

Regulación génica en *Streptomyces*

Ramón Santamaría, Margarita Díaz, Laura Sevillano, Sergio Antoraz, Ricardo Sánchez de la Nieta, Marta González, Ana M. Martínez



Instituto de Biología Funcional y Genómica. Consejo superior de Investigaciones Científicas/ Universidad de Salamanca. Salamanca



Grupo RS: De izquierda a derecha: Margarita Díaz, Ramón Santamaría, Sergio Antoraz, Ricardo Sánchez de la Nieta, Marta González, Ana M. Martínez y Laura Sevillano.

El grupo de investigación dirigido por los doctores Ramón Santamaría y Margarita Díaz profundiza en el estudio de diferentes aspectos de la biología de las bacterias del género *Streptomyces*. Actualmente estamos desarrollando dos proyectos uno centrado en la regulación de la producción de antibióticos mediada por sistemas de dos componentes y el otro en el desarrollo de vectores y cepas para la expresión de proteínas en *Streptomyces*; en particular, para la expresión de enzimas hidrolíticas con potencial industrial.

Streptomyces, con más de 900 especies descritas y cerca de 200 secuenciadas es un género de bacterias que destaca por su capacidad para producir antibióticos y antitumorales (producen más del 50 % de todos los antibióticos naturales disponibles). Ese

potencial se ha visto incrementado con la secuenciación de su DNA al observar que todas las especies secuenciadas poseen múltiples *clusters* biosintéticos que, inactivos en las condiciones de laboratorio, están implicados en la síntesis de metabolitos secundarios desconocidos. El conseguir la producción e identificación de estos metabolitos crípticos y conseguir niveles de producción adecuados, incluso de los metabolitos ya conocidos, es una tarea en la que están implicados multitud de grupos y empresas a nivel mundial utilizando aproximaciones muy variadas (Antoraz *et al.* 2015)

Nosotros, utilizando *S. coelicolor* como modelo, nos hemos enfrentado a este reto centrando nuestra investigación en el estudio de regulación que ejercen diferentes

sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos con objeto de poder manipular esta regulación y potenciar rutas de producción de antibióticos conocidos y/o activar rutas silenciadas de producción. Hasta la fecha, hemos estudiado el efecto que ejercen seis sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos mediante la mutación de los genes que los integran (Yepes *et al.* 2011). En la actualidad estamos profundizando en el estudio de los tres que ejercen mayor efecto, y hemos descrito que los sistemas que denominamos AbrA1/A2 y AbrB1/B2 ejercen un efecto negativo sobre la producción de antibióticos (Rico *et al.* 2014a,b) mientras que el sistema AbrC1/C2/C3 (sistema atípico, compuesto por dos quinasas y un regulador) ejerce un efecto positivo sobre la producción de estos meta-



Colonias de *Streptomyces coelicolor* produciendo el antibiótico actinorrodina.

bolitos (Rodríguez *et al.* 2015). El empleo de las cepas delecionadas en los sistemas negativos como cepas hospedadoras para la expresión heteróloga de distintas rutas de antitumorales nos ha permitido demostrar su utilidad al duplicar su producción respecto a la cepa parental (Rico *et al.* 2014a). Además, la sobreexpresión del regulador positivo AbrC3 en otras especies de *Streptomyces* induce la producción de metabolitos endógenos en las mismas y puede ayudarnos a descubrir nuevas moléculas bioactivas de interés para la medicina producidas por diferentes especies (Rico *et al.* 2014b y resultados no publicados).

Nuestra segunda línea de trabajo se apoya en la capacidad de secreción que estos organismos poseen. En particular, producen gran cantidad de enzimas hidrolíticas secretadas que les permiten degradar la materia orgánica de su nicho biológico principal, el suelo, y utilizar los nutrientes generados para su desarrollo. Esta capacidad secretora hace de *Streptomyces* una posible alternativa muy interesante como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas con interés industrial.

Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el estudio la producción de enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos por estas bacterias.

Uno de los frutos de ese trabajo ha sido la identificación de varios promotores fuertes regulados por la fuente de carbono presente en los medios de cultivo que han sido empleados en diferentes vectores para la sobreexpresión de varias proteínas de interés industrial en *Streptomyces* (Díaz *et al.* 2008, 2011; Sevillano *et al.* 2016). Este estudio se ha complementado con el desarrollo de vectores de expresión con selección positiva que no requieren la adición de antibióticos para su mantenimiento durante la etapa de producción en el fermentador. Para este fin hemos utilizado un sistema toxina-antitoxina YoeB/YefM de *S. lividans* que hemos descrito y que ha sido el primer sistema toxina-antitoxina demostrado funcionalmente en *Streptomyces* (Sevillano *et al.* 2012). Durante el desarrollo de este sistema de expresión hemos generado una cepa en la que hemos delecionado todo el sistema YoeB/YefM del genoma y en la que hemos reinsertado el gen de la toxina en el genoma de una cepa que a su vez expresa la antitoxina y el gen que codifica la proteína de interés desde un plásmido. La pérdida de este plásmido provoca la desaparición de la antitoxina y como consecuencia la toxina se activa y la célula muere. El sistema que hemos ensayado con varias proteínas es muy efectivo y prometedor para el escalado a nivel industrial de los productos con el consiguiente ahorro en el proceso y la necesidad de la eliminación

de la contaminación por antibióticos en el producto final (Sevillano *et al.* 2013).

REFERENCIAS

- Sevillano L., Vijgenboom E., van Wezel GP., Díaz, M. and Santamaría, R. I. (2016) New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces*. *Microbial Cell Factories* 15:28.
- Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Santamaría, R. I. and Díaz, M. (2015). The two kinases, AbrC1 and AbrC2, of the atypical two-component system AbrC are needed to regulate antibiotic production and differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology* 6:450 doi: 10.3389/fmicb.2015.00450.
- Antoraz, S., Santamaría, R.I., Díaz, M., Sanz, D. and Rodríguez, H. (2015) Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* Arsenal. *Frontiers in Microbiology* 6:461 doi: 10.3389/fmicb.2015.00461.
- Rico S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S., Krause, E., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2014 a). "Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production." *PLOS One* 9:e109844.
- Rico S, Santamaría RI, Yepes A, Rodríguez H, Laing E, Bucca G, Smith CP, Díaz M. (2014b). "Deciphering the regulon of the *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiology* 80(8): 2417-2428.
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2013). "Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways". *Microbial Cell Factories* 12:127.
- Sevillano, L., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2013). "Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system" *Microbial Cell Factories* 12:39.
- Díaz, M., Sevillano, L., Rico, S., Lombo, F., Braña, AF, Salas, JA., Méndez, C. and Santamaría, R.I. (2013). "High level of antibiotic production in a double polyphosphate kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans*". *FEMS letters* 342, 123-129.
- Sevillano L., Díaz, M. and Santamaría, R.I. (2012). Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. *PLoS One* 7(3): e32977.
- Yepes, A., Rico, S., Rodríguez, A., Santamaría, R.I. and Díaz, M. (2011). "Novel two-components systems involved in antibiotic regulation in *Streptomyces coelicolor*". *PLoS One* 6(5): e19980.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado J, Braña AF, Shimkets L J, Sevillano L and Santamaría R.I. (2011). "Myxococcus xanthus induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*". *Microbial Biotechnology* 4:175-183.
- Esteban A, Díaz M, Yepes A and Santamaría R.I. (2008). "Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator." *BMC Microbiology* 8:201 doi:10.1186/1471-2180-8-201.
- Díaz, M., Ferreras, E., Moreno, R., Yepes, A., Berenguer, J. and Santamaría, R.I., (2008). "High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 1001-1008.