



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

---

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

# TESIS DOCTORAL

---

**Sistemas de Dos Componentes de  
*Streptomyces coelicolor*, pilares en  
la producción de antibióticos**

Ricardo Sánchez de la Nieta Moreno

Salamanca, 2022



**Dra. Margarita M. Díaz Martínez**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, y **Dr. Ramón I. Santamaría Sánchez**, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada **“Sistemas de Dos Componentes de *Streptomyces coelicolor*, pilares en la producción de antibióticos”**, presentada por D. Ricardo Sánchez de la Nieta Moreno para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extienden el presente certificado en Salamanca, a 4 de julio de 2022.



Fdo: Margarita M. Díaz Martínez



Fdo: Ramón I. Santamaría Sánchez

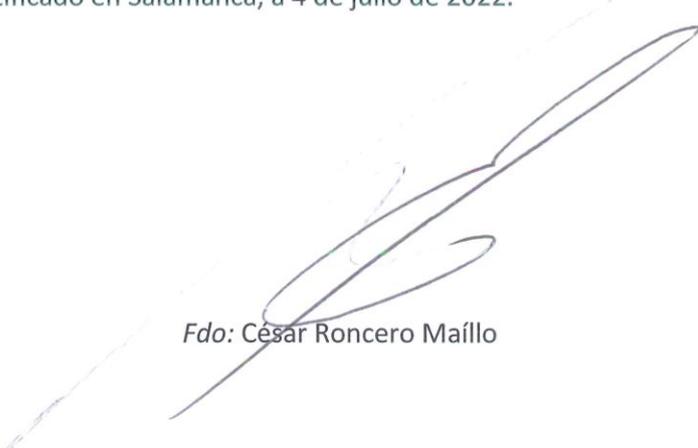


**Dr. César Roncero Maíllo**, Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica (R.D. 99/2011) de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada **“Sistemas de Dos Componentes de *Streptomyces coelicolor*, pilares en la producción de antibióticos”**, presentada por D. Ricardo Sánchez de la Nieta Moreno para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Margarita M. Díaz Martínez y el Dr. Ramón I. Santamaría Sánchez en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extiende el presente certificado en Salamanca, a 4 de julio de 2022.



Fdo: César Roncero Maíllo



## FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda para contratos predoctorales para la Formación de Profesorado Universitario (FPU), de los subprogramas de Formación y Movilidad dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, por parte del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref.: **FPU17/02862**).

El trabajo realizado ha sido financiado a través de los proyectos **BIO2015-66958-R** (Ministerio de Economía y Competitividad / Fondo Europeo de Desarrollo Regional), **PID2019-107716RB-I00** (Ministerio de Ciencia e Innovación / Agencia Estatal de Investigación) y **SA036G19** (Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León).

El Instituto de Biología Funcional y Genómica (Universidad de Salamanca / Consejo Superior de Investigaciones Científicas), donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ha recibido apoyo económico a través del programa “Escalera de Excelencia” **CLU-2017-03/14-20** (Junta de Castilla y León / Fondo Europeo de Desarrollo Regional).



## AGRADECIMIENTOS

La Tesis es un largo camino lleno de alegrías, pero también de baches e incertidumbres. He tenido la suerte de estar rodeado de gente maravillosa gracias a la cual he podido llegar al final de esta etapa y a la que me gustaría dedicarle unas palabras.

En primer lugar me gustaría dirigirme a Marga y Ramón. Os agradezco enormemente vuestra confianza y continuo apoyo durante estos años; no solo me habéis mostrado los grandes científicos que sois, sino también las grandes personas que hay detrás. Me habéis enseñado mucho y espero que podáis sentir os orgullosos de todo este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros del 1.9, habéis conseguido que le tenga un gran cariño al laboratorio, a pesar de los caprichos de *Streptomyces*. Siempre me habéis echado una mano para sacar adelante los experimentos y gracias a vosotros estos años han pasado como un suspiro. Quiero hacer especial mención a Ana y Sergio, pero tampoco me quiero olvidar de Carolina, Javier, Laura S., Helena, Rosa, Laura G., Marta, Ramiro, María L., Clara y María M. Os voy a echar mucho de menos en el día a día y espero que a todos os vaya genial allá donde vayáis.

Esta Tesis la he realizado en el IBFG y me gustaría agradecer a todos aquellos que han estado ahí, haciendo más llevadero el trabajo. Aunque estos últimos años no ha sido posible, recordaré con ilusión los cafés en los que acaparábamos las mesas de la cafetería.

También me gustaría agradecer al Dr. Juan F. Alzate por su apoyo científico, así como a Paco y a Avelino por el entusiasmo que transmiten por la docencia.

No habría llegado hasta aquí si no fuera por mis padres y mi hermano. Habéis forjado quién soy y os estoy eternamente agradecido. A pesar de la distancia durante esta etapa, sé que siempre puedo contar con vosotros.

Iris, nunca podré agradecerte lo suficiente por estar siempre ahí y aguantarme, en los buenos momentos pero sobre todo en los malos. Compartir mi vida contigo es un lujo y una auténtica aventura.

Sin embargo, por encima de todo, me gustaría dedicar esta Tesis a Melisa. Espero con ganas que puedas leer esto cuando seas más mayor. Tu sonrisa consigue que todos los problemas se esfumen. Eres la alegría de mi vida.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>IN.1 - Antibióticos, la gran revolución de la medicina moderna</b>	<b>3</b>
<b>IN.1.1 - Bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, una amenaza global</b>	<b>4</b>
<b>IN.1.2 - Desarrollo de nuevos antibióticos, una carrera a contrarreloj</b>	<b>6</b>
<b>IN.2 - El género <i>Streptomyces</i></b>	<b>7</b>
<b>IN.2.1 - <i>Streptomyces</i>, una fuente inagotable de antibióticos</b>	<b>7</b>
<b>IN.2.2 - Características generales de los estreptomicetos</b>	<b>9</b>
<b>IN.2.3 - Ciclo vital de <i>Streptomyces coelicolor</i></b>	<b>10</b>
<b>IN.2.4 - Organización genómica de <i>Streptomyces coelicolor</i></b>	<b>16</b>
<b>IN.2.5 - Regulación de la producción de antibióticos en <i>Streptomyces coelicolor</i></b>	<b>18</b>
<b>IN.3 - Sistemas de Dos Componentes</b>	<b>24</b>
<b>IN.3.1 - Arquitectura de las Histidina Quinasas</b>	<b>25</b>
<b>IN.3.2 - Histidina Quinasas quiméricas</b>	<b>28</b>
<b>IN.3.3 - Arquitectura de los Reguladores de Respuesta</b>	<b>30</b>
<b>IN.3.4 - Organización de Histidina Quinasas y Reguladores de Respuesta</b>	<b>32</b>
<b>IN.3.5 - Mecanismo molecular de acción de los Sistemas de Dos Componentes</b>	<b>33</b>
<b>IN.3.6 - Modulación de la cascada de señalización</b>	<b>35</b>
<b>IN.3.7 - Sistemas de Dos Componentes en <i>Streptomyces coelicolor</i></b>	<b>37</b>
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 1. El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2</b>	<b>53</b>
<b>C1.1 - Análisis <i>in silico</i> de AbrB1/B2</b>	<b>53</b>
<b>C1.2 - Construcción de la cepa <i>Streptomyces coelicolor</i> M145 <math>\Delta</math>abrB1/B2</b>	<b>58</b>
<b>C1.3 - Análisis fenotípico del mutante <math>\Delta</math>abrB1/B2</b>	<b>60</b>
<b>C1.4 - Análisis fenotípico de mutantes en los sistemas AbrB1/B2 y AbrA1/A2</b>	<b>65</b>
<b>C1.5 - Producción heteróloga de antibióticos</b>	<b>66</b>
<b>C1.6 - Análisis transcripcional de AbrB1/B2</b>	<b>69</b>

<b>C1.7</b> - Análisis transcriptómico.....	70
<b>C1.7.1</b> - Genes implicados en respuesta a estrés .....	74
<b>C1.7.2</b> - Genes implicados en metabolismo secundario .....	76
<b>C1.7.3</b> - Genes implicados en metabolismo primario .....	81
<b>C1.7.4</b> - Genes implicados en desarrollo y diferenciación .....	85
<b>C1.7.5</b> - Otros genes diferencialmente expresados .....	86
<b>C1.7.6</b> - Validación de los resultados .....	87
<b>C1.7.7</b> - Búsqueda de motivos implicados en la regulación de AbrB1/B2 .....	89
<b>C1.8</b> - Análisis de la resistencia a vancomicina .....	89
<b>C1.9</b> - AbrB1/B2, homólogo de VraR/S y LiaR/S.....	90
<b>C1.10</b> - Modelización estructural del Regulador de Respuesta AbrB1 .....	94
<b>C1.11</b> - Publicaciones científicas .....	101
<b>CAPÍTULO 2. El Regulador de Respuesta huérfano Aor1</b> .....	103
<b>C2.1</b> - Optimización de la producción de Aor1 en <i>Escherichia coli</i> .....	106
<b>C2.2</b> - Purificación de anticuerpos policlonales $\alpha$ -Aor1 .....	108
<b>C2.3</b> - Análisis de la expresión de Aor1 en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	109
<b>C2.4</b> - Identificación de las secuencias diana de Aor1 por ChIP-Seq .....	110
<b>C2.5</b> - Marcaje de Aor1 con el epítipo 3xFLAG .....	113
<b>CAPÍTULO 3. La plataforma HKASP</b> .....	115
<b>C3.1</b> - Diseño general de la plataforma HKASP .....	116
<b>C3.2</b> - Diseño y organización del Casete HKASP .....	119
<b>C3.3</b> - Módulo Sensor: Sistema de Dos Componentes quimérico .....	121
<b>C3.4</b> - Módulo Reportero .....	130
<b>C3.5</b> - Plásmido pHKASP y derivados .....	133
<b>C3.6</b> - Cepa hospedadora de la plataforma HKASP .....	135
<b>C3.7</b> - Aplicación de la plataforma HKASP y diseño experimental .....	137
<b>C3.8</b> - Validación de la plataforma HKASP .....	141
<b>CONCLUSIONES</b> .....	143

<b>MM.1</b> - Microorganismos empleados.....	149
<b>MM.1.1</b> - Conservación de microorganismos.....	150
<b>MM.2</b> - Medios de cultivo.....	150
<b>MM.2.1</b> - Antibióticos empleados.....	152
<b>MM.3</b> - Condiciones de cultivo.....	153
<b>MM.3.1</b> - Curvas de crecimiento.....	153
<b>MM.3.2</b> - Ensayos de antibiosis contra bacterias.....	154
<b>MM.3.3</b> - Ensayos de antibiosis contra hongos.....	154
<b>MM.3.4</b> - Ensayos de antibiosis (producción heteróloga).....	155
<b>MM.3.5</b> - Ensayos de resistencia a antibióticos.....	155
<b>MM.4</b> - Manipulación y detección de ácidos nucleicos.....	156
<b>MM.4.1</b> - Extracción de vectores en <i>Escherichia coli</i> .....	156
<b>MM.4.2</b> - Extracción de DNA genómico en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	156
<b>MM.4.3</b> - Extracción de RNA en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	157
<b>MM.4.4</b> - Electroforesis en gel de agarosa.....	158
<b>MM.4.5</b> - Técnicas básicas de ingeniería genética.....	158
<b>MM.4.6</b> - PCR convencional.....	159
<b>MM.4.7</b> - RT-qPCR (PCR cuantitativa de transcripción reversa).....	160
<b>MM.4.8</b> - Análisis transcriptómico por RNAseq.....	161
<b>MM.4.9</b> - Identificación de secuencias diana por ChIP-Seq.....	161
<b>MM.5</b> - Vectores empleados.....	163
<b>MM.6</b> - Diseño y construcción de vectores.....	166
<b>MM.7</b> - Introducción de vectores en microorganismos.....	177
<b>MM.7.1</b> - Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	177
<b>MM.7.2</b> - Transformación de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	178
<b>MM.7.3</b> - Conjugación interespecífica <i>Escherichia-Streptomyces</i> .....	179
<b>MM.8</b> - Edición genómica mediante CRISPR-Cas9.....	179
<b>MM.9</b> - Manipulación y detección de proteínas.....	180
<b>MM.9.1</b> - Cuantificación de proteínas.....	180
<b>MM.9.2</b> - Expresión y purificación de proteínas en <i>Escherichia coli</i> .....	180

MM.9.3 - Expresión y purificación de proteínas en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	182
MM.9.4 - Purificación de anticuerpos .....	182
MM.9.5 - SDS-PAGE .....	183
MM.9.6 - Visualización de proteínas por tinción Coomassie .....	184
MM.9.7 - <i>Western Blot</i> .....	184
MM.10 - Análisis de la producción de antibióticos .....	185
MM.10.1 - Antibióticos endógenos: undecilprodigiosina y actinorrodina .....	185
MM.10.2 - Producción heteróloga: oviedomicina .....	185
MM.10.3 - Producción heteróloga: mitramicina .....	186
MM.11 - Bioinformática .....	186
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>219</b>
Anexo I - Sistemas de Dos Componentes de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	221
Anexo II - Oligonucleótidos empleados .....	225

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

<b>Figura IN.1.</b> Mecanismos de acción de los antibióticos .....	3
<b>Figura IN.2.</b> Colonias de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	11
<b>Figura IN.3.</b> Ciclo vital de <i>Streptomyces coelicolor</i> en medio sólido .....	12
<b>Figura IN.4.</b> Regulación del desarrollo y la diferenciación en <i>Streptomyces</i> .....	13
<b>Figura IN.5.</b> Ciclo vital de <i>Streptomyces coelicolor</i> en medio líquido.....	16
<b>Figura IN.6.</b> Cromosoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	17
<b>Figura IN.7.</b> Estructura de la actinorrodina y clúster <i>act</i> .....	19
<b>Figura IN.8.</b> Estructura de la undecilprodigiosina y clúster <i>red</i> .....	20
<b>Figura IN.9.</b> Estructura del antibiótico dependiente de calcio y clúster <i>cda</i> .....	21
<b>Figura IN.10.</b> Estructura de la metilenomicina y clúster <i>mmf-mmy</i> .....	22
<b>Figura IN.11.</b> Arquitectura de las Histidina Quinasas .....	26
<b>Figura IN.12.</b> Clasificación de las Histidina Quinasas .....	27
<b>Figura IN.13.</b> Posibles arquitecturas de las Histidina Quinasas híbridas.....	28
<b>Figura IN.14.</b> Histidina Quinasas quiméricas descritas en la literatura.....	29
<b>Figura IN.15.</b> Arquitectura y clasificación de los Reguladores de Respuesta.....	31
<b>Figura IN.16.</b> Mecanismo molecular de acción de los Sistemas de Dos Componentes .....	34
<b>Figura IN.17.</b> Regulación de la producción de antibióticos en <i>Streptomyces coelicolor</i> por Sistemas de Dos Componentes .....	38

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

<b>Figura C1.1.</b> Análisis <i>in silico</i> de AbrB1/B2: características generales.....	55
<b>Figura C1.2.</b> Análisis <i>in silico</i> de AbrB1/B2: dominios, estructura secundaria y topología.....	56
<b>Figura C1.3.</b> Conservación del sistema AbrB1/B2 .....	57
<b>Figura C1.4.</b> Deleción de los genes <i>abrB1/B2</i> mediante CRISPR-Cas9 .....	59
<b>Figura C1.5.</b> Análisis fenotípico del mutante $\Delta$ <i>abrB1/B2</i> : comportamiento en diferentes medios de cultivo.....	61
<b>Figura C1.6.</b> Análisis fenotípico de AbrB1/B2: ensayos de antibiosis (bacterias Gram-Positivas), complementación y sobreexpresión .....	62

<b>Figura C1.7.</b> Análisis fenotípico de AbrB1/B2: curva de crecimiento, producción de antibióticos y análisis microscópico (medio líquido) .....	63
<b>Figura C1.8.</b> Análisis fenotípico de AbrB1/B2: ensayos de antibiosis (bacterias Gram-Negativas y hongos) .....	64
<b>Figura C1.9.</b> Análisis fenotípico conjunto de AbrB1/B2 y AbrA1/A2 .....	65
<b>Figura C1.10.</b> Producción heteróloga de oviedomicina .....	67
<b>Figura C1.11.</b> Producción heteróloga de mitramicina .....	68
<b>Figura C1.12.</b> Análisis transcripcional de AbrB1/B2 .....	69
<b>Figura C1.13.</b> Control fenotípico de las muestras analizadas por RNAseq y evaluación de la calidad del RNA .....	71
<b>Figura C1.14.</b> Análisis transcriptómico por RNAseq .....	72
<b>Figura C1.15.</b> Análisis de los genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ .....	73
<b>Figura C1.16.</b> Clúster <i>red</i> y ruta de biosíntesis de la undecilprodigiosina .....	78
<b>Figura C1.17.</b> Modelo de regulación de la producción de antibióticos por AbrB1/B2 .....	80
<b>Figura C1.18.</b> Validación de los resultados obtenidos por RNAseq .....	88
<b>Figura C1.19.</b> Análisis de la resistencia a vancomicina .....	90
<b>Figura C1.20.</b> AbrB1/B2, homólogo de VraR/S y LiaR/S .....	92
<b>Figura C1.21.</b> Evaluación de la calidad del modelo estructural de AbrB1 (estado inactivo) .....	95
<b>Figura C1.22.</b> Evaluación de la calidad del modelo estructural de AbrB1 (estado activo) .....	96
<b>Figura C1.23.</b> Comparación de secuencias de AbrB1, VraR y LiaR .....	97
<b>Figura C1.24.</b> Características estructurales del regulador AbrB1 .....	98
<b>Figura C1.25.</b> Características estructurales del regulador AbrB1 (homodímero) .....	99

## CAPÍTULO 2: El Regulador de Respuesta huérfano Aor1

<b>Figura C2.1.</b> Antecedentes del regulador huérfano Aor1 .....	104
<b>Figura C2.2.</b> Optimización de la producción de Aor1 en <i>Escherichia coli</i> .....	106
<b>Figura C2.3.</b> Purificación de anticuerpos $\alpha$ -Aor1 .....	109
<b>Figura C2.4.</b> Análisis de la expresión de Aor1 en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	110
<b>Figura C2.5.</b> Comprobaciones realizadas en el ChIP-Seq de Aor1 .....	112
<b>Figura C2.6.</b> Marcaje de Aor1 con el epítipo 3xFLAG .....	113

## CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

<b>Figura C3.1.</b> Plataforma basada en Histidinas Quinasas quiméricas .....	117
<b>Figura C3.2.</b> Planteamiento de la plataforma HKASP .....	118
<b>Figura C3.3.</b> Diseño y organización del Casete HKASP (I) .....	119
<b>Figura C3.4.</b> Diseño y organización del Casete HKASP (II) .....	120
<b>Figura C3.5.</b> Diseño del Módulo Sensor .....	122
<b>Figura C3.6.</b> Sistema de Dos Componentes VanS/R .....	124
<b>Figura C3.7.</b> Histidina Quinasa quimérica en la plataforma HKASP .....	125
<b>Figura C3.8.</b> Frecuencia de tripletes de nucleótidos en secuencias codificantes .....	127
<b>Figura C3.9.</b> Estrategia de búsqueda de sitios de restricción óptimos .....	128
<b>Figura C3.10.</b> Sitio de inserción del Módulo Sensor .....	129
<b>Figura C3.11.</b> Análisis de promotores del clúster <i>van</i> .....	131
<b>Figura C3.12.</b> Modificación del promotor <i>vanHAXp</i> .....	132
<b>Figura C3.13.</b> Sitio de inserción del Módulo Reportero .....	133
<b>Figura C3.14.</b> Esquema del vector pHKASP .....	134
<b>Figura C3.15.</b> Diseño de guías contra el clúster <i>van</i> (CRISPR-Cas9) .....	136
<b>Figura C3.16.</b> Flujo de trabajo del usuario final en la plataforma HKASP (I) .....	137
<b>Figura C3.17.</b> Flujo de trabajo del usuario final en la plataforma HKASP (II) .....	138
<b>Figura C3.18.</b> Circuito biológico sintético de la plataforma HKASP .....	139
<b>Figura C3.19.</b> Diseño experimental de la plataforma HKASP .....	140
<b>Figura C3.20.</b> Aplicación de la plataforma HKASP .....	141

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Figura MM.1.</b> Vector pCRISPR-Cas9-AbrB .....	167
<b>Figura MM.2.</b> Vectores pKCAbrB y pNBAbBrB .....	169
<b>Figura MM.3.</b> Vectores pET-Aor1 y pQE-Aor1 .....	170
<b>Figura MM.4.</b> Vectores pKC-STAor1-CE/NE y pNG-STAor1-CE/NE .....	172
<b>Figura MM.5.</b> Casete HKASP .....	173
<b>Figura MM.6.</b> Vector pHKASP y derivados .....	176



# ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

<b>Tabla IN.1.</b> Patógenos prioritarios para el desarrollo de antibióticos.....	5
<b>Tabla IN.2.</b> Identificación de patógenos con resistencias a lo largo del tiempo .....	7
<b>Tabla IN.3.</b> Ejemplos de moléculas bioactivas de interés médico producidas por bacterias del género <i>Streptomyces</i> .....	7

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

<b>Tabla C1.1.</b> Genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés .....	74
<b>Tabla C1.2.</b> Genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ relacionados con el metabolismo secundario .....	76
<b>Tabla C1.3.</b> Genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ relacionados con el metabolismo primario .....	81
<b>Tabla C1.4.</b> Genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ relacionados con los procesos de desarrollo / diferenciación .....	85
<b>Tabla C1.5.</b> Genes diferencialmente expresados por la delección $\Delta abrB1/B2$ con función y/o papel biológico desconocidos .....	86
<b>Tabla C1.6.</b> Modelos estructurales de los homólogos de AbrB1: VraR ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) y LiaR ( <i>Enterococcus faecium</i> ) .....	94

## CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

<b>Tabla C3.1.</b> Sitio de inserción del Módulo Sensor (I) .....	126
<b>Tabla C3.2.</b> Sitio de inserción del Módulo Sensor (II) .....	130
<b>Tabla C3.3.</b> Sitio de inserción del Módulo Reportero .....	132

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla MM.1.</b> Microorganismos empleados .....	149
<b>Tabla MM.2.</b> Antibióticos empleados .....	152
<b>Tabla MM.3.</b> Enzimas de restricción empleadas .....	158
<b>Tabla MM.4.</b> Programa empleado en el termociclador para el kit <i>Biotoools DNA Polymerase</i> .....	159

<b>Tabla MM.5.</b> Programa empleado en el termociclador para el kit <i>Phusion Hot Start II DNA Polymerase</i> .....	160
<b>Tabla MM.6.</b> Programa empleado en el termociclador para las RT-qPCRs .....	160
<b>Tabla MM.7.</b> Vectores empleados .....	164

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>aa:</b> Aminoácidos	<b>HPLC:</b> Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>ACT:</b> Actinorrodina	<b>MMY:</b> Metilenomicina
<b>AU:</b> Unidades de Absorbancia	<b>Nt:</b> Extremo amino (proteínas)
<b>BGC:</b> Clúster génico biosintético	<b>nt:</b> Nucleótidos
<b>bp:</b> Pares de bases nitrogenadas	<b>padj:</b> Valor p ajustado por el método Benjamini-Hochberg
<b>CA:</b> Dominio catalítico de unión a ATP (Histidina Quinasa)	<b>PCD:</b> Muerte celular programada
<b>CDA:</b> Antibiótico dependiente de calcio	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ChIP:</b> Inmunoprecipitación de cromatina	<b>RBS:</b> Sitio de unión del ribosoma
<b>CSR:</b> Regulador situado en un BGC	<b>RED:</b> Undecilprodigiosina
<b>Ct:</b> Extremo carboxilo (proteínas)	<b>RNA:</b> Ácido ribonucleico
<b>DHp:</b> Dominio de dimerización y fosfotransferencia (Histidina Quinasa)	<b>rpm:</b> Revoluciones por minuto
<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>RR:</b> Regulador de respuesta <b>oRR:</b> Regulador de Respuesta huérfano
<b>DO:</b> Densidad óptica	<b>sgRNA:</b> RNA guía única
<b>FC:</b> <i>Fold Change</i>	<b>TCS:</b> Sistema de dos componentes
<b>GlcNAc:</b> N-Acetil Glucosamina	<b>TM:</b> Región proteica transmembrana
<b>HK:</b> Histidina quinasa	<b>UPLC:</b> Cromatografía líquida de ultra alta eficacia
<b>hHK:</b> Histidina Quinasa híbrida	<b>%GC:</b> Contenido en Guanina / Citosina (Porcentaje)
<b>oHK:</b> Histidina Quinasa huérfana	
<b>qHK:</b> Histidina Quinasa quimérica	





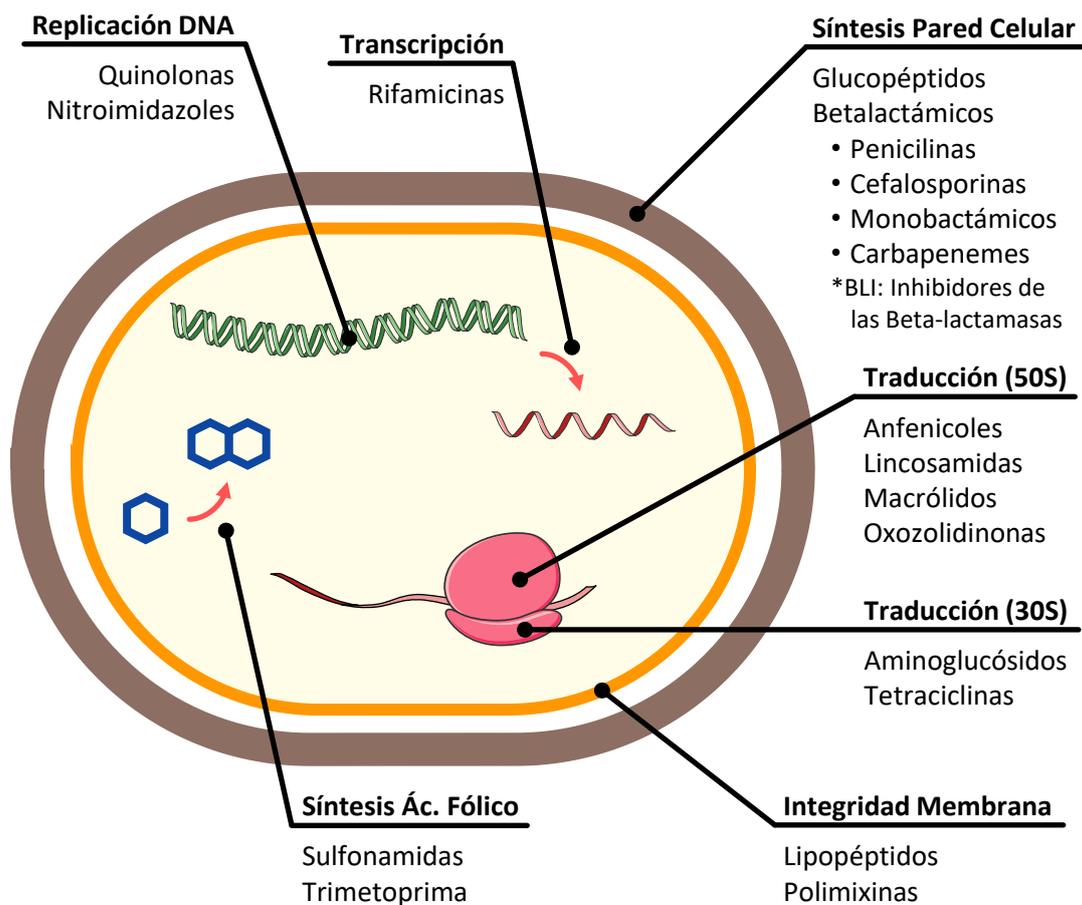
# INTRODUCCIÓN



## IN.1 - Antibióticos, la gran revolución de la medicina moderna

El descubrimiento y aplicación de los antibióticos por el ser humano ha sido, sin lugar a dudas, una de las mayores revoluciones médicas de la historia. Estos compuestos son capaces de matar bacterias o inhibir su crecimiento, y pueden ser producidos de forma natural por algunos organismos, o bien, mediante síntesis química. Su mecanismo de acción consiste en bloquear o alterar procesos esenciales, como la síntesis de la pared celular, la traducción de proteínas o la replicación del DNA (*Figura IN.1*) (Kapoor et al., 2017).

La introducción de los antibióticos en clínica ha cambiado drásticamente la medicina moderna y ha ampliado notablemente la esperanza de vida humana. Su importancia va más allá del tratamiento de las enfermedades infecciosas, y es que su aplicación profiláctica es clave en muchos procedimientos, como trasplantes de órganos, cirugías o tratamientos de enfermedades crónicas (Hutchings et al., 2019).



**Figura IN.1. Mecanismos de acción de los antibióticos.** Se indican los principales procesos celulares bloqueados o alterados por acción de los antibióticos, así como las familias de antibióticos que presentan dicho mecanismo de acción.

## INTRODUCCIÓN

La presencia de los antibióticos en la Tierra es mucho más antigua que el ser humano. Estos compuestos han sido utilizados desde tiempos inmemoriales por los microorganismos para luchar contra sus competidores, aunque pueden tener funciones adicionales como moléculas señaladoras en la comunicación intercelular (Abrudan et al., 2015; Romero et al., 2011). Sin embargo, junto con la utilización de los antibióticos como armas, se han desarrollado mecanismos de resistencia, por un lado, como una respuesta evolutiva de las bacterias que deben defenderse de los mismos, y por otro, como parte de los procesos de síntesis y liberación de estos compuestos de los organismos que los producen (Larsson & Flach, 2022). Los mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos por transferencia vertical u horizontal, y actúan de distintas formas: inactivando el antibiótico (por modificación de su estructura o su hidrólisis), impidiendo su acumulación en la célula (reduciendo su entrada o promoviendo su expulsión), alterando la diana sobre la que actúa, o desarrollando procesos alternativos que no requieran de dicha diana (Kapoor et al., 2017; Munita & Arias, 2016).

Aunque el desarrollo de mecanismos de resistencia es un proceso natural que ya tenía lugar antes de la utilización de los antibióticos por el ser humano, la rapidez de aparición y propagación de los mismos durante los últimos años, sobre todo en bacterias patógenas, es alarmante (CDC, 2019). Los antibióticos producidos en el ambiente como parte de la ecología microbiana solo alcanzan concentraciones elevadas a nivel microscópico, en las inmediaciones del organismo productor, por lo que la exposición a los mismos es local y no ha contribuido a este fenómeno (Larsson & Flach, 2022). El verdadero problema deriva del uso masivo de los antibióticos por parte del ser humano a nivel clínico y veterinario, así como de la liberación de altos niveles de estos compuestos al ambiente; esto ha dado lugar a una presión selectiva sin precedentes sobre las bacterias, que ha promovido la movilización de un gran número de genes de resistencia y la selección de eventos evolutivos que han originado nuevos mecanismos de resistencia (Larsson & Flach, 2022; O'Neill, 2016).

### IN.1.1 - Bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, una amenaza global

La emergencia y propagación de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos es una de las grandes amenazas para la salud pública, y por tanto, uno de los desafíos prioritarios a los que debe hacer frente la humanidad, tal y como han señalado la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC y ECDC). La OMS ha establecido las bacterias prioritarias para las que se requiere de forma urgente investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (*Tabla IN.1*) (WHO, 2021a).

**Tabla IN.1. Patógenos prioritarios para el desarrollo de antibióticos.** Se indican las bacterias patógenas resistentes a antibióticos que han sido consideradas prioritarias por la OMS para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (WHO, 2021a).

Prioridad	Bacteria patógena	Resistencias
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenémicos y Cefalosporinas de 3º gen.
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina y Meticilina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i> sp.	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> sp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolonas y Cefalosporinas de 3º gen.
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilinas
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> sp.	Fluoroquinolonas
Mención Especial	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Isoniazida, rifampicina y/o fluoroquinolonas
	<i>Clostridioides difficile</i>	-

Los centros sanitarios son especialmente vulnerables a esta amenaza, ya que los pacientes suelen presentar un sistema inmune debilitado (por otras patologías y/o la medicación), y además, existe un elevado uso de antibióticos. Las infecciones por bacterias que presentan uno o más mecanismos de resistencia ocasionan una mayor morbilidad y mortalidad, y suponen un mayor coste económico para el sistema sanitario, ya que requieren estancias hospitalarias más prolongadas, una mayor atención médica y el uso de tratamientos más caros y potencialmente más tóxicos (CDC, 2019).

Uno de los mayores obstáculos es determinar la magnitud y alcance reales de la amenaza que supone la resistencia a los antibióticos, ya que los sistemas de vigilancia y monitorización epidemiológicos de los distintos países son muy heterogéneos, y en algunos casos, casi inexistentes (WHO, 2021b). Se ha estimado que en el año 2019, aproximadamente 5 millones de muertes estuvieron asociadas a bacterias resistentes a antibióticos, de las cuales, 1,3 millones fueron consecuencia directa de la infección (Murray et al., 2022).

La reciente pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 ha empeorado aún más la situación, ya que ha incrementado sustancialmente los ingresos hospitalarios y el consumo de antibióticos. Aproximadamente el 75% de los pacientes con COVID-19 recibieron tratamiento con antibióticos, aunque la tasa de coinfección bacteriana era del 8% (Langford et al., 2021). Las consecuencias ya se han puesto de manifiesto en los últimos estudios realizados, donde se han observado tasas de resistencia a antibióticos extremadamente preocupantes (WHO, 2021b). Por

## INTRODUCCIÓN

ejemplo, en Europa, el 57% de los aislados de *Acinetobacter* durante el año 2020 presentaban resistencia combinada a tres grupos de antibióticos (fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos), en contraste con el año anterior, que eran el 43% de los aislados (ECDC, 2020, 2022).

Para hacer frente a esta amenaza, la OMS ha elaborado un plan de acción global contra la resistencia a antibióticos, en el que se han establecido cinco objetivos estratégicos para mantener el mayor tiempo posible la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas con medicamentos efectivos y seguros, empleados de forma responsable, y accesibles para quien los necesite (WHO, 2015):

- 1. Mejorar la concienciación y comprensión de la resistencia a los antimicrobianos.**
- 2. Fortalecer la investigación y los programas de vigilancia epidemiológica.**
- 3. Reducir la incidencia de infecciones a través de medidas de saneamiento y prevención.**
- 4. Optimizar el uso de antimicrobianos en salud humana y animal.**
- 5. Garantizar una inversión sostenible en la lucha contra los antimicrobianos.**

### IN.1.2 - Desarrollo de nuevos antibióticos, una carrera a contrarreloj

Existen dos aproximaciones para hacer frente a la resistencia a los antibióticos. Por un lado, se puede intentar frenar la aparición y propagación de las bacterias patógenas resistentes, mediante medidas de prevención de infecciones, saneamiento, optimización del uso de antibióticos y concienciación social. Por otro lado, se deben desarrollar nuevos antibióticos y otros tratamientos alternativos, como la terapia de fagos o agentes inmunomoduladores, para poder combatir las enfermedades infecciosas (O'Neill, 2016).

A mediados del siglo XX tuvo lugar la Edad Dorada de los antibióticos, que comenzó con la comercialización de la penicilina; esta época se caracterizó por el descubrimiento de la mayoría de los tipos de antibióticos que actualmente utiliza el ser humano (Coates et al., 2011; Hutchings et al., 2019). Desde entonces, el desarrollo de nuevos antibióticos se ha estancado, en gran parte por razones económicas, ya que no es rentable para las empresas farmacéuticas (Baltz, 2006; Coates et al., 2011); en los últimos 5 años, solo se han aprobado 12 antibióticos, la mayoría de los cuales presentan un limitado beneficio clínico sobre los tratamientos existentes (WHO, 2021a). Otro problema añadido es la rápida aparición de bacterias patógenas resistentes a un antibiótico a los pocos años del inicio de su comercialización (*Tabla IN.2*) (CDC, 2019).

**Tabla IN.2. Identificación de patógenos con resistencias a lo largo del tiempo.** Se indica la fecha de comercialización de distintos antibióticos junto con la fecha en la que se identificó el primer patógeno resistente a dicho antibiótico (CDC, 2019).

Antibiótico Comercializado	Año	Patógeno resistente identificado	Año
Penicilina	1941	<i>Staphylococcus aureus</i>	1942
Vancomicina	1958	<i>Enterococcus faecium</i>	1988
Meticilina	1960	<i>Staphylococcus aureus</i>	1960
Cefalosporinas de amplio espectro	1980	<i>Escherichia coli</i>	1983
Azitromicina	1980	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2011
Imipenem	1985	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1996
Ciprofloxacina	1987	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2007
Daptomicina	2003	<i>Staphylococcus aureus</i> *También resistente a meticilina.	2004
Ceftazidima/avibactam	2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2015

Actualmente, hay 45 antibióticos en ensayos clínicos, así como 32 tratamientos alternativos, lo cual, es insuficiente para abordar adecuadamente la amenaza que representa la resistencia a los antimicrobianos. Además, existen claros problemas de innovación, así como limitaciones importantes de cara al tratamiento de patógenos clave como bacterias multirresistentes (WHO, 2021a).

El descubrimiento y desarrollo de antibióticos innovadores, efectivos y seguros, es prioritario para hacer frente a la resistencia a los antibióticos, la pandemia silenciosa que pone en peligro la medicina moderna tal y como la conocemos.

## IN.2 - El género *Streptomyces*

### IN.2.1 - *Streptomyces*, una fuente inagotable de antibióticos

Los antibióticos son sintetizados por una gran diversidad de organismos, pero sin duda, el género estrella es *Streptomyces*. Más de la mitad de los antibióticos de origen natural empleados en clínica son producidos por bacterias pertenecientes a este género, además de otros tipos de compuestos de interés como antitumorales o inmunosupresores (Tabla IN.3) (Ait Barka et al., 2016).

**Tabla IN.3. Ejemplos de moléculas bioactivas de interés médico producidas por *Streptomyces*.**

Tipo	Compuesto	Origen ( <i>Streptomyces</i> )	Referencia
Antibiótico	Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	(Malik, 1983)
	Actinomicina	<i>S. anulatus</i>	(Waksman & Woodruff, 1940)
	Anfomicina	<i>S. canus</i>	(Heinemann et al., 1953)
	Cicloserina	<i>S. orchidaceus</i>	(Mulinis, 1955)
	Daptomicina	<i>S. roseosporus</i>	(Mchenney et al., 1998)

## INTRODUCCIÓN

Tipo	Compuesto	Origen ( <i>Streptomyces</i> )	Referencia
Antibiótico	Higromicina	<i>S. hygroscopicus</i>	(Pittenger et al., 1953)
	Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	(Umezawa et al., 1957)
	Leucomicina	<i>S. kitasatoensis</i>	(Hata et al., 1953)
	Lincomicina	<i>S. lincolnensis</i>	(Mason & Lewis, 1964)
	Neomicina	<i>S. fradiae</i>	(Dulmage, 1953)
	Novobiocina	<i>S. niveus</i>	(Kominek, 1972)
	Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	(Rhodes, 1984)
	Rifamicina	<i>S. mediterranei</i>	(Margalith & Beretta, 1960)
	Estreptomina	<i>S. griseus</i>	(Schatz & Waksman, 1944)
	Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	(Darken et al., 1960)
Antifúngico	Cicloheximida	<i>S. griseus</i>	(Kominek, 1975)
	Higromicina	<i>S. hygroscopicus</i>	(González et al., 1978)
	Anfotericina	<i>S. nodosus</i>	(Linke et al., 1974)
	Candidina	<i>S. griseus</i>	(Acker & Lechevalier, 1954)
	Natamicina	<i>S. natalensis</i>	(Stark, 2003)
	Polioxina B	<i>S. cacaoi</i>	(Isono et al., 1965)
	Validamicina	<i>S. hygroscopicus</i>	(Iwasa et al., 1970)
Antiparasitario	Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	(Burg et al., 1979)
Inmunosupresor	Rapamicina	<i>S. hygroscopicus</i>	(Chen et al., 1999)
Inmunoestimulante	Bestatina	<i>S. olivoreticuli</i>	(Blomgren et al., 1980)
Antitumoral	Doxorrubicina	<i>S. peucetius</i>	(Arcamone et al., 1969)
	Daunorrubicina	<i>S. peucetius</i>	(Arcamone et al., 1968)

La producción de antibióticos está determinada por grandes clústeres génicos biosintéticos (BGC), que incluyen las enzimas requeridas para su síntesis, así como transportadores, reguladores y cualquier otro elemento necesario (por ejemplo, mecanismos de resistencia contra dicho antibiótico). La expresión de los BGC está controlada principalmente por reguladores específicos incluidos en el propio clúster, denominados CSR, que actúan como nodos capaces de integrar múltiples cascadas de regulación globales que monitorizan el estado fisiológico del organismo y las condiciones ambientales (Liu et al., 2013; van Wezel & McDowall, 2011).

Las diferentes especies de *Streptomyces* suelen ser capaces de producir una o más moléculas con actividad antibiótica en condiciones de laboratorio. Sin embargo, tras los avances en secuenciación, se ha observado que los genomas de estos organismos contienen multitud de BGC crípticos que permanecen silentes, por lo que su verdadero potencial como productores de compuestos de interés biotecnológico es mucho mayor que el estimado inicialmente (Nett et al., 2009; Rutledge & Challis, 2015).

Aunque una de las estrategias para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos consiste en la búsqueda de nuevos organismos productores (Santos-Aberturas & Vior, 2022), las especies ya descritas aún siguen teniendo mucho que ofrecer. Se han propuesto diversas

estrategias para la activación de BGC silentes en el propio organismo en el que están presentes, como la modificación de las condiciones de cultivo, la adición de compuestos que activen respuestas de estrés o el cocultivo con otros organismos (Antoraz et al., 2015). Sin embargo, la aproximación que mejores resultados están ofreciendo es la “minería genómica”, seguida de la manipulación de los BGC y su expresión heteróloga en cepas hospedadoras optimizadas (Kang & Kim, 2021; Myronovskyi & Luzhetskyy, 2019; van Bergeijk et al., 2020; Xia et al., 2020; Zerikly & Challis, 2009), ya que permite mejorar la producción de BGC conocidos con baja expresión en la cepa de origen (Jiang et al., 2018; Kepplinger et al., 2018), así como caracterizar BGC crípticos, derivados incluso de metagenomas (Bonet et al., 2015; Hover et al., 2018; Inahashi et al., 2018; Iqbal et al., 2016; Liu, Wang, et al., 2019; Qian et al., 2020; Yang et al., 2015).

