Wang, R., Mast, Y., Wang, J., Zhang, W., Zhao, G., Wohlleben, W., Lu, Y. y Jiang, W. (2013). Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 87, 30-48.

Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W. y Lu, Y. (2009b). Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 294, 150-156.

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.

White, J. y Bibb, M. (1997). *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J Bacteriol* 179, 627-633.

Wietzorrek, A. y Bibb, M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25, 1181-1184.

Wilson, D.J., Xue, Y., Reynolds, K.A. y Sherman, D.H. (2001). Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol* 183, 3468-3475.

Willett, J.W., Tiwari, N., Muller, S., Hummels, K.R., Houtman, J.C., Fuentes, E.J. y Kirby, J.R. (2013). Specificity residues determine binding affinity for two-component signal transduction systems. *mBio* 4, e00420-00413.

Wolanin, P.M., Thomason, P.A. y Stock, J.B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3, Reviews 3013.3011.

Wuichet, K., Cantwell, B.J. y Zhulin, I.B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* 13, 219-225.

| Y

Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. y Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151, 2899-2905.

Yang, Y.H., Song, E., Willemsse, J., Park, S.H., Kim, W.S., Kim, E.J., Lee, B.R., Kim, J.N., van Wezel, G.P. y Kim, B.G. (2012). A novel function of *Streptomyces* integration host factor



(sIHF) in the control of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Antonie van Leeuwenhoek* *101*, 479-492.

Yao, M.D., Miyazono, K., Ohtsuka, J., Hirano, S., Nagata, K., Horinouchi, S., Ohnishi, Y. y Tanokura, M. (2012). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the DNA-binding domain of AdpA, the central transcription factor in the A-factor regulatory cascade in the filamentous bacterium *Streptomyces griseus*, in complex with a duplex DNA. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* *68*, 946-949.

Yepes, A. (2010). Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*, Tesis Doctoral. Universidad de 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.

Yoon, V. y Nodwell, J.R. (2014). Activating secondary metabolism with stress and chemicals. *J Ind Microbiol Biotechnol* *41*, 415-424.

Young, F.E.a.W., G.A. (1974). *Bacillus subtilis*. Handbook of genetics. King, R.C. (Ed). New York. 1:69-114.

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*. *Mol Microbiol* *85*, 535-556.

## | Z

Zhang, Y.X., Denoya, C.D., Skinner, D.D., Fedechko, R.W., McArthur, H.A., Morgenstern, M.R., Davies, R.A., Lobo, S., Reynolds, K.A. y Hutchinson, C.R. (1999). Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology* *145 (Pt 9)*, 2323-2334.