### IN.2.2 - Características generales de los estreptomicetos

A nivel taxonómico, el género *Streptomyces* se encuadra en el reino *Bacteria*, filo *Actinobacteria*, orden *Streptomyetales*, familia *Streptomycetaceae* (Ludwig et al., 2015; Nouioui et al., 2018). Como principales características podemos destacar que son bacterias multicelulares filamentosas, Gram-Positivas, aerobias facultativas, mesófilas, neutrófilas y quimiorganótrofas, con un metabolismo oxidativo (Kämpfer, 2015). Estas bacterias desarrollan un micelio vegetativo, generalmente sin fragmentar, y un micelio aéreo, que forma cadenas de esporas reproductivas sin motilidad (Kämpfer, 2015); las estructuras que pueden formar estas esporas en las distintas especies son variadas: cadenas, espirales y verticilos (Pridham et al., 1958). A nivel morfológico, las colonias que forman estas bacterias generalmente presentan una superficie suave en las etapas iniciales de crecimiento, aunque luego adquieren una apariencia escamosa, granular o aterciopelada, debido al desarrollo del micelio aéreo y al proceso de esporulación; además los estreptomicetos pueden producir diversos pigmentos, por lo que sus colonias presentan una gran variedad de colores (Kämpfer, 2015).

Las bacterias del género *Streptomyces* despiertan un gran interés, y han sido extensamente estudiadas por varias razones: presentan una distribución filogenética muy amplia, juegan un papel esencial en el ecosistema del suelo como organismos saprófitos, ya que son capaces de producir una enorme batería de enzimas hidrolíticas extracelulares para el reciclaje de nutrientes (con aplicación a nivel industrial) y, como ya se ha mencionado anteriormente, son capaces de producir una miríada de compuestos de interés biomédico, como antibióticos o antitumorales entre otros (Ait Barka et al., 2016).

## INTRODUCCIÓN

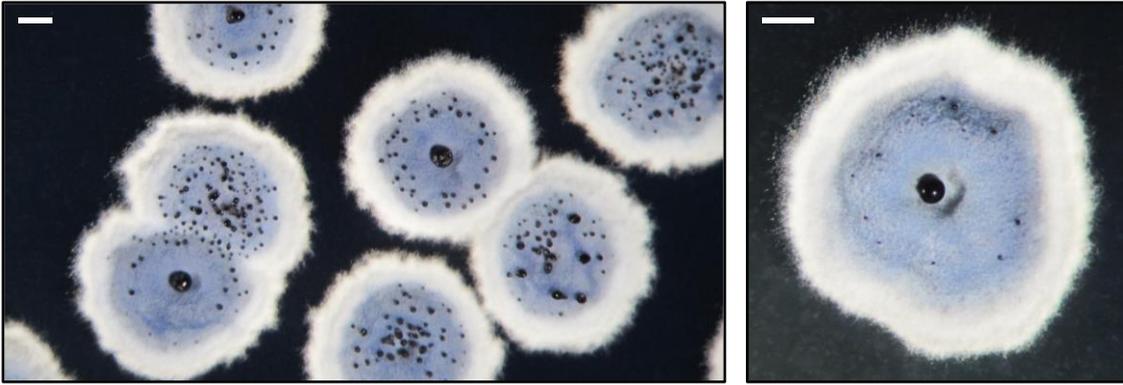
El principal hábitat de los estreptomicetos es el suelo (Kämpfer, 2015), un medio extremadamente complejo y dinámico sujeto a una gran diversidad de factores bióticos y abióticos, lo que explica la plasticidad genómica, la diversidad metabólica y la compleja red de regulación que han desarrollado estos microorganismos. Sin embargo, también se han podido encontrar en otros nichos ecológicos como ambientes marinos (Dalisay et al., 2013; Sabido et al., 2020; Tenebro et al., 2021), o incluso formando parte de la microbiota de otros organismos (Chevrette et al., 2019; Santamaría et al., 2020).

Se han descrito interacciones tanto beneficiosas como perjudiciales con otros organismos. Por ejemplo, ciertos insectos utilizan estreptomicetos productores de antibióticos para proteger sus recursos (Currie et al., 1999, 2003), mientras que algunos escarabajos xilófagos establecen una relación de comensalismo con algunas de estas bacterias capaces de degradar sustratos celulósicos (Hulcr et al., 2011; Vasanthakumar et al., 2008). En el caso de las plantas, se han descrito tanto estreptomicetos que promueven su crecimiento y actúan como agentes de control biológico (Romano-Armada et al., 2020; Tran et al., 2021), como otros que actúan como fitopatógenos (Wanner, 2006). Es importante destacar que, a pesar de que la mayoría de estas bacterias no son perjudiciales para el ser humano, especies como *Streptomyces somaliensis* y *Streptomyces sudanensis* pueden causar micetomas (Kirby et al., 2012; Quintana et al., 2008).

Dentro de este grupo de microorganismos, una de las principales especies modelo es *Streptomyces coelicolor* (Figura IN.2), ya que fue una de las primeras que se caracterizó a nivel morfológico y genético (Bentley et al., 2002; Hopwood, 1999). Además, produce dos antibióticos coloreados, la undecilprodigiosina (RED) y la actinorrodina (ACT), que han sido utilizados como herramientas en los estudios genéticos sobre biosíntesis y regulación de la producción de antibióticos (Hopwood, 1999). Precisamente es el color azul de la ACT el que da lugar a la pigmentación celeste tan característica que presentan sus colonias, y que da nombre a esta bacteria (*coelicolor*: del latín *caelum*, cielo; y *color*, color).

### IN.2.3 - Ciclo vital de *Streptomyces coelicolor*

*S. coelicolor*, al igual que el resto de estreptomicetos, es una bacteria filamentosa que crece formando hifas, y produce exosporas. Esta especie ha sido utilizada como modelo para el estudio del crecimiento, desarrollo y diferenciación de este grupo de microorganismos (Chater, 2016).



**Figura IN.2. Colonias de *Streptomyces coelicolor*.** La barra blanca en la esquina superior izquierda de cada fotografía representa 0,5 mm.

### Ciclo vital en medio sólido

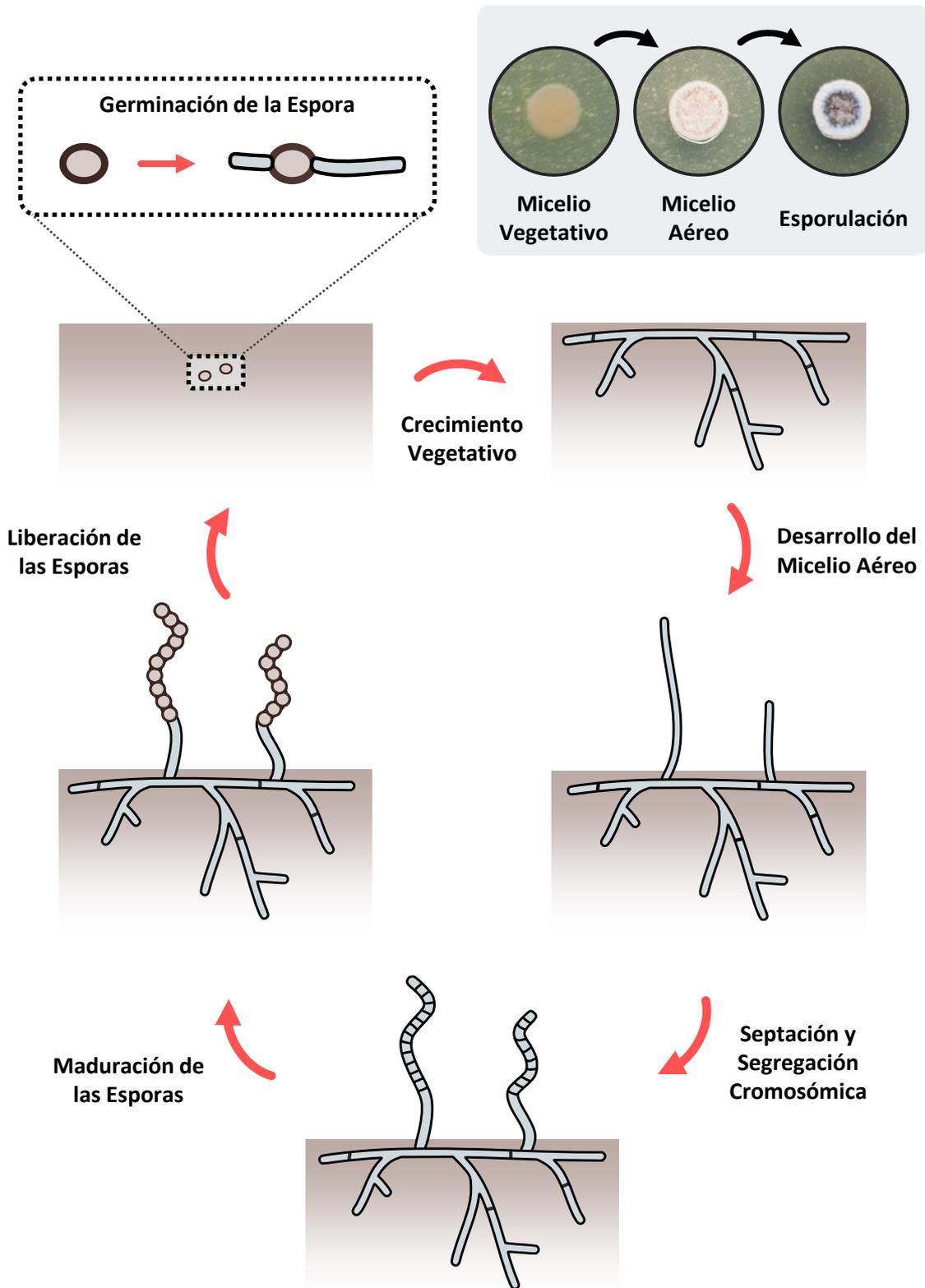
En medio sólido, el ciclo vital de *S. coelicolor* presenta varias etapas: germinación, desarrollo del micelio vegetativo, desarrollo del micelio aéreo y esporulación (*Figura IN.3*). Un aspecto destacable es que su crecimiento, al contrario que en la mayoría de bacterias, es independiente del proceso de división; aunque ésta sí que resulta esencial para la esporulación (McCormick, 2009).

La fase inicial del ciclo es el estado latente de espora. Ante determinados estímulos, como la presencia de nutrientes que sustenten su crecimiento, se inicia el proceso de germinación, que consiste en la remodelación de la pared celular, la reconstitución del contenido celular y la activación del metabolismo (Bobek et al., 2017). Este proceso finaliza con la emergencia de uno o dos tubos germinales a ambos extremos de la espora.

La siguiente fase del ciclo es el desarrollo del micelio vegetativo (*Figura IN.3*), que muestra un crecimiento apical y procesos de ramificación monopodial (Flärdh et al., 2012). Durante este proceso, tiene lugar la formación de septos vegetativos a lo largo de las hifas, con una frecuencia variable y localización irregular; estos septos no suponen una separación física total, y permiten la conexión directa de compartimentos adyacentes. Estos compartimentos contienen múltiples copias no condensadas del genoma (Jakimowicz & van Wezel, 2012).

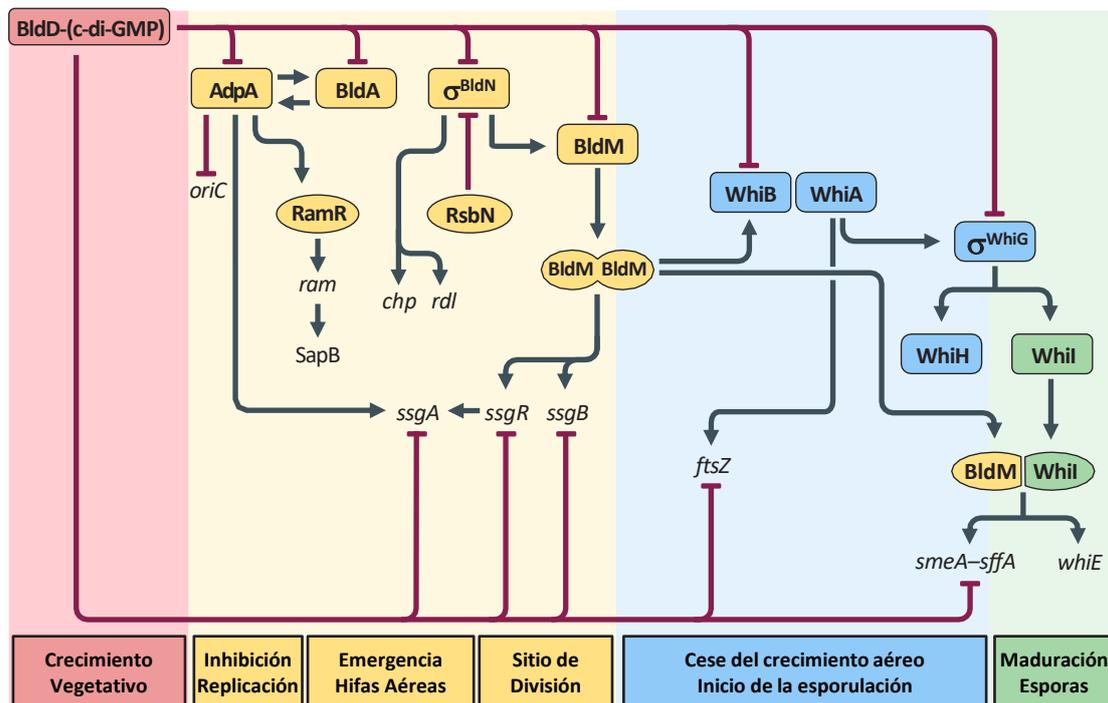
Durante esta fase se han descrito dos rondas de muerte celular programada (PCD). Tras la germinación, se desarrolla un micelio temprano compartimentalizado por septos membranosos. Algunos segmentos de este micelio sufren la primera PCD, dando lugar al micelio vegetativo propiamente dicho. Parte de este micelio sufre la segunda PCD cuando comienza la siguiente fase del ciclo (Manteca et al., 2007; Yagüe et al., 2014).

## INTRODUCCIÓN



**Figura IN.3. Ciclo vital de *Streptomyces coelicolor* en medio sólido.** Se muestra un esquema con las distintas etapas del ciclo vital en medio sólido: germinación de la espora, crecimiento vegetativo, desarrollo del micelio aéreo y esporulación, que incluye septación del micelio aéreo, segregación cromosómica y maduración de las esporas. Además, en la parte superior derecha se muestran fotografías de una colonia de *S.coelicolor* en los diferentes estadios del desarrollo.

El desarrollo del micelio aéreo (*Figura IN.3*) tiene lugar cuando las condiciones se vuelven adversas, aprovechando los nutrientes liberados por la PCD que sufre parte del micelio vegetativo (Manteca et al., 2007). Las hifas aéreas emergen del medio gracias a la presión de turgencia generada en el proceso de crecimiento, y a la producción de proteínas hidrofóbicas (chaplinas, rodlinas y el péptido SapB), que eliminan la tensión superficial de la interfase suelo-aire y evitan la desecación (Flärdh & Buttner, 2009). Este micelio presenta un crecimiento apical sin eventos de ramificación ni septación, dando lugar a un compartimento muy alargado denominado célula esporogénica, donde tiene lugar una elevada replicación del material genético (Flärdh & Buttner, 2009). Los genes requeridos para la formación de las hifas aéreas son denominados *bld*, debido al fenotipo “calvo” (*bald*) de sus mutantes, que carecen de micelio aéreo (*Figura IN.4*) (Bush et al., 2015; Merrick, 1976). Es en esta etapa del ciclo celular cuando se induce la producción de antibióticos. Se ha propuesto que el papel fisiológico de este proceso es proteger los nutrientes liberados durante la autólisis de partes del micelio vegetativo requerida para el desarrollo del micelio aéreo, y que pueden atraer a microorganismos competidores móviles presentes en el medio (Ait Barka et al., 2016; Rigali et al., 2008).



**Figura IN.4. Regulación del desarrollo y la diferenciación en *Streptomyces*.** BldD-(c-di-GMP) actúa como regulador maestro, bloqueando los programas de desarrollo del micelio aéreo y la esporulación durante el crecimiento vegetativo. Los genes esenciales para el desarrollo del micelio aéreo son denominados *bld* y controlan procesos como la producción de proteínas hidrofóbicas (*chp*, *rdl* y *SapB*) requeridas para la emergencia de las hifas aéreas o el establecimiento de los sitios de división (*ssg*). Los genes esenciales para el proceso de esporulación son denominados *whi* y controlan procesos como la formación de los septos de esporulación (*ftsZ*) y la segregación cromosómica (*smeA-sffA*). **Figura adaptada de (Bush et al., 2015).**

## INTRODUCCIÓN

La fase final del ciclo es la esporulación (*Figura IN.3*), un proceso complejo que requiere la coordinación de los programas de desarrollo y diferenciación, de la condensación y segregación cromosómicas, y del proceso de septación (Flärdh & Buttner, 2009). Durante esta etapa, en cada célula esporogénica se forman, de manera sincrónica y con una distribución uniforme a lo largo del compartimento, los septos de esporulación, que a diferencia de los septos vegetativos, sí suponen una separación física completa, y son clave en la formación y liberación de las esporas (Jakimowicz & van Wezel, 2012). Paralelamente a la septación, tiene lugar la condensación y segregación cromosómicas, de tal forma que en cada espora que se forma queda una única copia condensada del cromosoma (Jakimowicz & van Wezel, 2012). Finalmente, estas esporas maduran, y son liberadas al medio. Los genes requeridos para el proceso de esporulación son denominados *whi*, debido al fenotipo de color blanco (*white*) de sus mutantes, que son incapaces de producir esporas, de pigmentación grisácea (*Figura IN.4*) (Bush et al., 2015; Chater, 1972; Hopwood et al., 1970).

### Crecimiento celular

El proceso de crecimiento, tanto del micelio vegetativo como del micelio aéreo, tiene lugar gracias al complejo multiproteico denominado polarisoma, que está asociado a la maquinaria de biosíntesis de la pared celular (Howell & Brown, 2016). De las diferentes proteínas implicadas, es DivIVA la que juega el papel central, ya que es el determinante de la polaridad celular y actúa como factor de reclutamiento polar. El crecimiento apical que muestran las hifas de este organismo se debe, por tanto, a que la síntesis de la pared celular se produce exclusivamente en los ápices; durante el proceso de polimerización, el peptidoglicano se incorpora de forma flexible en el ápice, y va adquiriendo una estructura más rígida conforme se aleja del mismo, lo que genera una presión de turgencia que actúa como fuerza principal que dirige el crecimiento apical en términos físicos (Howell & Brown, 2016).

DivIVA también actúa como elemento central en el proceso de ramificación, ya que es capaz de definir nuevos ejes de polaridad en la pared lateral de la hifa, que constituirán los puntos de ramificación. Este proceso se debe a que, durante la extensión apical del micelio vegetativo, el polarisoma sufre escisiones de forma periódica; los fragmentos generados quedan asociados a la pared lateral de la hifa, y reclutan a más componentes del polarisoma hasta alcanzar un tamaño adecuado para iniciar el crecimiento apical de esta ramificación (Flärdh et al., 2012).

El proceso de crecimiento es controlado a través de la fosforilación de DivIVA por la proteína quinasa AfsK (Flärdh et al., 2012).

## División celular

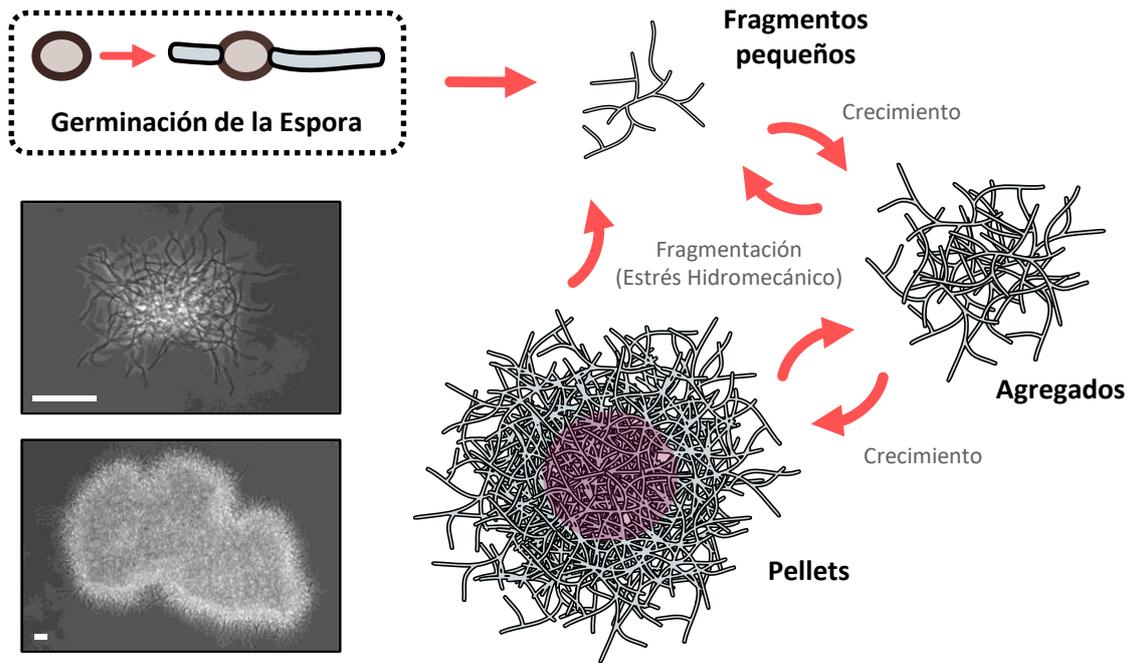
Existen dos eventos distintos de división celular a lo largo del ciclo vital de *S. coelicolor*: la septación vegetativa y la septación asociada a la esporulación. En ambos casos, la maquinaria básica, denominada divisoma, es la misma, aunque los mecanismos de control son notablemente diferentes. De las diferentes proteínas implicadas, es FtsZ la que juega el papel central; esta proteína, homóloga de la tubulina, polimeriza en protofilamentos que forman una estructura anular dinámica denominada anillo-Z, que define la zona de división y recluta al resto de elementos del divisoma, así como a la maquinaria de síntesis de la pared celular (Jakimowicz & van Wezel, 2012; McCormick, 2009).

## Ciclo vital en medio líquido

El ciclo vital de *S. coelicolor* en medio líquido presenta una serie de diferencias con respecto al medio sólido, tanto a nivel metabólico como morfogénico, siendo la más destacable la incapacidad de esporular en estas condiciones (van Dissel et al., 2014). En medio líquido existe un proceso de desarrollo y diferenciación comparable al que se produce en medio sólido, ya que se expresan genes implicados en el desarrollo del micelio aéreo (*bldN*, *bldM*, *chpC*, *chpD*, *ramS*, etc.) y la esporulación (*whiG*, *whiH*, etc.), aunque no los responsables de las etapas finales del proceso de maduración de las esporas (*whiE*, *rdIA*, etc.) (Yagüe et al., 2014). El proceso de desarrollo también depende de un evento de PCD en las zonas interiores del micelio, que suele tener lugar en la transición entre el crecimiento exponencial y la fase estacionaria (Rioseras et al., 2014; van Dissel et al., 2014).

En medio líquido, el micelio puede formar pequeños fragmentos, agregados y/o pellets (*Figura IN.5*) (van Dissel et al., 2014). El crecimiento del micelio da lugar a estructuras cada vez mayores, que pueden fragmentarse de forma estocástica como consecuencia del estrés hidromecánico al que están sometidas. Además, se pueden dar procesos de agregación, favorecidos por polímeros extracelulares que forman matrices, como por ejemplo, DNA extracelular (eDNA) o proteínas hidrofóbicas como las chaplinas (van Dissel et al., 2014).

## INTRODUCCIÓN



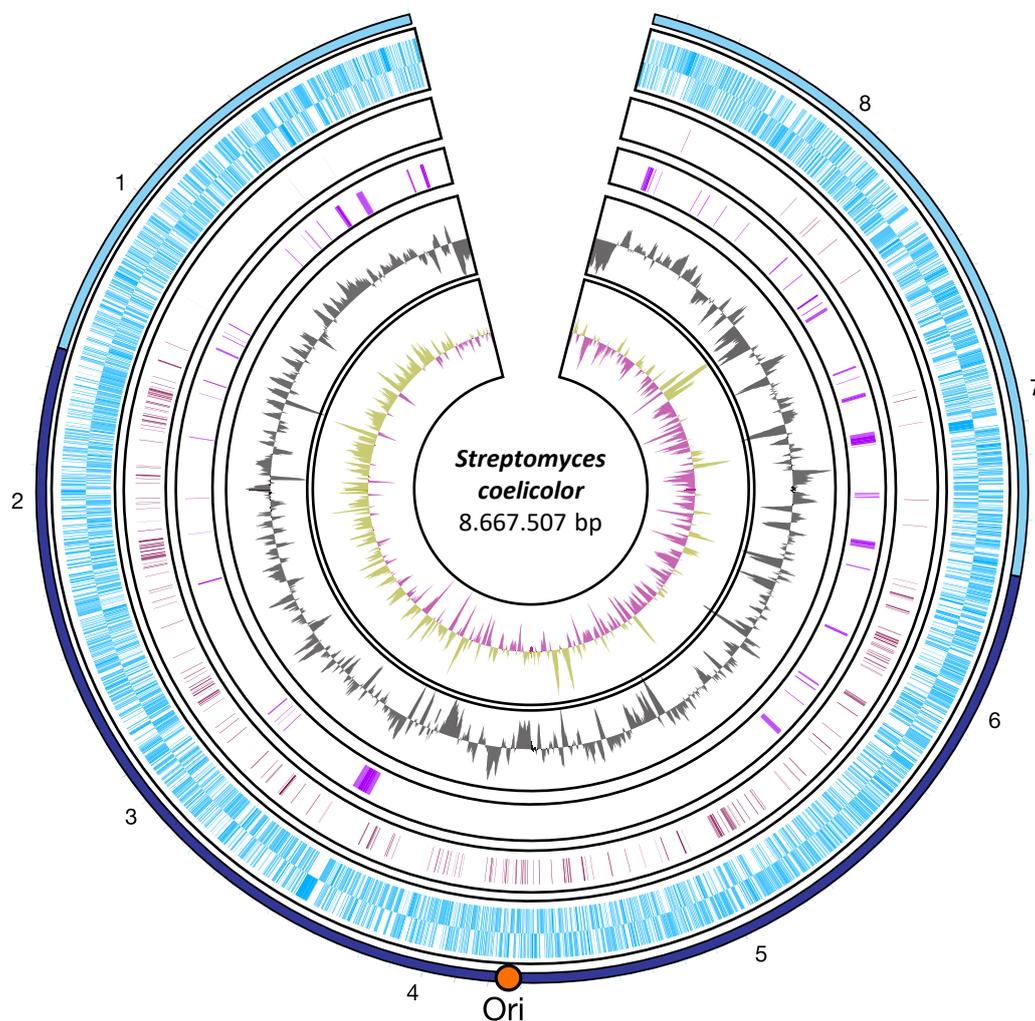
**Figura IN.5. Ciclo vital de *Streptomyces coelicolor* en medio líquido.** Se muestra un esquema con las distintas morfologías del micelio: fragmentos pequeños, agregados y pellets. Así mismo se muestran fotografías al microscopio de un agregado y un pellet. La barra blanca en la esquina inferior izquierda de las microfotografías se corresponde con 100 nm.

### IN.2.4 - Organización genómica de *Streptomyces coelicolor*

A nivel genómico, las bacterias del género *Streptomyces* presentan un cromosoma lineal de un tamaño en torno a 6 - 12 Mbp, con aproximadamente un 70% de contenido en GC. Los cromosomas se estructuran en un núcleo central, relativamente conservado entre las distintas especies, donde se concentran los genes esenciales; así como unos brazos en los extremos, que suelen contener genes adaptativos, y que presentan una mayor inestabilidad genética, siendo recurrentes las reorganizaciones, deleciones, inserciones o duplicaciones (Kirby et al., 2012; van Bergeijk et al., 2020).

*S. coelicolor* A3(2) presenta un cromosoma de 8,7 Mbp (72,2% de contenido en GC) y dos plásmidos: SCP1 (365 kbp) y SCP2 (31 kbp). En muchas ocasiones se utiliza la cepa *S. coelicolor* M145, derivada de la anterior, y que carece ambos plásmidos. El cromosoma de esta cepa (Figura IN.6) contiene 7825 genes según la anotación inicial (Bentley et al., 2002), y se divide en un núcleo central de 4,9 Mbp y dos brazos laterales: el izquierdo de 1,5 Mbp, y el derecho de 2,3 Mbp. Destaca el gran número de potenciales reguladores (965 genes, de los cuales, 65 son factores sigma), transportadores (614 genes) y enzimas hidrolíticas extracelulares (86 genes); así mismo, se han identificado 18 BGC (Bentley et al., 2002).

El cromosoma de *S. coelicolor* se replica bidireccionalmente a partir del origen de replicación (*oriC*), gracias a la unión de la proteína iniciadora DnaA, que permite la apertura de la burbuja de replicación (Hopwood, 2006). Este proceso es regulado por AdpA, que compite con DnaA por la unión al *oriC* (Wolański et al., 2014). El cromosoma es lineal, por lo que presenta el problema de la terminación de la replicación (debido a la replicación discontinua, en las hebras retardadas se generan extremos salientes 3' en las regiones terminales), que en este organismo es resuelto gracias a la presencia de proteínas Tpg u otros replicones que actúan como punto de inicio para la síntesis de DNA en los extremos (Hopwood, 2006). Además, las regiones terminales del cromosoma cuentan con unas secuencias cortas invertidas repetidas denominadas TIR, que actúan de forma similar a los telómeros (Bentley et al., 2002).



**Figura IN.6. Cromosoma de *Streptomyces coelicolor*.** El círculo exterior representa de forma esquemática el cromosoma de *S. coelicolor*, donde se muestra el núcleo central (azul oscuro) y los brazos (azul claro). Desde el exterior hacia el interior, los diferentes discos muestran: todos los genes descritos inicialmente en este organismo (se indica cada cadena por separado), genes esenciales, genes adaptativos, contenido en GC y GC bias. **Figura adaptada de (Bentley et al., 2002).**

## INTRODUCCIÓN

### IN.2.5 - Regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*

Dada la importancia del género *Streptomyces* en la producción de antibióticos, *S. coelicolor* ha sido utilizado como organismo modelo para estudiar el proceso de síntesis y la regulación de su producción (Liu et al., 2013; van Wezel & McDowall, 2011).

*S. coelicolor* produce varios antibióticos de forma endógena: la actinorrodina (ACT) (Rudd & Hopwood, 1979), la undecilprodigiosina (RED) (Feitelson et al., 1985), el antibiótico dependiente de calcio (CDA) (Hopwood & Wright, 1983) y la metilenomicina (MMY) (Wright & Hopwood, 1976). Los BGC de estos compuestos se encuentran en el cromosoma, a excepción de la MMY, cuyo clúster se encuentra en el plásmido SCP1. Aunque muchas veces también se incluye la coelomicina (CPK), hay que tener en cuenta que la molécula con actividad antibiótica, CPK A, es muy inestable, y actúa como precursor de CPK P1 y CPK P2, que carecen de actividad antibiótica (Bednarz et al., 2019).

#### **Actinorrodina (ACT)**

ACT es un poliquétido aromático de la clase benzoisocromanequinona; en función del pH puede encontrarse en forma de sal, de color azul, o como  $\gamma$ -ACT, de color rojo (*Figura IN.7*), siendo esta última la que presenta mayor actividad antibiótica (Bystrykh et al., 1996; Nass et al., 2017). Este compuesto actúa contra bacterias Gram-Positivas y su mecanismo de acción consiste en disipar la fuerza protón-motriz de la membrana plasmática, lo que afecta al correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, dando lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan los componentes celulares (Mak & Nodwell, 2017; Nass et al., 2017).

El BGC *act* (*Figura IN.7*) está constituido por 22 genes, *SCO5071-92* (21,3 kbp) (Malpartida & Hopwood, 1986), y está controlado principalmente por el CSR ActII-ORF4. La expresión del mismo está controlada a su vez por multitud de reguladores: AdpA, LexA, AbsA2, DasR, AfsQ1, AbrC3, AtrA, ROK7B7 o GlnR, por mencionar algunos; que le permiten integrar señales de procesos muy variados, como el estado de desarrollo, la disponibilidad de nutrientes en el medio o daño en el DNA (Liu et al., 2013; van Wezel & McDowall, 2011). Además, el gen *actII-ORF4* contiene el codón raro TTA, por lo que su traducción depende del tRNA BldA, asociado al desarrollo del micelio aéreo, lo que supone otro mecanismo adicional para la integración de la morfogénesis con la producción de este antibiótico (Fernández-Moreno et al., 1992).

Para evitar la acumulación de ACT en el interior celular, la expresión de su sistema de exportación ActAB (*actII-ORF2*, *actII-ORF3*) es controlada por el regulador ActR (*actII-ORF1*),

cuya acción es modulada por intermediarios de la ruta de síntesis (Tahlan et al., 2008; Xu et al., 2012). Además, el gen *actA* contiene el codón TTA, por lo que su traducción también depende del tRNA BldA.

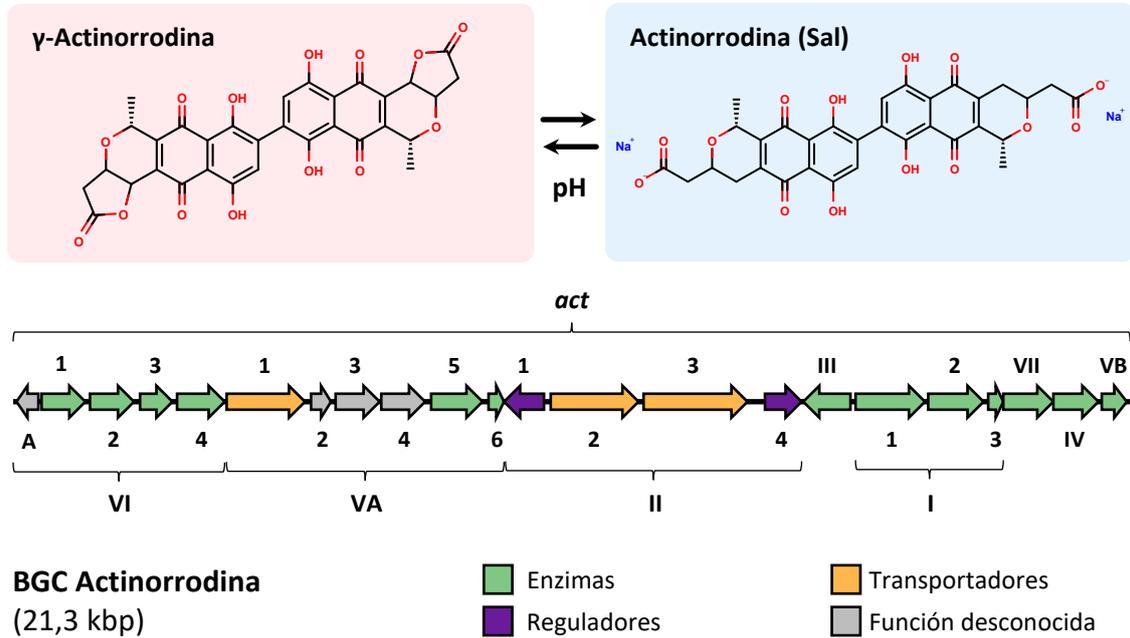


Figura IN.7. Estructura de la actinorrodina y clúster *act*.

### Undecilprodigiosina (RED)

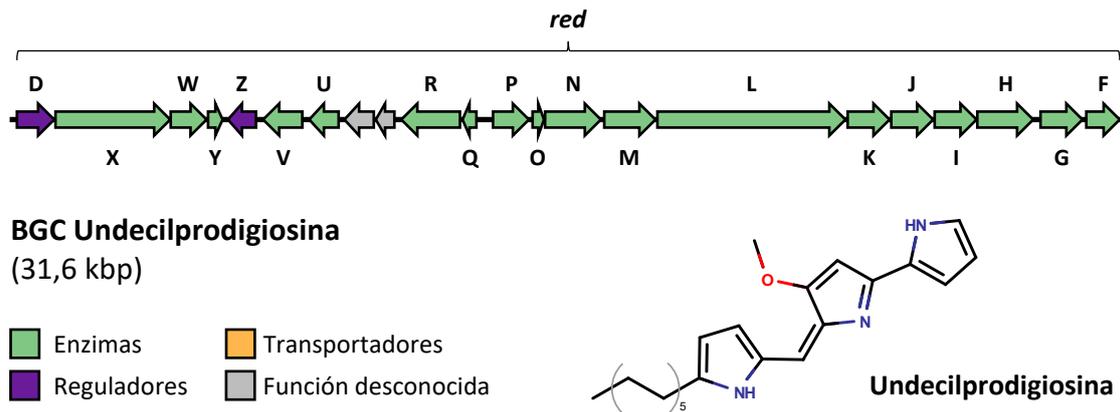
RED es un tripirrol (Figura IN.8) que se caracteriza por su pigmentación roja. Este compuesto presenta actividad antibiótica, aunque su mecanismo de acción no está claro; adicionalmente se ha observado que también presenta actividad antifúngica, antimalárica e incluso, antitumoral (Stankovic et al., 2014). Existe cierta controversia en cuanto al papel fisiológico de RED; algunos autores defienden su función antibiótica como arma para competir contra otros organismos, mientras que otros han propuesto su implicación en procesos de comunicación y de protección contra radiación ultravioleta y daño oxidativo (Stankovic et al., 2014).

El BGC *red* (Figura IN.8) está constituido por 21 genes, *SCO5877-97* (61,6 kbp) (Cerdeño et al., 2001), y presenta dos CSR: RedZ y RedD. El primero es un Regulador de Respuesta huérfano atípico, que controla la expresión de *redD*, que a su vez induce la expresión de los genes biosintéticos del clúster (Guthrie et al., 1998; White & Bibb, 199).

La expresión de RedZ es controlada por multitud de reguladores, como AbsA2 (McKenzie & Nodwell, 2007), DasR (Rigali et al., 2008) o AfsQ1 (Wang et al., 2013) entre otros, por lo que la

## INTRODUCCIÓN

producción de RED depende del estado fisiológico del organismo así como de las condiciones del medio. Además, el gen *redZ* contiene el codón TTA, por lo que su traducción depende del tRNA BldA, lo que integra la morfogénesis con la producción de este antibiótico (White & Bibb, 1997). Finalmente, cabe destacar que la actividad de RedZ es regulada por la propia molécula de RED, lo que establece un bucle de retroalimentación negativo que asocia la expresión del BGC con el producto final de la ruta de síntesis (Wang, Tian, et al., 2009).



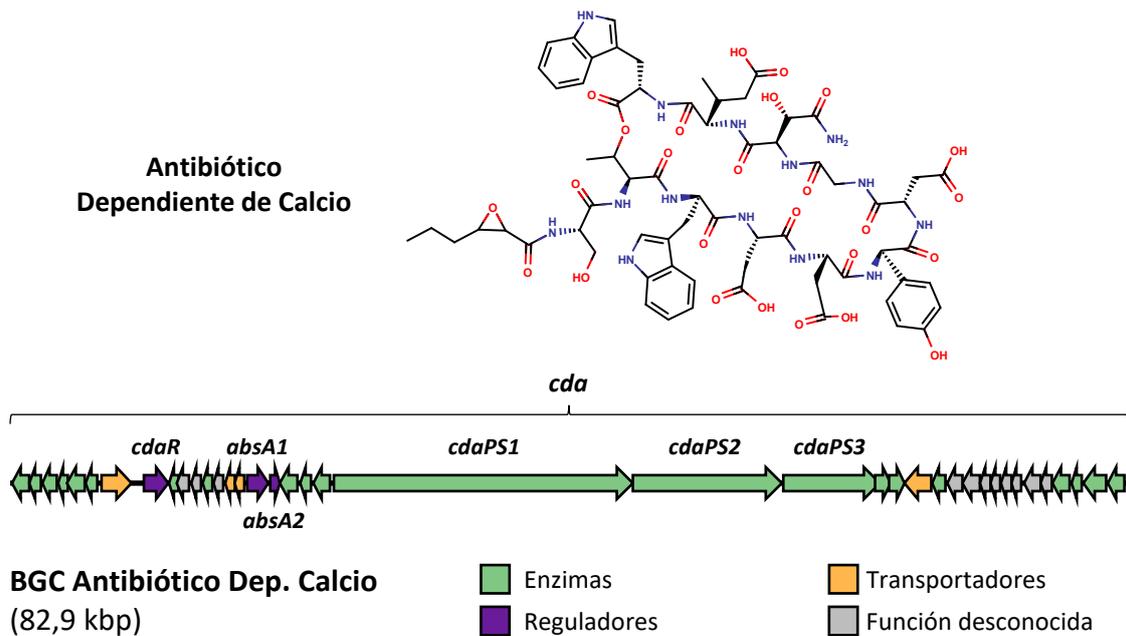
**Figura IN.8.** Estructura de la undecilprodigiosina y clúster *red*.

### Antibiótico Dependiente de Calcio (CDA)

CDA es un lipopéptido (Figura IN.9). No se ha determinado el mecanismo de acción de este antibiótico, aunque seguramente sea activo contra la membrana plasmática, de forma similar a otros antibióticos lipopeptídicos (Hojati et al., 2002).

El BGC *cda* (Figura IN.9) está constituido por 40 genes, *SCO3210-49* (82,9 kbp) (Hojati et al., 2002), y está controlado principalmente por el CSR CdaR. Además, el clúster contiene otro sistema de regulación, el Sistema de Dos Componentes AbsA1/A2.

La regulación de este BGC no está tan caracterizada como el resto, aunque sí se ha descrito que la expresión de CdaR está controlada por múltiples reguladores como AfsQ1 (Wang et al., 2013), AbsA2 (McKenzie & Nodwell, 2007) u OhkA (Lu et al., 2011) entre otros, por lo que la producción de CDA depende del estado fisiológico del organismo así como de las condiciones del medio.



**Figura IN.9.** Estructura del antibiótico dependiente de calcio y clúster *cda*.

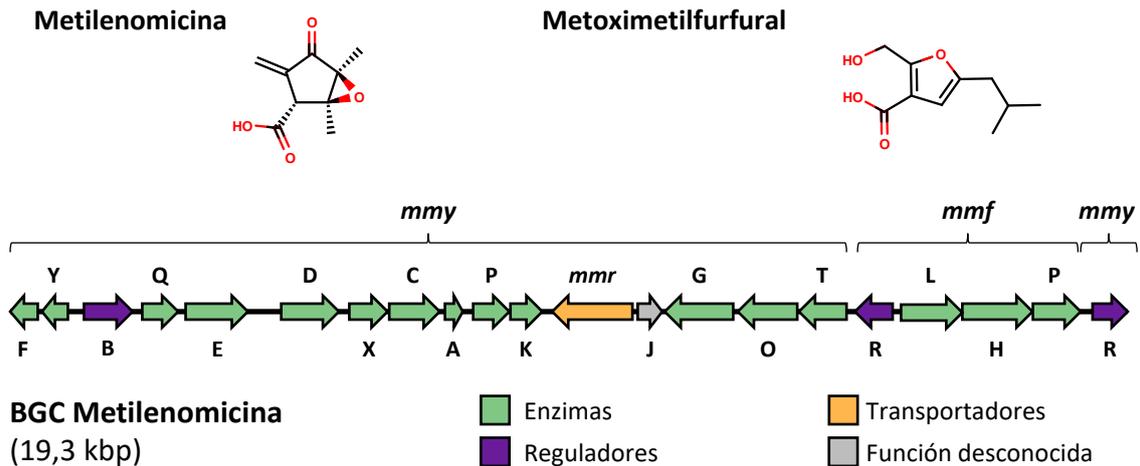
### Metilenomicina (MMY)

MMY es una ciclopentanona (*Figura IN.10*). El mecanismo de acción este antibiótico aún no está claro, aunque parece estar relacionado con la inhibición de la síntesis de la pared celular en bacterias Gram-Positivas (Idowu, 2017).

El BGC *myy-mmf* (*Figura IN.10*) se encuentra en el plásmido SCP1 y está constituido por 17 genes, *SCP1.230-246* (18,1 kbp). Este clúster está regulado por una mezcla de furanos (sintetizados por *mmfPHL*, incluidos en el clúster) (Corre et al., 2008), los represores MmyR y MmfR, y el activador MmyB (O'Rourke et al., 2009). MmyR y MmfR forman un complejo que regula a *mmfLHP*, *mmrR* y *myyB*, y a su vez es controlado por los niveles de la mezcla de furanos. MmyB es el encargado de activar los genes biosintéticos para dar lugar a MMY (O'Rourke et al., 2009). Además, los genes *myyB* y *mmfL* contienen el codón TTA, por lo que su traducción depende del tRNA BldA, lo que integra la morfogénesis con la producción de este antibiótico.

Este BGC contiene un sistema de exportación, *mmr*, que actúa también como mecanismo de resistencia. Es regulado negativamente por MmyJ, cuya acción es modulada por intermediarios de la ruta de síntesis, lo que evita la acumulación de MMY en el interior celular (Liu et al., 2013).

## INTRODUCCIÓN



**Figura IN.10.** Estructura de la metilenomicina y clúster *mmf-mmy*. También se incluye la estructura del metoximetilfurfural, compuesto de la familia de los furanos que actúa como regulador de la ruta de síntesis de este compuesto.

### Integración de la producción de antibióticos con los procesos de crecimiento y desarrollo

La producción de antibióticos en *S. coelicolor* se suele iniciar con el desarrollo del micelio aéreo. Para ello, existen varios mecanismos que permiten integrar el estado de crecimiento y morfogénesis del organismo con la activación de la síntesis de estos compuestos (Liu et al., 2013; van Wezel & McDowall, 2011).

Uno de los mecanismos consiste en el control de la traducción de los reguladores CSR y otros genes clave de los BGC. Como se ha comentado previamente, los genes *actII-ORF4*, *redZ*, *mmyB* y *mmfL* contienen el codón raro TTA (Fernández-Moreno et al., 1992; White & Bibb, 1997), cuyo tRNA BldA está asociado al programa de desarrollo del micelio aéreo (Bush et al., 2015).

Otro de los mecanismos está relacionado con el proceso de PCD que tiene lugar al inicio del desarrollo del micelio aéreo. Durante el proceso autolítico, la degradación de la pared celular da lugar a la liberación de N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc), que es reincorporada al interior celular a través del sistema fosfotransferasa (PTS) (Nothaft et al., 2010); el derivado fosforilado que se genera actúa como efector alostérico del regulador global DasR, que entre otros procesos, controla la producción de antibióticos (Rigali et al., 2008; Swiatek-Polatynska et al., 2015).

El proceso de crecimiento celular también está relacionado con la producción de antibióticos a través de la serina/treonina quinasa AfsK. Esta proteína controla por fosforilación la actividad de AfsR, regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT y RED) (Floriano & Bibb, 1996), así como a DivIVA, determinante del crecimiento polar (Hempel et al., 2012).

Al margen de estos mecanismos, se ha descrito la implicación de otras muchas proteínas asociadas al proceso de desarrollo, como BldB, WhiJ, WblA o AdpA, con la regulación de la producción de antibióticos en este organismo (Liu et al., 2013).

### **Integración de la producción de antibióticos con el metabolismo primario**

La disponibilidad de nutrientes es un factor crítico que dirige el comportamiento de los organismos y afecta a todos los procesos celulares, inclusive la producción de antibióticos. Este control está mediado principalmente por los reguladores centrales del metabolismo del fosfato y del nitrógeno, PhoR/P y GlnR, respectivamente (Martín et al., 2011), aunque también intervienen otros sistemas de regulación como DraK/R, AfsQ1/Q2 o NdgR (Shu et al., 2009; Yang et al., 2009; Yu et al., 2012). En el caso del metabolismo del carbono, la síntesis de antibióticos está modulada por el mecanismo de Represión Catabólica por Carbono, a través de la enzima glucosa quinasa GlkA (Gubbens et al., 2012) y el represor del operón xilosa (Rok7B7) (Świątek et al., 2013), entre otros.

Otra molécula señalizadora clave en los procesos nutricionales es la guanosina tetrafosfato, ppGpp, que en *S. coelicolor* es sintetizada por RelA en respuesta a la limitación de la disponibilidad de aminoácidos. Se ha descrito que la acumulación de ppGpp, entre otros efectos, incrementa la producción de ACT y RED (Chakraborty & Bibb, 1997; Hesketh et al., 2007).

### **Otros mecanismos de regulación**

Al margen de los sistemas de regulación vistos hasta ahora, se han descrito otros muchos ejemplos como LexA, regulador global de la respuesta a daño en el DNA. Mención especial requieren los Sistemas de Dos Componentes, que constituyen uno de los principales sistemas de transducción de señales en bacterias, y suelen actuar como reguladores pleiotrópicos, integrando y coordinando diferentes procesos celulares. Algunos de estos sistemas ya se han mencionado, como PhoR/P, aunque se tratarán en profundidad en el siguiente apartado.

Aunque la regulación mediante factores transcripcionales ha sido la más estudiada, existen otros muchos mecanismos celulares que permiten modular la activación de los BGC, y por ende, la síntesis de antibióticos. Algunas de estas estrategias alternativas son la topología de la cromatina, la maquinaria de degradación proteica, las moléculas similares a hormonas y los sRNA (Liu et al., 2013; van Wezel & McDowall, 2011).

### IN.3 - Sistemas de Dos Componentes

Percibir el mundo que le rodea y ser capaz de adaptarse a él es esencial para cualquier organismo. Los seres vivos están expuestos a multitud de señales, tanto ambientales como internas, que deben ser capaces de detectar, integrar y procesar para responder de forma adecuada. Existen numerosos mecanismos y sistemas de transducción de señales que llevan a cabo esta función, y en el caso de los organismos procariotas, los predominantes son los Sistemas de Dos Componentes (TCS) (Stock et al., 2000; Wang, 2012).

Los TCS actúan como sistemas de regulación globales, capaces de detectar estímulos externos e internos, y desencadenar respuestas celulares. Están implicados en todos los procesos del organismo, desde el crecimiento hasta la comunicación intercelular, pasando por los diferentes procesos metabólicos y la respuesta a distintos tipos de estrés. Generalmente actúan como reguladores pleiotrópicos, coordinando varios procesos biológicos para mantener la homeostasis y el correcto funcionamiento celular (Bekker et al., 2007; Tierney & Rather, 2019).

Como su propio nombre indica, los TCS suelen estar formados por dos componentes: un elemento sensor, denominado Histidina Quinasa (HK), encargado de la percepción de determinadas señales; y un elemento efector, denominado Regulador de Respuesta (RR), encargado de generar una respuesta celular a dichas señales. De forma general, la cascada de señalización se inicia con la percepción de una señal específica por la HK, lo que da lugar a su activación y autofosforilación en un residuo de histidina; posteriormente, el grupo fosforilo es transferido a un residuo de aspartato del RR, lo que produce su activación, y permite que lleve a cabo su función y genere una respuesta celular (Jacob-Dubuisson et al., 2018).

Una de las características más definitorias de estos sistemas es su diseño modular, no solo en cuanto a la existencia de varios componentes en la cascada de transducción (HK y RR), sino también en relación a la arquitectura de dichos componentes, que presentan varios dominios con un plegamiento independiente y especializados en funciones concretas en las diferentes etapas del proceso de transducción (Stock et al., 2000; Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016).

Los TCS también están presentes en algunos organismos eucariotas, como hongos y plantas, aunque constituyen un sistema de regulación minoritario; es importante destacar que están completamente ausentes en animales (Alvarez et al., 2016).

### IN.3.1 - Arquitectura de las Histidina Quinasas

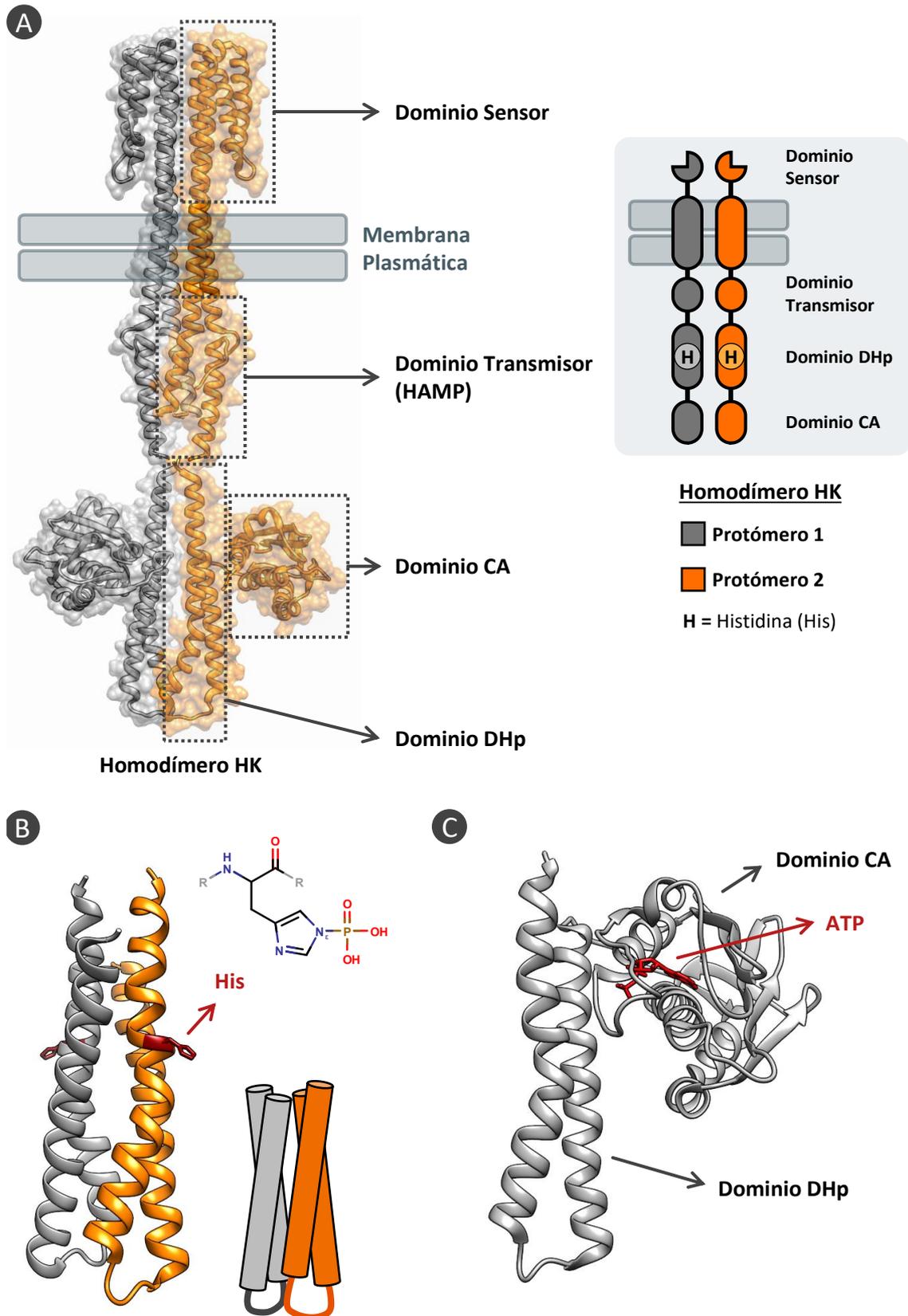
La mayor parte de las HK suelen encontrarse embebidas en la membrana plasmática y formando homodímeros, aunque también se han descrito HK completamente citosólicas. La arquitectura canónica de una HK consiste en un dominio sensor, un dominio transmembrana, un dominio transmisor, un dominio de dimerización / fosfotransferencia (DHp), y un dominio de unión a ATP con actividad quinasa (CA) (*Figura IN.11*). Estos dos últimos dominios constituyen el núcleo catalítico de la HK (Stock et al., 2000; Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016).

El dominio sensor suele ser extracitoplasmático, ya que la mayoría de HK detectan señales externas. Sin embargo, también se han descrito HK capaces de detectar señales a nivel de la membrana, así como señales internas, por lo que en estos casos el dominio sensor se encontraría en la región transmembrana u orientado hacia el citosol, respectivamente (Krell et al., 2010). La variedad de estímulos, tanto físicos como químicos, que pueden detectar las HK es enorme: temperatura, luz, concentración de oxígeno, diferentes tipos de nutrientes, antibióticos, etc. (Krell et al., 2010; Tierney & Rather, 2019). Ésta es una de las razones por la que la identidad de la señal de activación de la mayor parte de los TCS descritos aún se desconoce. Existe poca conservación a nivel de secuencia en el dominio sensor entre las distintas HK, aunque los dominios tipo PAS son los más abundantes (Zschiedrich et al., 2016). En algunos TCS, la señal es percibida a través de proteínas accesorias, que posteriormente transmiten la señal a la HK (Busche et al., 2016; Hutchings, Hong, Leibovitz, et al., 2006; Krell et al., 2010).

La región transmembrana, compuesta por un número variable de  $\alpha$ -hélices, presenta un papel estructural, aunque también se encarga de transmitir la señal percibida por el dominio sensor al resto de la proteína (Krell et al., 2010; Maslennikov et al., 2010).

Tras la región transmembrana puede haber un dominio adicional de transmisión de la señal, ubicado en la parte citosólica, aunque no está siempre presente. El dominio transmisor más habitual es el dominio HAMP (presente en un tercio de las HK), que se organiza formando dos  $\alpha$ -hélices (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Zschiedrich et al., 2016). Otros dominios destacados son STAC, PAS y GAF; estos dos últimos, además de transmitir la señal, también permiten integrar señales citoplasmáticas adicionales (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Krell et al., 2010; Zschiedrich et al., 2016).

## INTRODUCCIÓN

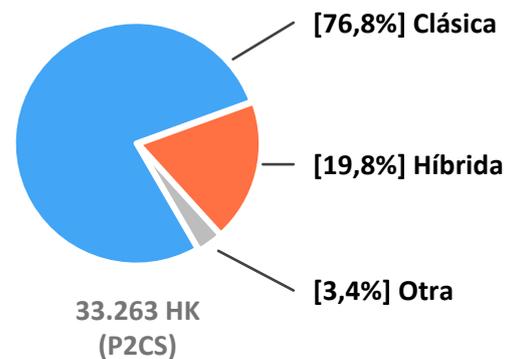


**Figura IN.11. Arquitectura de las Histidina Quinasas.** [A] Estructura de un homodímero de HK (PDB: 5JEQ, 2C2A); se indican los diferentes dominios estructurales / funcionales. [B] Dominios DHp (PDB: 2C2A) en el homodímero (el dominio de cada protómero se indica de un color distinto). Se muestra la estructura del residuo de histidina en su estado fosforilado. [C] Dominios DHp y CA de una HK (PDB: 2C2A). Se muestra la molécula de ATP unida al dominio CA.

El dominio DHp presenta las funciones de dimerización y fosfotransferencia, y contiene el motivo denominado *H-Box*, donde está ubicado el residuo de histidina que es fosforilado en el proceso de activación de la HK, y a partir del cual se produce la fosfotransferencia para la activación del RR (por tanto, éste es el dominio que interacciona directamente con el RR) (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019). Es importante destacar que, aunque este dominio es el que dirige la formación de homodímeros de la HK, en la interacción entre ambos protómeros también intervienen residuos de otros dominios, como la región transmembrana o el dominio HAMP (Jacob-Dubuisson et al., 2018). A nivel estructural, este dominio está formado por dos  $\alpha$ -hélices que forman una horquilla (el residuo de histidina se encuentra siempre en la primera  $\alpha$ -hélice) (Figura IN.11) (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; Zschiedrich et al., 2016). Se han descrito cuatro subtipos de este dominio: HisKA, HisKA2 HisKA3 y HWE-HK.

El dominio CA es capaz de unir moléculas de ATP y tiene actividad quinasa. La unión del ATP se produce a través de una serie de motivos conservados: *N-Box*, *G1-Box*, *F-Box*, *G2-Box* y *G3-Box* (Wang, 2012). El grupo  $\gamma$ -fosfato de este ATP es el utilizado para la fosforilación del residuo de histidina del dominio DHp (Zschiedrich et al., 2016). A nivel estructural, este dominio se encuentra muy conservado, y presenta una forma globular con un  $\beta$ -lámina en uno de los lados y 3  $\alpha$ -hélices en el otro, donde se encuentra el sitio de unión al ATP (Figura IN.11) (Zschiedrich et al., 2016). El dominio CA presenta una única familia: HATPase\_c.

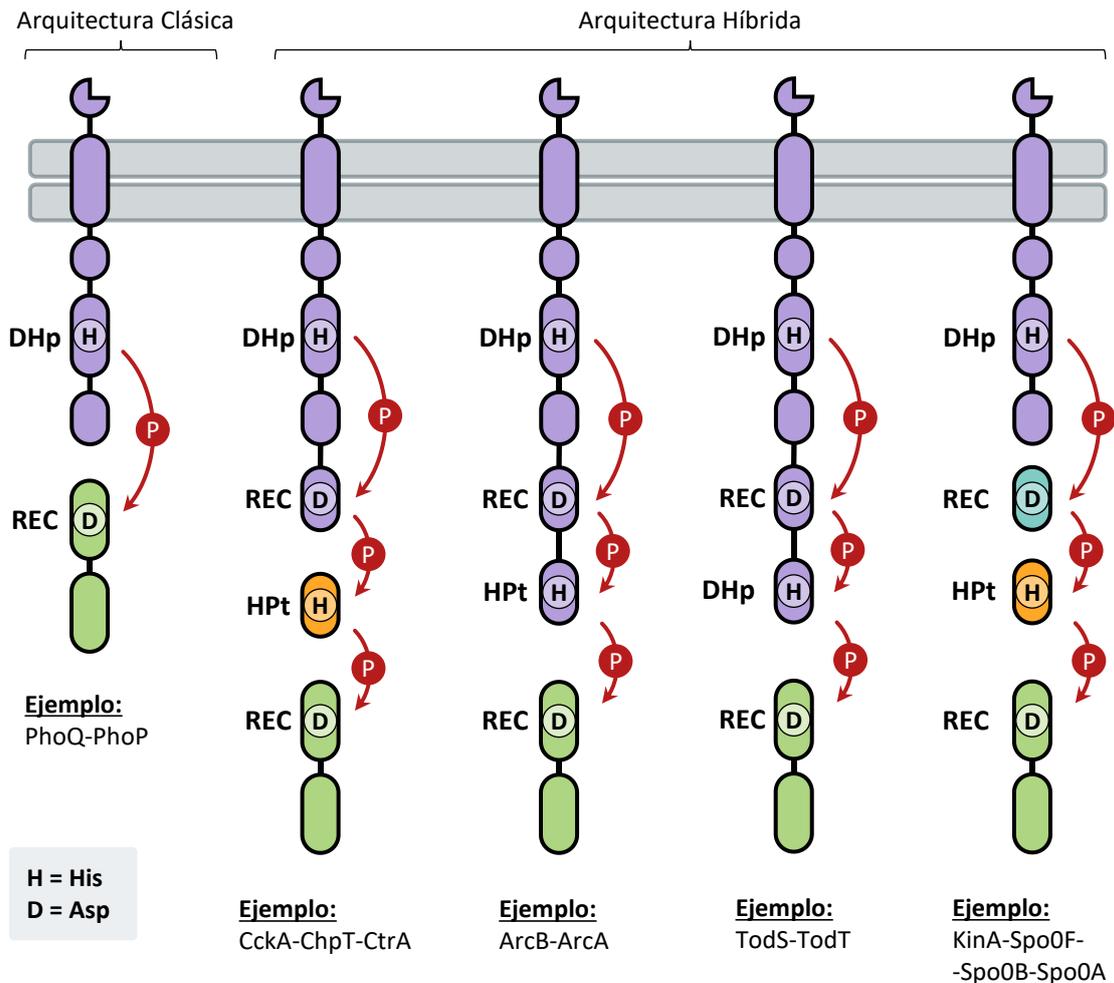
Aunque la mayoría de las HK en procariotas presentan la arquitectura clásica indicada, existe otro grupo de Histidinas Quinasas híbridas (hHK) (Figura IN.12) (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Krell et al., 2010). Se caracterizan por la presencia de dominios adicionales REC, HPT y/o DHp, que dan lugar a eventos de fosfotransferencia en la propia proteína. Los dominios REC, normalmente presentes en los RR, presentan un residuo de aspartato fosforilable, mientras que los dominios HPT



**Figura IN.12. Clasificación de las Histidina Quinasas.** Distribución de las HK en función de su arquitectura de dominios. Datos obtenidos de la base de datos P2CS.

presentan un residuo de histidina fosforilable, aunque a diferencia de los DHp, no presentan función de dimerización. Dentro de las hHK se han descrito diferentes tipos de arquitecturas, aunque el proceso de fosfotransferencia siempre tienen lugar siguiendo el esquema His  $\rightarrow$  Asp  $\rightarrow$  His  $\rightarrow$  Asp (Figura IN.13) (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Krell et al., 2010).

## INTRODUCCIÓN

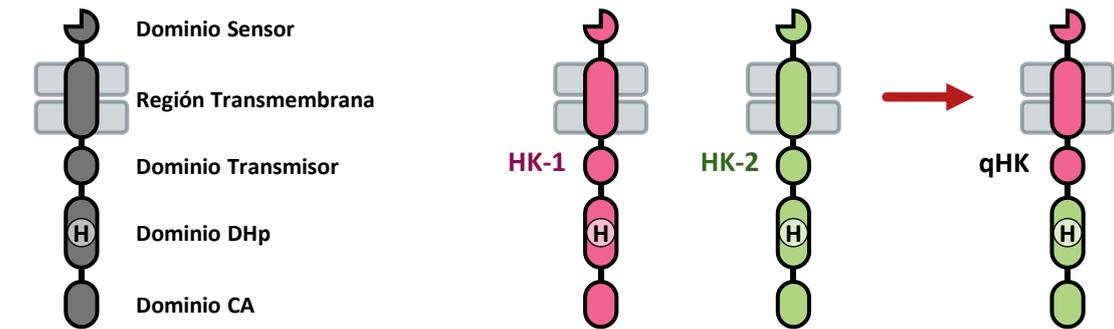


**Figura IN.13. Posibles arquitecturas de las Histidina Quinasas híbridas.** Se muestran diferentes configuraciones de dominios posibles en Histidina Quinasas híbridas; así mismo, se indican las diferentes etapas de fosfotransferencia en cada caso.

### IN.3.2 - Histidina Quinasas quiméricas

Las Histidina Quinasas quiméricas (qHK) son proteínas formadas por la fusión de dominios de dos HK distintas, para generar una nueva HK que es capaz de responder a los estímulos de una de las HK pero que presenta el mecanismo de traducción citosólico de la otra HK (incluyendo su RR asociado así como sus dianas). La principal aplicación biotecnológica para la que se han diseñado y generado las qHK ha sido la construcción de biosensores (Ganesh et al., 2019; Lazar & Tabor, 2021).

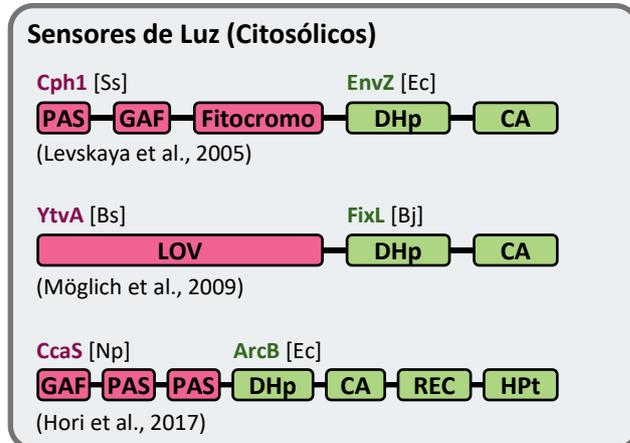
La construcción de qHK no es algo nuevo, de hecho la primera proteína quimérica de este tipo fue generada por Alexandra Krikos y colaboradores en 1985 (Krikos et al., 1985), que ya habían hecho hincapié unos años antes en el diseño modular a nivel estructural y funcional de las HK (Krikos et al., 1983). Desde entonces, tal y como se muestra en la *Figura IN.14*, otras muchas qHK funcionales han sido construidas con éxito.



	HK-1	HK-2		HK-1	HK-2
	<b>NarX</b> [Ec]	<b>CpxA</b> [Ec] (Appleman et al., 2003)		<b>AuZ</b> [Pp]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Ravikumar et al., 2015)
	<b>NarX</b> [Ec]	<b>NarQ</b> [Ec] (Appleman et al., 2003)		<b>MxaY</b> [Pd]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Ganesh et al., 2017)
	<b>NarX</b> [Ec]	<b>Tar</b> [Ec] (Ward et al., 2002)		<b>FlhS</b> [Pd]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Selvamani et al., 2017)
	<b>NarX</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Lehning et al., 2017)		<b>MxcQ</b> [Mo]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Selvamani et al., 2017)
	<b>NarQ</b> [Ec]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)		<b>MxcQ</b> [Me]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Selvamani et al., 2020)
	<b>Tar</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Utsumi et al., 1989)		<b>MxbD</b> [Me]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Selvamani et al., 2020)
	<b>Trg</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Baumgartner et al., 1994)		<b>McpC</b> [Bs]	<b>McpB</b> [Bs] (Kristich et al., 2003)
	<b>Trg</b> [Ec]	<b>Tsr</b> [Ec] (Feng et al., 1997)		<b>McpC</b> [Bs]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)
	<b>Tsr</b> [Ec]	<b>Trg</b> [Ec] (Feng et al., 1997)		<b>McpB</b> [Bs]	<b>McpC</b> [Bs] (Kristich et al., 2003)
	<b>Tar</b> [Ec]	<b>Tsr</b> [Ec] (Krikos et al., 1985)		<b>Aer</b> [Ec]	<b>Tsr</b> [Ec] (Repik et al., 2000)
	<b>Tar</b> [Ec]	<b>Tap</b> [Ec] (Weerasuriya et al., 1998)		<b>ECA0434</b> [Pa]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)
	<b>Tap</b> [Ec]	<b>Tar</b> [Ec] (Weerasuriya et al., 1998)		<b>VanN</b> [Va]	<b>SphS</b> [S] (Junaid et al., 2021)
	<b>DcuS</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Ganesh et al., 2013)		<b>PleC</b> [Cc]	<b>CcaS</b> [Np] (Zhang et al., 2022)
	<b>MalK</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Ganesh et al., 2015)		<b>TodS</b> [Pp]	<b>SphS</b> [Ss] (Inaba et al., 2018)

	HK-1	HK-2
	<b>NarQ</b> [Ec]	<b>NarX</b> [Ec] (Appleman et al., 2003)
	<b>Tar</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Zhu et al., 2003)
	<b>Tar</b> [Ec]	<b>EnvZ</b> [Ec] (Lehning et al., 2017)
	<b>McpC</b> [Bs]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)
	<b>CitA</b> [Kp]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)
	<b>McpS</b> [Pp]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)

	HK-1	HK-2
	<b>McpC</b> [Bs]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)
	<b>CitA</b> [Kp]	<b>Tar</b> [Ec] (Bi et al., 2016)



**LEYENDA ORGANISMOS:**

- [Bj] *Bradyrhizobium japonicum*
- [Bs] *Bacillus subtilis*
- [Cc] *Caulobacter crescentus*
- [Ec] *Escherichia coli*
- [Kp] *Klebsiella pneumoniae*
- [Me] *Methylobacterium extorquens*
- [Mo] *Methylobacterium organophilum*
- [Np] *Nostoc punctiforme*
- [Pa] *Pectobacterium atrosepticum*
- [Pd] *Paracoccus denitrificans*
- [Pp] *Pseudomonas putida*
- [Ss] *Synechocystis* sp.
- [Va] *Vibrio anguillarum*

**Figura IN.14. Histidina Quinasas quiméricas descritas en la literatura.** En cada caso se indica la organización de dominios de la qHK, el nombre de las HK que se han fusionado, el organismo del que proceden y la referencia bibliográfica.

## INTRODUCCIÓN

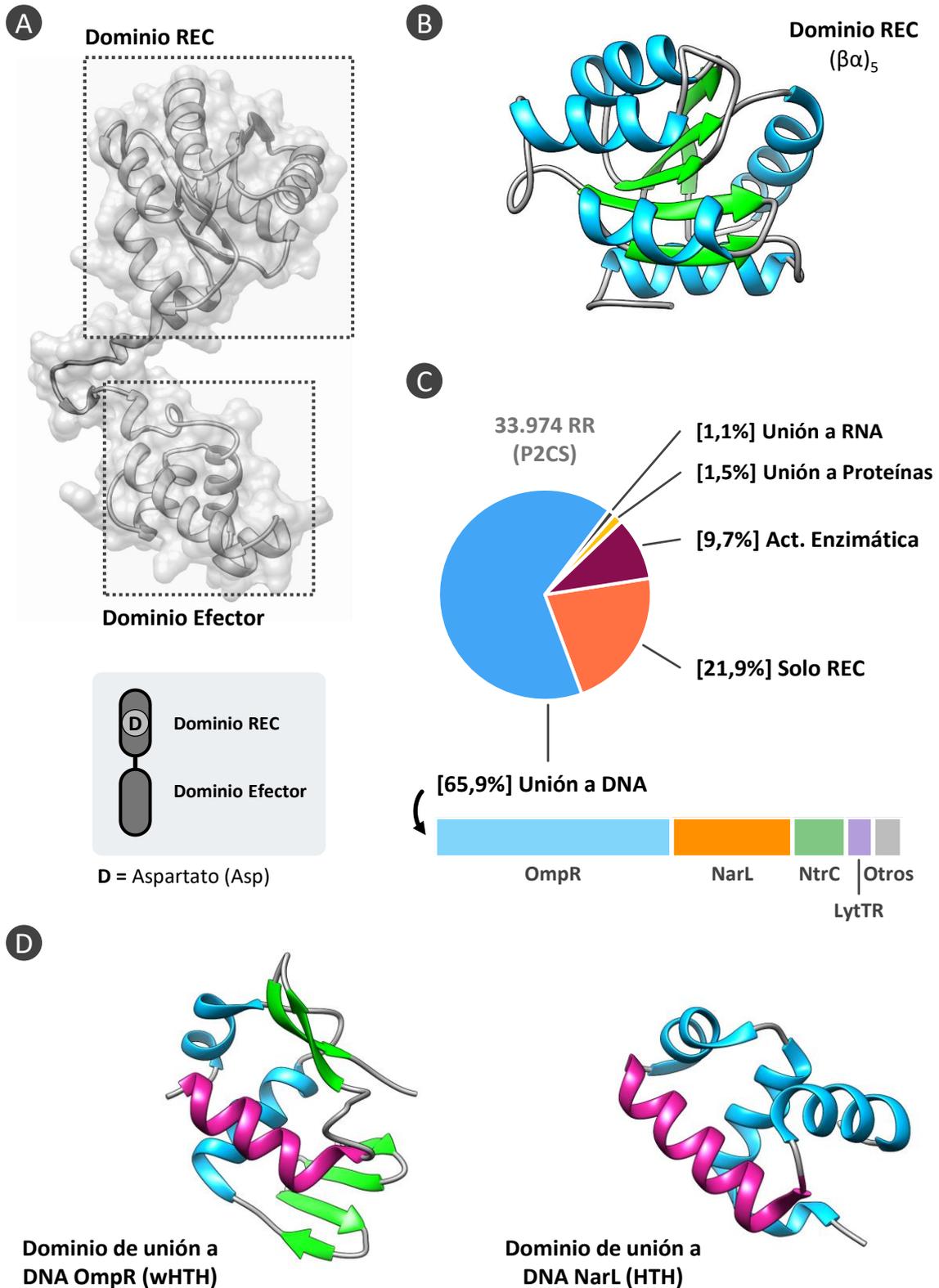
Se han seguido diferentes estrategias respecto al diseño y construcción de las qHK. En la mayoría de los casos se han fusionado los dominios sensor-transmisor de una HK (incluyendo las regiones transmembrana), con los dominios catalíticos citosólicos de la otra HK. Sin embargo, también se han seguido otros diseños, como incluir solo el dominio sensor extracelular de una de las HK (Bi et al., 2016), o incluir el dominio sensor extracelular y las regiones transmembrana de una de las HK y los dominios transmisor y catalíticos de la otra HK (Appleman et al., 2003; Bi et al., 2016; Zhu & Inouye, 2003). Además, se han generado varias qHK a partir de HK procedentes de distintos organismos (que pueden pertenecer incluso a filos distintos) (Bi et al., 2016; Ganesh et al., 2017; Hori et al., 2017; Inaba et al., 2018; Levskaya et al., 2005; Möglich et al., 2009; Ravikumar et al., 2015; Selvamani et al., 2017, 2020; C. Zhang et al., 2022).

### IN.3.3 - Arquitectura de los Reguladores de Respuesta

Los RR son proteínas citosólicas y presentan una estructura mucho más simple que las HK, ya que solo muestran dos dominios: un dominio receptor (REC) y un dominio efector (*Figura IN.15*) (Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016).

El dominio REC está presente en todos los RR y contiene el residuo de aspartato que es fosforilado mediante fosfotransferencia por la HK, proceso que da lugar a la activación de esta proteína. Este dominio también es el encargado de dirigir los procesos de oligomerización del RR que tienen lugar tras su activación (normalmente se forman homodímeros) (Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016). El dominio REC presenta una elevada conservación a nivel estructural, con un plegamiento ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub>; la estructura consiste en una  $\beta$ -lámina central con las  $\alpha$ -hélices a ambos lados (*Figura IN.15*) (Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016). El sitio de fosforilación está definido por una serie de residuos clave muy conservados, salvo en los RR atípicos que presentan mecanismos alternativos a la activación por fosforilación canónica (Beier, 2012).

El dominio efector suele ser mucho más variable que el dominio REC, e incluso está ausente en algunos RR (Galperin, 2006). Su función es generar respuestas celulares específicas cuando se produce la activación del RR por la HK, y generalmente actúa como un factor transcripcional modulando la expresión génica. Sin embargo, aunque la mayoría de los dominios efectores son dominios de unión a DNA, también se han identificado dominios de unión a RNA, dominios de unión a proteínas y dominios con actividad enzimática (*Figura IN.15*) (Galperin, 2006, 2010). Los más abundantes son los dominios de unión a DNA de las familias NarL y OmpR, que presentan motivos HTH y WHTH respectivamente.



**Figura IN.15. Arquitectura y clasificación de los Reguladores de Respuesta.** [A] Estructura de un RR (PDB: 5HEV); se indican los diferentes dominios estructurales / funcionales. [B] Estructura del dominio REC (PDB: 5HEV); en azul se muestran las  $\alpha$ -hélices y en verde las  $\beta$ -láminas. [C] Clasificación de los RR en función de su dominio efector; también se muestran las principales familias de dominios de unión a DNA. Datos obtenidos de la base de datos P2CS. [D] Estructuras de los dominios efectores de unión a DNA de las familias OmpR (PDB: 6LXL) y NarL (PDB: 1ZG5); en azul se muestran las  $\alpha$ -hélices, en verde las  $\beta$ -láminas y en magenta la hélice de unión al DNA.

## INTRODUCCIÓN

### IN.3.4 - Organización de Histidina Quinasas y Reguladores de Respuesta

Las HK y RR habitualmente se encuentran formando parejas a nivel funcional; es decir, cada HK suele estar asociada a un RR en particular. De hecho, los genes que codifican estas parejas HK-RR suelen estar juntos también a nivel genómico, formando parte del mismo operón (Groisman, 2016)

La interacción entre una HK y su RR asociado es muy específica, lo cual es clave para un correcto funcionamiento celular, ya que en determinados momentos puede haber multitud de TCS actuando de forma simultánea (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; Jacob-Dubuisson et al., 2018). El código de especificidad depende de un set de aminoácidos presentes principalmente en el dominio DHP de la HK y en el dominio REC del RR, a través de los cuales se produce la interacción entre las dos proteínas para el proceso de fosfotransferencia, aunque también intervienen residuos adicionales del dominio CA de la HK (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; Jacob-Dubuisson et al., 2018). Es importante destacar que, aunque la HK suele estar presente como homodímero, el RR solo interacciona con el protómero con el que tiene lugar la fosfotransferencia (Jacob-Dubuisson et al., 2018).

Este reconocimiento a nivel molecular dado por las interacciones entre los residuos de una HK y su RR asociado establece una preferencia cinética entre ambas proteínas, lo que previene las interacciones inespecíficas con otras HK y RR (Laub & Goulian, 2007; Rowland & Deeds, 2014). Adicionalmente, pueden existir otros mecanismos que ayuden a establecer la especificidad HK-RR, como la localización espacial y temporal de ambas proteínas. Aunque se han descrito eventos de comunicación cruzada (*cross-talk*) entre distintos TCS, estas interacciones inespecíficas entre HK y RR solo se han observado tras la introducción de perturbaciones genéticas, como la eliminación o sobreexpresión de uno de los componentes, por lo que no parecen ser relevantes a nivel fisiológico, más allá de un mecanismo compensatorio para hacer frente a mutaciones o defectos en rutas importantes de señalización (Krell et al., 2010; Laub & Goulian, 2007).

Aunque lo habitual son las parejas HK-RR, no es extraño observar en los genomas bacterianos la presencia de HK huérfanas (oHK) y RR huérfanos (oRR), en los que no existe una pareja asociada a nivel genómico, lo cual no quiere decir que a nivel funcional carezcan de ella (Beier, 2012). Las oHK y oRR pueden encontrarse asociadas funcionalmente entre sí (Li, Zhao, et al., 2020; Zheng et al., 2021) o intervenir en las cascadas de señalización de un TCS, como otro componente más de la ruta de transducción (Wang, Shu, et al., 2009). La predicción de las parejas funcionales de

estas oHK y oRR constituye aún un serio obstáculo, a pesar de los esfuerzos realizados con los algoritmos de predicción de interacciones proteína-proteína.

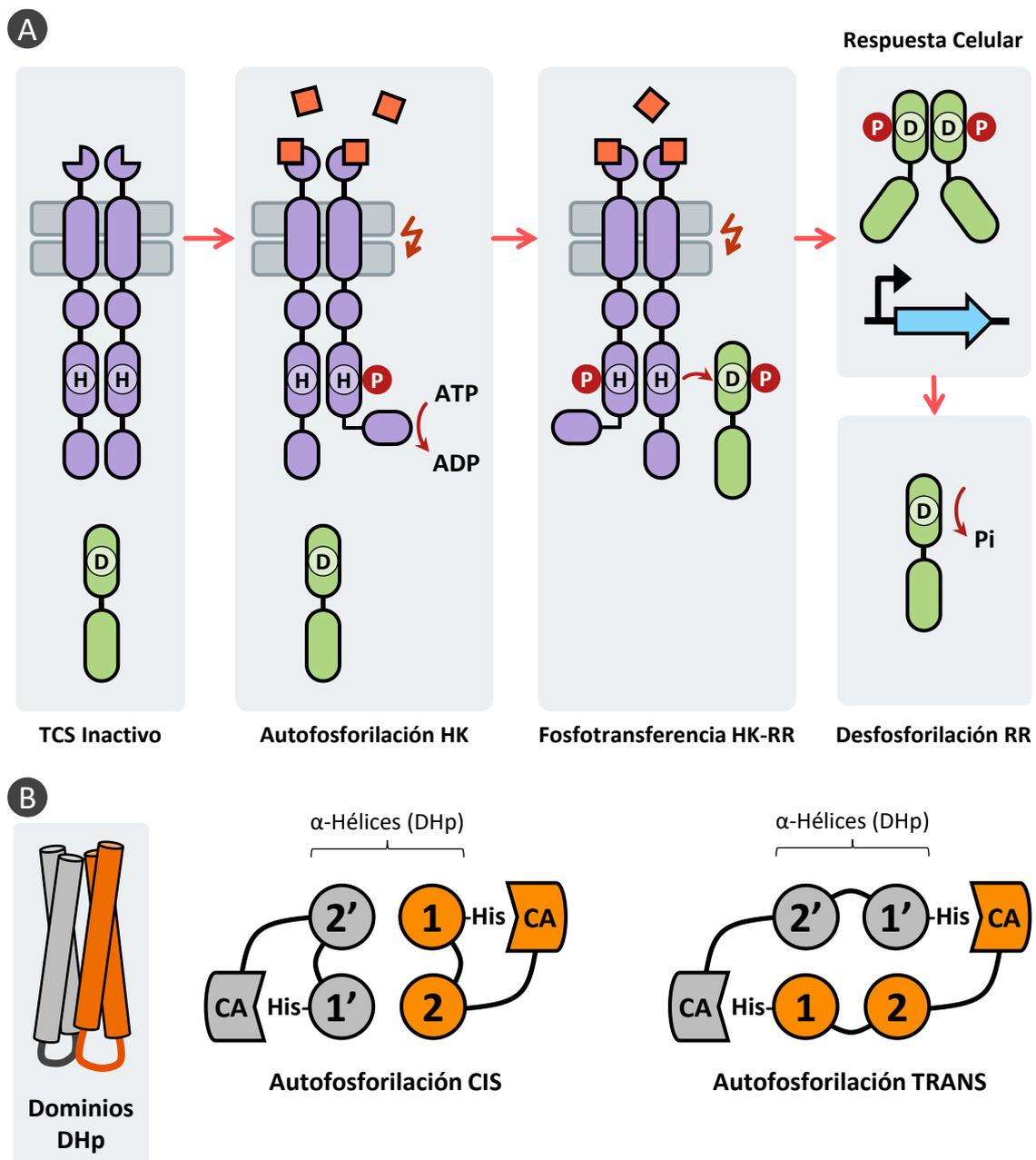
### IN.3.5 - Mecanismo molecular de acción de los Sistemas de Dos Componentes

En un TCS canónico, el mecanismo de acción molecular presenta las siguientes etapas (*Figura IN.16*) (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; Jacob-Dubuisson et al., 2018; Krell et al., 2010; Zschiedrich et al., 2016):

1. La señal de activación es percibida por el dominio sensor de la HK, lo que da lugar a una serie de cambios conformacionales que son transmitidos a lo largo de la estructura de la HK, a través de la región transmembrana y del dominio transmisor, hasta alcanzar los dominios DHp y CA.
2. Los dominios DHp y CA adquieren un estado conformacional que favorece la función autoquinasa de la HK. En este estado, el dominio CA une una molécula de ATP y transfiere el  $\gamma$ -fosforilo a un residuo de histidina del dominio DHp. Las HK suelen encontrarse formando homodímeros, y el proceso de fosforilación se puede producir en cis (el dominio CA fosforila el dominio DHp de la misma cadena peptídica) o en trans (el dominio CA fosforila el dominio DHp presente en el otro protómero). El que tenga lugar un tipo u otro depende del plegamiento y posición relativa de las  $\alpha$ -hélices que constituyen el dominio DHP con respecto al dominio CA (*Figura IN.16*).
3. Una vez fosforilado el residuo de histidina de la HK, se produce otra reorganización de los dominios DHp y CA, hasta adquirir un estado conformacional que favorece la función de fosfotransferencia, en la cual el dominio CA debe desplazarse para permitir la unión del RR al dominio DHp. En este estado, al tener lugar la interacción de las proteínas HK y RR, se produce la transferencia del grupo fosforilo desde el residuo de histidina del dominio DHp de la HK al residuo de aspartato del dominio REC del RR. La unión entre ambas proteínas es muy transitoria.  
Las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia se van alternando en los protómeros que forman los homodímeros de HK, lo que aumenta la eficiencia del proceso.
4. La fosforilación del dominio REC del RR, induce una serie de cambios conformacionales en dicha proteína, que normalmente implican la separación del dominio REC y del dominio efector. Estos cambios estructurales permiten la oligomerización del RR a través del dominio REC (normalmente se forman homodímeros).

## INTRODUCCIÓN

5. El RR en su estado activo desencadena una respuesta celular, que suele producirse a través de la modulación de la expresión génica, ya que los RR suelen actuar como factores transcripcionales.
6. Una vez generada la respuesta celular tras el proceso de transducción de la señal, es necesario “apagar” la cascada de señalización, lo que supone la desfosforilación del RR. Este proceso suele ser catalizado por la propia HK, que adquiere un estado conformacional que favorece la función fosfatasa de esta proteína.



**Figura IN.16. Mecanismo molecular de acción de los Sistemas de Dos Componentes. [A]** Etapas del mecanismo molecular de transducción de señales de los TCS. **[B]** Modos de autofosforilación de los dímeros de HK. Cada protómero muestra un color distinto (naranja y gris), y se muestra una representación esquemática de las  $\alpha$ -hélices que forman el dominio DHp y del dominio CA.

Este mecanismo de transducción de señales es posible gracias al diseño modular y plasticidad estructural de las HK y RR. La HK presenta tres estados funcionales: autoquinasa, fosfotransferasa y fosfatasa, que dependen de la presencia de la señal de activación, y en los que la movilidad del dominio CA con respecto al dominio DHP resulta esencial (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; Jacob-Dubuisson et al., 2018; Zschiedrich et al., 2016). El RR, por su parte, presenta dos estados que dependen de su fosforilación: uno más compacto cuando el RR se encuentra inactivo (no fosforilado), y otro en el que los dominios se encuentran disociados entre sí y puede tener lugar la oligomerización del RR y la generación de la respuesta celular (estado activo, fosforilado) (Stock et al., 2000; Zschiedrich et al., 2016).

### IN.3.6 - Modulación de la cascada de señalización

Los TCS están implicados en la regulación y coordinación de multitud de procesos biológicos. Estas cascadas de señalización deben responder de forma dinámica, por lo que existen diferentes mecanismos de modulación: control de los niveles de expresión de la HK y del RR, modificación del estado de fosforilación del RR, regulación cruzada de TCS, cascadas de señalización no lineales, y regulación del TCS por retroalimentación de sus dianas (Groisman, 2016). Todos estos mecanismos modulan la cantidad de RR fosforilado, que es lo que define el nivel de activación de un determinado TCS.

#### Control transcripcional del TCS

Los niveles de HK y RR de un TCS que se están expresando en cada momento constituyen un factor crítico en el funcionamiento de la ruta de señalización. Aquí cobra especial importancia que en la mayoría de TCS, los genes de la HK y del RR asociados se encuentran codificados por el mismo operón, lo cual, permite un control transcripcional muy eficiente (Groisman, 2016).

Los TCS cuentan con un promotor constitutivo que permite un nivel basal de expresión, necesario para que haya suficientes HK para detectar la aparición de la señal de activación y RR para iniciar la respuesta (Groisman, 2016). Además, muchos TCS tienen un promotor autorregulado, que permite establecer un mecanismo de control por retroalimentación positivo o negativo (Aínsa et al., 1999; Lewis et al., 2019; Rico, Yepes, et al., 2014; White & Bibb, 1997; Yu et al., 2012). La presencia de diferentes niveles de RR, junto con la existencia de promotores de distinta afinidad en sus genes diana, permite establecer diferentes tipos de respuestas celulares (Barreiro & Martínez-Castro, 2019; Groisman, 2016; Sola-Landa et al., 2008).

## INTRODUCCIÓN

### Estado de fosforilación del RR

Los RR normalmente son fosforilados por sus HK asociadas, aunque algunos pueden catalizar su propia fosforilación a partir de pequeños compuestos fosforilados de alta energía, como el acetilfosfato, el carbamoilfosfato o el fosforamidoato, cuyos niveles son muy sensibles al estado metabólico de la célula (Hutchings, Hong, & Buttner, 2006; Laub & Goulian, 2007). Sin embargo, en los TCS en los que se ha observado esta fosforilación espontánea del RR, la activación indebida de la cascada de señalización en ausencia de estímulo es controlada por la actividad fosfatasa de la HK asociada (Krell et al., 2010; Laub & Goulian, 2007).

La desfosforilación de los RR es un proceso crítico, no solo para prevenir una activación indebida de la cascada de señalización, sino también para modular el grado de activación del RR y “apagar” la cascada de señalización cuando ya se haya generado la respuesta celular requerida (Groisman, 2016; Zschiedrich et al., 2016). Aunque generalmente es la HK asociada a dicho RR la que presenta actividad fosfatasa y cataliza esta reacción, también se ha descrito la desfosforilación por hidrólisis espontáneas, así como por otras fosfatasas distintas a la HK, que pueden pertenecer a las familias CheC/CheX/FliY, CheZ, Rap y Spo0E (Zschiedrich et al., 2016).

### Regulación cruzada y cascadas de señalización no lineales

Las cascadas de señalización de los TCS pueden estar interconectadas a través de eventos de regulación cruzada (Laub & Goulian, 2007). Los niveles de expresión o las actividades bioquímicas de un TCS pueden ser reguladas por otro TCS, o por la diana de otro TCS. También hay que tener en cuenta que varios TCS pueden compartir las dianas que regulan. Todos estos eventos parecen estar asociados a mecanismos de integración de señales que dan lugar a complejas redes de regulación (Rodríguez-García et al., 2009; Santos-Beneit et al., 2012; Solalanda et al., 2013; Wang et al., 2012, 2013; Zhu et al., 2021).

Aunque la mayoría de TCS en procariotas tienen cascadas de señalización lineales en los que una HK está asociada a un único RR, se han descrito rutas convergentes y divergentes. En las rutas convergentes varias HK activan a un mismo RR, por ejemplo LuxN, LuxQ y CqsS se activan en diferentes condiciones, pero todos regulan a LuxR en *Vibrio harveyi* (Henke & Bassler, 2004). En las rutas divergentes una misma HK controla a varios RR, por ejemplo CheA, que fosforila a CheY y CheB en *Escherichia coli* (Li et al., 1995).

### Regulación del TCS por sus dianas

Otro mecanismo de retroalimentación es el ejercido por algunas de las dianas controladas por el propio TCS (Fernández-Martínez et al., 2009; Groisman, 2016; Martín-Martín et al., 2017; Wang, Tian, et al., 2009). Se han descrito múltiples mecanismos: modificación del acceso a la señal por la HK, modificación de las actividades bioquímicas de la HK, modificación de los niveles del RR y modificación de la actividad del RR. Todos ellos permiten asociar los niveles de activación de la ruta de señalización del TCS a la propia respuesta que está desencadenando.

### Otros mecanismos de modulación

Aunque la mayoría de HK y RR presentan todos los dominios y actividades que se han ido indicando para permitir una transducción de señales completa, se han descrito casos de pseudoenzimas, como HK que carecen de actividad quinasa o fosfatasa, HK que no presentan dominio sensor o RR carentes de residuo de aspartato fosforilable (Collins & Childers, 2021). Estos casos muestran mecanismos alternativos de regulación, aunque su presencia es minoritaria.

### IN.3.7 - Sistemas de Dos Componentes en *Streptomyces coelicolor*

Según las bases de datos *P2CS* (Ortet et al., 2015) y *P2RP* (Barakat et al., 2013) *S. coelicolor* presenta 110 HK y 87 RR. Estas proteínas se organizan en 66 parejas HK-RR y 2 tríadas (una de ellas con 2 HK y 1 RR; y la otra con 1 HK y 2RR), es decir, 68 TCS completos. Las proteínas restantes quedarían como sistemas huérfanos: 41 oHK y 18 oRR. El listado completo se incluye en “ANEXO I. Sistemas de Dos Componentes de *Streptomyces coelicolor*”.

Se han descrito y estudiado 25 TCS completos, 5 oHK y 10 oRR, lo que representa aproximadamente un tercio del total. Estos sistemas están implicados en todos sus procesos celulares, como el metabolismo primario, la morfogénesis o la respuesta a diferentes tipos de estreses; además se ha podido observar que la mayoría de ellos participan en la regulación de la producción antibióticos, ya sea de forma directa mediante el control de los CSR o incluso la regulación de los propios genes del BGC, o de forma indirecta (*Figura IN.17*). A continuación se comentará el papel que cumplen cada uno de ellos (se han organizado por orden alfabético).

## INTRODUCCIÓN

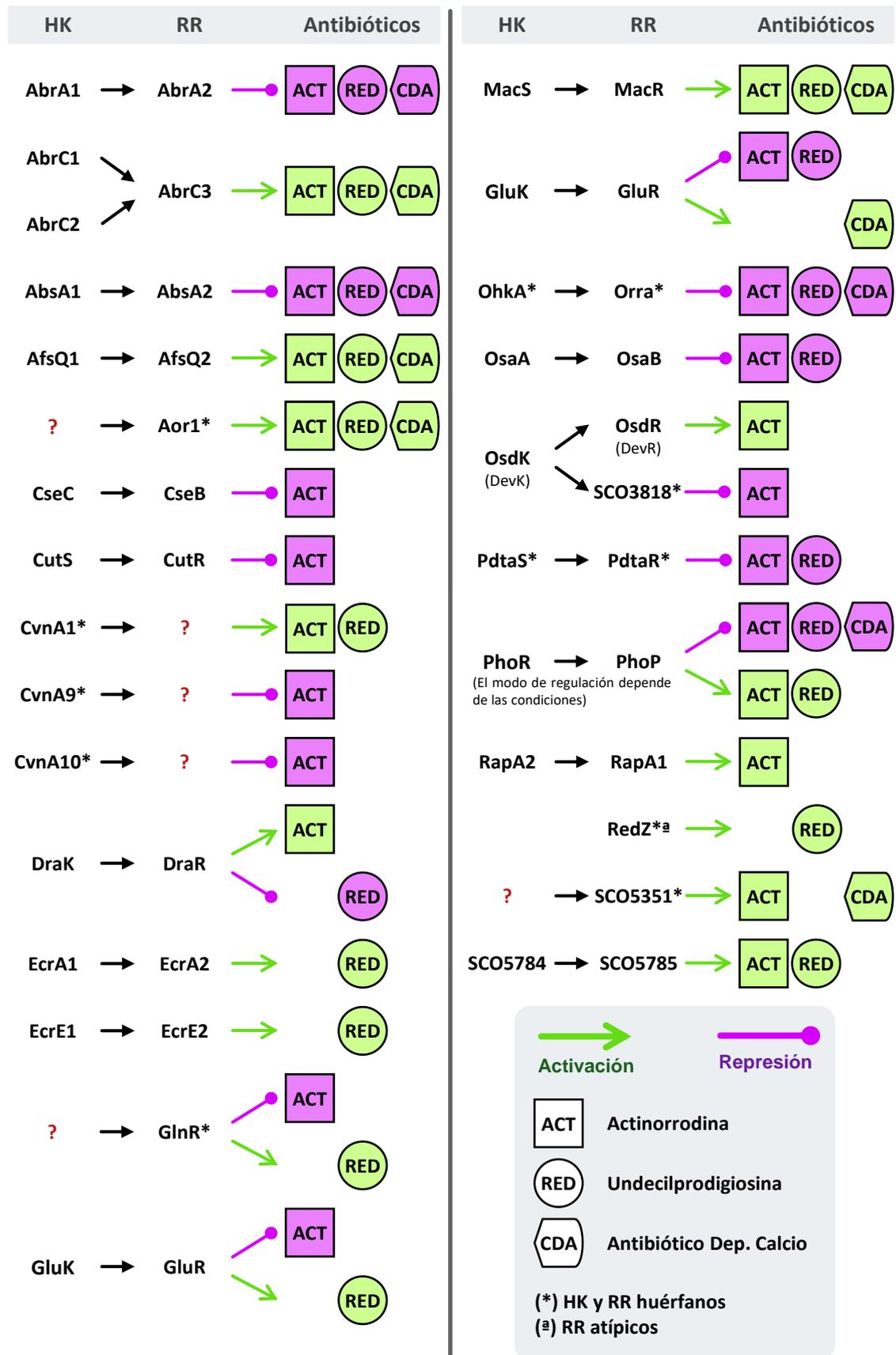


Figura IN.17. Regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* por Sistemas de Dos Componentes.

- **AbrA1/A2 (SCO1744/45).** Este sistema es un regulador negativo de la producción de antibióticos (ACT, RED y CDA) y de la diferenciación morfológica (Yepes et al., 2011); además, presenta una autorregulación positiva (Rico, Yepes, et al., 2014). Se ha propuesto que la señal de activación de AbrA1 es el hierro (Rico, Yepes, et al., 2014). A nivel biotecnológico, la eliminación de este TCS mejora la producción de compuestos heterólogos como la oviedomicina (Rico, Yepes, et al., 2014).
- **AbrC1/C2/C3 (SCO4598/97/96).** Este TCS atípico está formado por dos HK y un RR. se ha descrito como un regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT, RED y CDA) y del proceso de desarrollo morfológico (Rico, Santamaría, et al., 2014; Rodríguez et al., 2015; Yepes et al., 2011). La fusión de las HK AbrC1 y AbrC2 debido a una deleción que abarca parte de la secuencia de ambos genes da lugar a una HK quimérica que ha sido denominada LinR. Esta mutación da lugar a una elevada resistencia a lincomicina, aumenta la producción del antibiótico ACT y potencia la diferenciación morfológica (Wang et al., 2017). A nivel biotecnológico, la expresión del RR AbrC3 en otras especies es capaz de activar BGC crípticos (Becerril et al., 2018).
- **AbsA1/A2 (SCO3225/26).** Este TCS fue uno de los primeros reguladores de la producción de antibióticos descritos en *S. coelicolor* (Adamidis et al., 1990). Este sistema actúa como un regulador negativo de la producción de ACT, RED y CDA (Anderson et al., 1999, 2001; Brian et al., 1996; Lewis et al., 2019; Ryding et al., 2002). Además, presenta una autorregulación positiva (Anderson et al., 2001; Lewis et al., 2019). El potencial biotecnológico de este TCS ha sido demostrado a través de la inducción de actividades antimicrobianas en diferentes estreptomicetos mediante la expresión heteróloga de la HK AbsA1 (McKenzie et al., 2010).

La topología transmembrana de la HK AbsA1 presenta una estructura atípica: muestra cinco dominios transmembrana, cuatro de ellos en el extremo Nt y el restante en el extremo Ct, donde se encuentra el dominio sensor (McKenzie & Nodwell, 2009).

- **AfsQ2/Q1 (SCO4906/07).** Este sistema está implicado en la regulación del metabolismo primario, el metabolismo secundario y el desarrollo morfológico (Chen, Zheng, et al., 2016; Ishizuka et al., 1992; Shu et al., 2009; Wang et al., 2013). Este TCS actúa como un regulador positivo de la síntesis de ACT, RED y CDA, y un regulador negativo del desarrollo morfológico (Shu et al., 2009). La regulación del metabolismo del nitrógeno parece ser clave en la vía de señalización de AfsQ2/Q1, ya que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis en la utilización de nutrientes bajo condiciones de altas concentraciones de glutamato, estableciendo una regulación cruzada con el oRR GlnR (Wang et al., 2013).

## INTRODUCCIÓN

- **Aor1 (SCO2281).** Este oRR actúa como un regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT, RED y CDA) y del proceso de diferenciación morfológica (Antoraz et al., 2017). Además está implicado en la ruta de secreción de proteínas vía el factor sigma SigU y en la respuesta a estrés osmótico a través de la ruta del factor sigma SigB (Antoraz et al., 2017).
- **BldM (SCO4768).** Este oRR actúa como regulador central del desarrollo del micelio aéreo y la diferenciación a través de la ruta del factor sigma de función extracitoplasmática (ECF) BldN (Bibb et al., 2000; Gehring et al., 2004; Molle & Buttner, 2000; Ryding et al., 1999). BldM presenta diferentes mecanismos de acción: por un lado, puede formar homodímeros capaces de regular genes implicados en el desarrollo del micelio aéreo, por otro, puede formar heterodímeros con el oRR Whil que regula un set distinto de genes implicados en la esporulación (*Figura IN.4*) (Al-Bassam et al., 2014).
- **ChiS/R (SCO5378/77).** Este sistema está implicado en la regulación de la enzima quitinasa ChiC en respuesta a la presencia de quitina (Homerová et al., 2002; Kormanec et al., 2000).
- **CseC/B (SCO3359/58).** Este sistema resulta esencial en el mantenimiento de la integridad de la pared celular a través del factor sigma de función extracitoplasmática (ECF) SigE (Hong et al., 2002; Paget, Chamberlin, et al., 1999; Paget, Leibovitz, et al., 1999), y es inducido por antibióticos glucopeptídicos, antibióticos  $\beta$ -lactámicos y lisozimas (Hong, 2016; Hong et al., 2002). Actúa como un regulador negativo de la producción de ACT y un regulador positivo de la esporulación (Paget, Leibovitz, et al., 1999). Además presenta una autorregulación positiva (Paget, Leibovitz, et al., 1999).

La percepción de la señal de activación, que podría ser la acumulación de intermediarios de la síntesis / degradación del peptidoglicano, también involucra a la lipoproteína CseA, que se encuentra anclada a la membrana plasmática y orientada hacia el espacio extracitoplasmático (Hong et al., 2002; Hutchings, Hong, Leibovitz, et al., 2006).

- **CssS/R (SCO4155/56).** Este sistema está implicado en la respuesta a estrés de secreción, que se produce por la acumulación de proteínas mal plegadas en el exterior de la membrana plasmática, que pueden interferir con la maquinaria de secreción. Como respuesta este TCS controla la producción de ciertas proteasas (Gullón et al., 2012).
- **CutS/R (SCO5863/62).** Este sistema actúa como un regulador negativo de la producción del antibiótico ACT (Chang et al., 1996).

- **Cvn (Conservones).** Cuando el genoma de *S. coelicolor* fue descrito (Bentley et al., 2002) se identificaron 13 conservones (Cvn1-13), que presentan una organización similar, consistente en cuatro o cinco genes con unas funciones específicas, de los cuales CvnA es una oHK. Las proteínas de estos sistemas podrían formar complejos proteicos y actuar de forma similar a los receptores acoplados a proteína-G eucariotas (GPCR).
  - CvnA1 (*SCO5544*) es una oHK que actúa como regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT y RED) y del desarrollo del micelio aéreo a través del factor sigma SigU (Takano et al., 2011).
  - CvnA9 (*SCO1630*) es una oHK que actúa como regulador negativo de la producción de ACT y del desarrollo del micelio aéreo (Komatsu et al., 2006).
  - CvnA10 (*SCO1630*) es una oHK que actúa de forma similar a CvnA9, como regulador negativo de la producción de ACT y del desarrollo del micelio aéreo (Komatsu et al., 2006).
- **DraK/R (*SCO3062/63*).** Este sistema es un regulador de la producción de antibióticos, la diferenciación morfológica y el metabolismo primario (Yu et al., 2012, 2014). Actúa como un regulador positivo de la síntesis de ACT y un regulador negativo de la síntesis de RED en condiciones de altos niveles de fuentes de nitrógeno (Yu et al., 2012). Además, este TCS presenta una autorregulación negativa (Yu et al., 2012).

Se ha obtenido la estructura del dominio sensor de la HK DraK (PDB ID: 2MJ6), y su estudio ha revelado que sufre cambios conformacionales dependientes del pH (Yeo et al., 2014; Yeo, Han, et al., 2013; Yeo, Kim, et al., 2013).

- **EcrA1/A2 (*SCO2518/17*).** Este sistema es un regulador positivo del antibiótico RED (Li et al., 2004).
- **EcrE1/E2 (*SCO6421/22*).** Este sistema actúa como un regulador positivo de la producción del antibiótico RED (Wang et al., 2007).
- **GlnR (*SCO4159*).** Este oRR actúa como regulador central del metabolismo del nitrógeno, y es uno de los RR más extensamente estudiados (Amin et al., 2012, 2016; Fink et al., 2002; Li et al., 2018; Lin et al., 2014; Tiffert et al., 2008, 2011; Wang & Zhao, 2009; Wray et al., 1991; Wray & Fisher, 1993; Xu, You, et al., 2017). GlnR presenta una regulación cruzada con otros TCS, como MtrB/A (Zhu et al., 2019), AfsQ2/Q1 (Wang et al., 2013) y PhoR/P (Rodríguez-García et al., 2009; Santos-Beneit et al., 2012; Sola-Landa et al., 2013; Wang et al., 2012), con

## INTRODUCCIÓN

los que compite en la regulación de los genes clave en el metabolismo del nitrógeno, lo cual permite su integración con otros procesos claves como el metabolismo del fosfato.

GlnR es capaz de formar homodímeros en ausencia de fosforilación del residuo de aspartato, estructura que es estabilizada a través de interacciones electrostáticas (Lin et al., 2014). Además, es modificado postraduccionalmente mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina, y la acetilación de residuos de lisina en función de los niveles de nutrientes en el medio, lo que modula su afinidad de unión al DNA (Amin et al., 2016).

- **GluK/R (SCO5779/78).** Este sistema está implicado en la detección y captación de glutamato en condiciones de altos niveles de este compuesto, de hecho, se ha identificado como su señal de activación (Li et al., 2017). Además, este TCS actúa como regulador negativo de la producción de ACT, y regulador positivo de la producción de RED, aunque su papel en la regulación de la síntesis de antibióticos es independiente de su función en la captación de glutamato (Li et al., 2017).
- **MacSR (SCO2121/20).** Este sistema es un regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT, RED y CDA) y un regulador negativo de la diferenciación morfológica (Liu, Zhang, et al., 2019; Liu et al., 2021).
- **MtrB/A (SCO3012/13).** Este sistema es un regulador positivo de la morfogénesis (Zhang et al., 2017), un regulador negativo de la síntesis de ACT y RED, así como un regulador positivo de la producción de CDA (Som et al., 2017; Zhu et al., 2020). Este TCS también está implicado en el metabolismo del nitrógeno y del fosfato, y presenta una regulación cruzada con GlnR y PhoR/P, reguladores centrales de estos procesos (Zhu et al., 2021).
- **OhkA (SCO1596) y OrrA (SCO3008).** La oHK OhkA y el oRR OrrA están asociados a nivel funcional (Zheng et al., 2021). Actúan como reguladores negativos de la producción de antibióticos (ACT, RED y CDA) y reguladores positivos de la formación del micelio aéreo y el proceso de esporulación (Liu et al., 2017; Lu et al., 2011).
- **OsaA/B (SCO5748/49).** Este sistema está implicado en la respuesta a estrés osmótico, ya que el RR OsaB es requerido para la osmoadaptación necesaria durante el proceso de diferenciación. Además, actúa como regulador negativo de la síntesis de ACT y RED (Bishop et al., 2004).

Estas proteínas presentan una arquitectura atípica. OsaA es una hHK que presenta un dominio REC, además contiene más de diez dominios HAMP. En el caso de del RR OsaB, su

dominio efector no pertenece a ninguna de las familias canónicas; posee una estructura de hélice superenrollada (*coiled-coil*) que se cree podría interactuar con motivos similares de otras proteínas.

- **OsdK/R (SCO0203/04).** Este sistema ha recibido dos denominaciones en la literatura: OsdK/R (Fischer et al., 2019; Urem et al., 2016) y DevS/R (Honma et al., 2021; Sasaki et al., 2016). Este TCS controla un regulón asociado a un estado de dormancia, que incluye genes relacionados con la respuesta a estrés y el desarrollo (Urem et al., 2016), y participa en el ciclo del óxido nítrico (Sasaki et al., 2016). Además, este sistema actúa como regulador positivo de la producción de ACT (Honma et al., 2021).

La HK OsdK también es capaz de fosforilar al oRR SCO3818. Esta vía de señalización regula negativamente la producción de ACT (Wang, Shu, et al., 2009).

- **PdtaS (SCO5239) y PdtaR (SCO2013).** La oHK PdtaS y el oRR PdtaR están asociados a nivel funcional (Li, Zhao, et al., 2020). Actúan como reguladores negativos de la producción de antibióticos (ACT y RED), y reguladores positivos del proceso de diferenciación (Li, Zhao, et al., 2020; Zhao et al., 2018).

El oRR PdtaR presenta un dominio efector perteneciente a la familia ANTAR, que actúa como regulador del RNA.

- **PhoR/P (SCO4229/30).** Este sistema actúa como regulador central del metabolismo del fosfato, y es uno de los TCS más extensamente estudiados. En condiciones limitantes de fosfato, este TCS bloquea gran parte del metabolismo primario, del metabolismo secundario y el proceso de morfogénesis, hasta recuperar niveles de fosfato que soporten el crecimiento y funcionamiento del organismo (Allenby et al., 2012; Apel et al., 2007; Fernández-Martínez et al., 2012; Lejeune et al., 2021; Martín-Martín et al., 2017; Millan-Oropeza et al., 2020; Rodríguez-García et al., 2007, 2009; Santos-Beneit et al., 2012; Santos-Beneit, Barriuso-Iglesias, et al., 2011; Santos-Beneit, Rodríguez-García, et al., 2011; Santos-Beneit et al., 2008, 2009; Sola-Landa et al., 2003, 2005, 2008, 2013; Thomas et al., 2012; Wang et al., 2012). La implicación de PhoR/P en todos estos procesos celulares es posible, al menos en parte, a la regulación cruzada con otros TCS, como GlnR (Rodríguez-García et al., 2009; Santos-Beneit et al., 2012; Sola-Landa et al., 2013; Wang et al., 2012).

Este TCS presenta dos sistemas de autorregulación, por un lado actúa como inductor de su propio operón (Fernández-Martínez et al., 2012; Sola-Landa et al., 2005), por otro, activa a PhoU, que actúa como regulador negativo del regulón PHO (Martín-Martín et al., 2017).

## INTRODUCCIÓN

- **RagK/R (SCO4073/72).** Este sistema participa en los procesos de desarrollo del micelio aéreo y esporulación (San Paolo et al., 2006). Se ha propuesto que este TCS constituye una ruta de desarrollo independiente de SapB, que permite la integración de diversos cambios morfogénicos (San Paolo et al., 2006).
- **RamR (SCO6685).** Este oRR actúa como un regulador central del proceso de morfogénesis (Nguyen et al., 2002; O'Connor et al., 2002). RamR se encuentra dentro de la ruta de señalización *bld* del proceso de desarrollo, y actúa como regulador de SapB, un péptido morfogénico que interviene como surfactante en el desarrollo del micelio aéreo (*Figura IN.4*) (Nguyen et al., 2002; O'Connor et al., 2002).
- **RapA2/A1 (SCO5404/03).** Este sistema actúa como regulador positivo del antibiótico ACT (Lu et al., 2007).
- **RedZ (SCO5881).** Este oRR forma parte del BGC *red*, y actúa junto con RedD como CSR. RedZ actúa como regulador positivo de RedD, que a su vez activa los genes biosintéticos del clúster *red* y por tanto la producción del antibiótico RED; además RedZ presenta una autorregulación negativa (White & Bibb, 1997). El gen *redZ* contiene el codón TTA, por lo que es regulado por el tRNA BldA de forma dependiente al proceso de desarrollo (Guthrie et al., 1998; White & Bibb, 1997).

A nivel estructural, RedZ es un RR atípico, que carece del sitio de fosforilación del dominio REC (Guthrie et al., 1998). El mecanismo de control alternativo parece estar dado por su interacción con la molécula del antibiótico RED, producto final de su ruta de señalización (Wang, Tian, et al., 2009).

- **SatK/R (SCO3390/89).** Este sistema actúa como un regulador del proceso de esporulación a través del control de los clústeres hipersensibles a superenrollamiento (Gongerowska-Jac et al., 2021).
- **SenS/R (SCO4275/76).** Este sistema está implicado en la respuesta no enzimática a estrés oxidativo (Busche et al., 2016). Este TCS actúa en conjunto con HbpS, una proteína secretada, y su ruta de señalización parece ser modulada por modificaciones postraduccionales debidas a estrés redox (Busche et al., 2016).
- **SitK/R (SCO4667/68).** Este sistema fue descrito de forma paralela al TCS SatKR, ya que forma parte de los clústeres hipersensibles a superenrollamiento y está involucrado en la inhibición de la esporulación (Gongerowska-Jac et al., 2021).

- **VanS/R (SCO3589/90).** Este sistema controla la resistencia al antibiótico vancomicina (Hong et al., 2004), y es uno de los TCS mejor caracterizados en *S. coelicolor*. El clúster de resistencia a vancomicina está formado por siete genes: *vanSRJKHAX* (SCO3589/90; SCO3592-96), y está regulado positivamente por el TCS VanSR que forma parte del mismo (Hong et al., 2004). La señal de activación de VanS es la propia molécula de vancomicina, que debe encontrarse unida al precursor del peptidoglicano Lípido II (Hutchings, Hong, & Buttner, 2006; Koteva et al., 2010; Kwun et al., 2013; Lockey et al., 2020; Novotna et al., 2016). Recientemente se ha conseguido obtener la estructura del RR VanR, tanto en su forma inactiva (PDB ID: 7LZ9) como en su forma activa (PDB ID: 7LZA) (Maclunas et al., 2021).
- **Whil (SCO6029).** Este oRR juega un papel clave en el proceso de septación del micelio aéreo requerido para la esporulación, así como en la maduración de las esporas (Figura IN.4) (Chater, 1972, 1975; Tian et al., 2007; Zhang et al., 2012). Whil es regulado por el factor sigma específico de esporulación WhiG; además, presenta una autorregulación negativa (Aínsa et al., 1999). Este oRR puede formar heterodímeros funcionales con el oRR BldM, lo que permite integrar los procesos de desarrollo del micelio aéreo y la esporulación (Al-Bassam et al., 2014).

A nivel estructural cabe destacar que es un RR atípico, y carece del sitio de fosforilación del dominio REC (Aínsa et al., 1999; Tian et al., 2007).

- **SCO5282/83.** Este sistema está implicado procesos relacionados con el metabolismo extracelular, como la secreción de proteínas o el metabolismo de las envueltas celulares entre otros (Arroyo-Pérez et al., 2019). Ciertas mutaciones en la HK dan lugar a cambios morfológicos significativos en medio líquido, que son favorables para su crecimiento en fermentadores industriales (Arroyo-Pérez et al., 2019).
- **SCO5351.** Este oRR actúa como un regulador positivo de la producción de antibióticos (ACT y CDA) y del proceso de desarrollo del micelio aéreo y la esporulación (Lu et al., 2018).
- **SCO5784/85.** Este sistema actúa como un regulador positivo de la producción de los antibióticos ACT y RED, del proceso de esporulación y de las proteínas secretadas (Rozas et al., 2012).

Como se puede ver, los TCS de *S. coelicolor* actúan como pilares fundamentales en la integración y coordinación de la síntesis de antibióticos con el resto de procesos celulares. A pesar de todas las investigaciones realizadas en esta área, aún quedan muchos sistemas por estudiar que nos pueden ayudar a desentrañar la compleja red de regulación de este organismo.





# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La rápida aparición y propagación de bacterias patógenas resistentes a todos los antibióticos utilizados por el ser humano es una seria amenaza sanitaria, social y económica. El descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos para hacerles frente es prioritario, y las bacterias del género *Streptomyces* juegan un papel esencial por su capacidad de sintetizar una miríada de compuestos con actividades de interés biomédico.

El estudio de los sistemas de regulación implicados en la producción de antibióticos en organismos modelo como *S. coelicolor* ofrece muchas posibilidades. Comprender los mecanismos mediante los que estas bacterias modulan la síntesis de antibióticos, así como su papel fisiológico, es esencial para su aplicación biotecnológica en el resto de estreptomicetos. Además, la manipulación de estas redes de regulación puede ser empleada para la obtención de cepas hospedadoras optimizadas, que permitan la expresión heteróloga de BGC crípticos y/o silentes de otros microorganismos que no sean capaces de crecer adecuadamente en condiciones de laboratorio, o que no sean fácilmente manipulables a nivel genético.

Los TCS constituyen uno de los principales sistemas de transducción de señales, y ejercen un papel clave en el control de la producción de antibióticos y en su integración con el resto de procesos celulares en respuesta a las condiciones ambientales. Esto ha suscitado el interés de nuestro grupo de investigación por su estudio y caracterización, lo que ha dado lugar a la identificación y estudio de los sistemas AbrA1/A2, AbrC1/C2/C3 y del oRR Aor1 durante los últimos años (Antoraz et al., 2017; Becerril et al., 2018; Rico, Santamaría, et al., 2014; Rico, Yepes, et al., 2014; Rodríguez et al., 2015; Yepes et al., 2011). Al margen de su implicación en otros procesos celulares, el primero es un regulador negativo de los antibióticos endógenos ACT, RED y CDA, y ha sido utilizado con éxito en la mejora de la producción heteróloga de compuestos de interés; mientras que los dos últimos actúan como reguladores positivos en la síntesis de ACT, RED y CDA, y en el caso de AbrC3, ha sido utilizado con éxito en la activación de BGC crípticos en otros organismos. Durante la presente Tesis Doctoral se decidió profundizar en el estudio de uno de estos sistemas, el oRR Aor1, que parece ejercer un papel central en la fisiología de *S. coelicolor*.

A pesar de que la compleja red de regulación de *S. coelicolor* ha sido extensamente estudiada aún queda mucho por desvelar. Aproximadamente dos tercios de los TCS de este organismo todavía no han sido descritos, por lo que su identificación y análisis es imprescindible para poder llegar a entender su comportamiento, lo cual representa un gran interés a nivel biotecnológico. Durante la presente Tesis Doctoral se decidió caracterizar el TCS *SCO2165/66* (se ha denominado

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

*abrB1/B2*), que podría estar implicado en el control de la producción de antibióticos, en base a resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación.

Aunque se han desarrollado múltiples metodologías para estudiar los TCS, algunas etapas de su mecanismo molecular de acción aún representan un serio obstáculo para la investigación, como por ejemplo, la activación de estos sistemas. Identificar los estímulos que detectan las HK y desencadenan las cascadas de señalización resulta esencial para establecer el papel fisiológico que cumplen los TCS, y por tanto, para su manipulación y aplicación biotecnológica. Por lo tanto, durante la presente Tesis Doctoral se decidió diseñar y construir una herramienta que permitiera identificar las señales de activación de las HK en los estreptomicetos.

Teniendo todo esto en cuenta, los **objetivos** de este trabajo fueron:

1. Caracterizar el papel fisiológico del Sistema de Dos Componentes *SCO2165/66* (*abrB1/B2*) de *Streptomyces coelicolor* y su implicación en la producción de antibióticos.
2. Identificar los genes diana del Regulador de Respuesta huérfano Aor1 (*SCO2281*) de *Streptomyces coelicolor*.
3. Diseñar y construir una plataforma para la identificación de las señales de activación de las Histidina Quinasas en *Streptomyces*.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



# CAPÍTULO 1

## El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

Los TCS implicados en la producción de antibióticos en *S. coelicolor* han sido, desde hace varios años, uno de los principales intereses de nuestro grupo de investigación. Los genes *SCO2165/66* codifican un potencial sistema de dos componentes que presenta similitud a nivel de secuencia con el sistema AbsA1/A2, uno de los primeros reguladores de la producción de antibióticos descritos en *S. coelicolor* (Adamidis et al., 1990), por lo que se seleccionó para su mutación y análisis (Yepes, 2006). Se construyó una cepa mutante mediante la tecnología REDIRECT (Gust et al., 2003) en la que se reemplazaron los genes *SCO2165/66* (que se denominaron *abrB1/B2*) con el casete de resistencia a apramicina *aac3-IV*. Sin embargo, en las diferentes aproximaciones que se realizaron para su análisis (Minatelli, 2015; Sanz, 2014; Yepes, 2006) se observó una excesiva variabilidad en el comportamiento fenotípico de la cepa, tanto en términos de crecimiento y diferenciación morfológica como en términos de producción de antibióticos, lo que podría ser debido a que no se realizó una deleción limpia de los genes. Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió generar una nueva cepa mutante de este sistema mediante la tecnología CRISPR-Cas9 (Tong et al., 2015), y se procedió a su análisis detallado *in silico*, fenotípico, transcripcional y transcriptómico para determinar el papel fisiológico de este sistema de dos componentes, con especial énfasis en su implicación en la regulación de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, de cara a su potencial aplicación biotecnológica.

En este capítulo se desarrollará el *Objetivo 1*: “**Caracterizar el papel fisiológico del Sistema de Dos Componentes *SCO2165/66* (*abrB1/B2*) de *Streptomyces coelicolor* y su implicación en la producción de antibióticos**”.

### C1.1 - Análisis *in silico* de AbrB1/B2

Como primer paso en el estudio detallado de este sistema se procedió al análisis *in silico* de cada uno de sus componentes, tanto a nivel génico como proteico. La búsqueda y análisis de las secuencias génicas y proteicas, el análisis de dominios proteicos, el análisis de la topología proteica y la predicción de la estructura secundaria proteica se realizó con las bases de datos y programas recogidos en el apartado “[MM.12 - Bioinformática](#)”.

AbrB1/B2 es un TCS canónico, formado por un RR codificado por el gen *SCO2165* al que denominamos *abrB1*, y una HK codificada por el gen *SCO2166* a la que denominamos *abrB2*. La

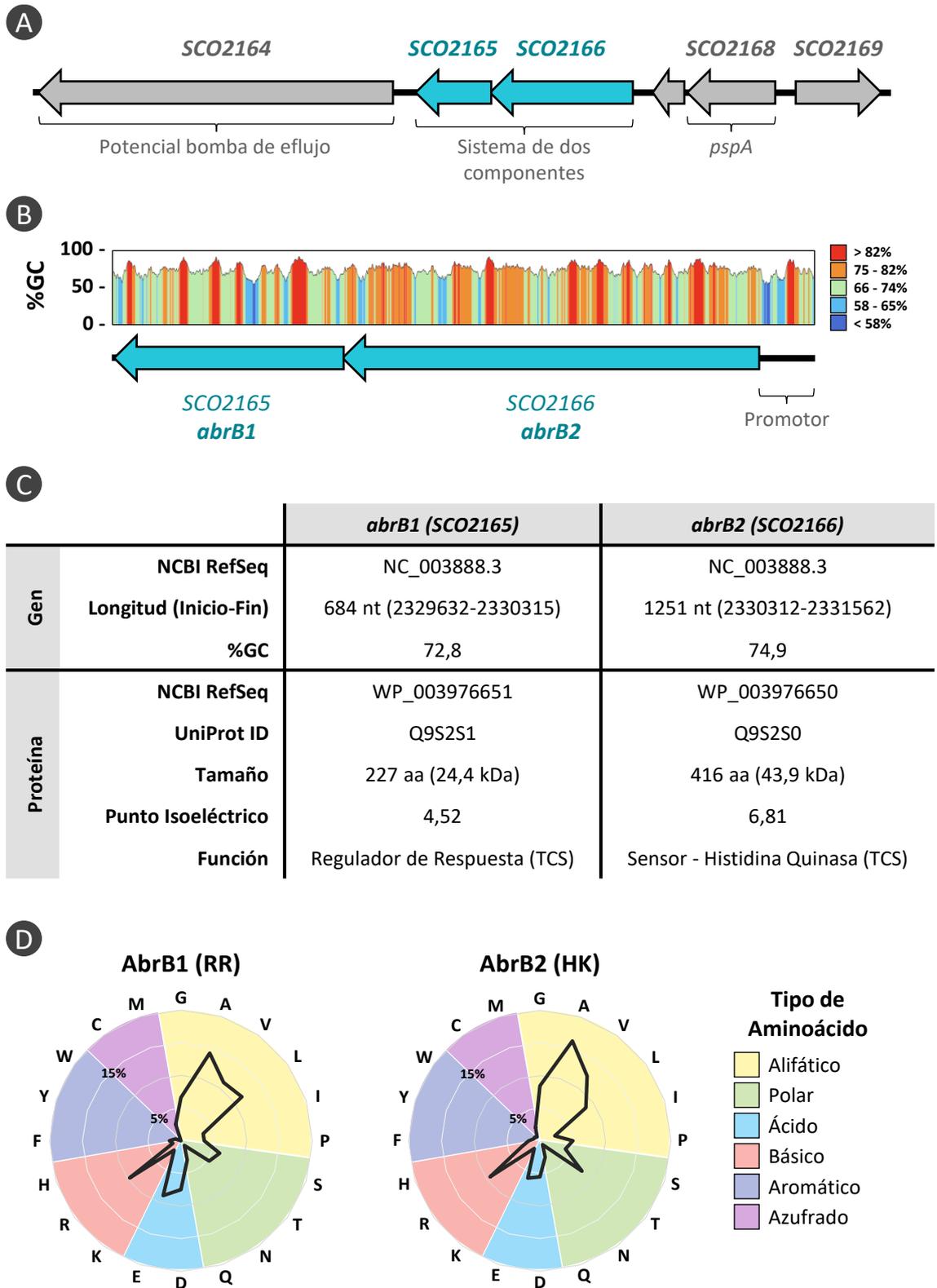
## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

secuencia codificante de dichos genes solapa en cuatro nucleótidos y parece formar un operón, como es habitual en este tipo de sistemas de regulación. Las características generales génicas y proteicas se detallan en la *Figura C1.1*.

El RR AbrB1 es una proteína de 227 aminoácidos (24,4 kDa) que presenta un dominio receptor REC (aa 3-119) que contiene el sitio de fosforilación (Asp55) y presenta una topología típica ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub>; y un dominio de unión a DNA HTH-LuxR (aa 162-218), perteneciente a la familia NarL. La HK AbrB2 es una proteína de 416 aminoácidos (43,9 kDa) que presenta tres regiones transmembrana (aa 21-36, 46-48, 120-142), un dominio extracelular de recepción de la señal (aa 69-119) entre la segunda y tercera región transmembrana, un dominio de dimerización HisKA3 (aa 193-261) que contiene el sitio de fosforilación (His203), y un dominio HATPase-c (aa 286-399). El análisis de dominios, estructura secundaria y topología se detalla en la *Figura C1.2*.

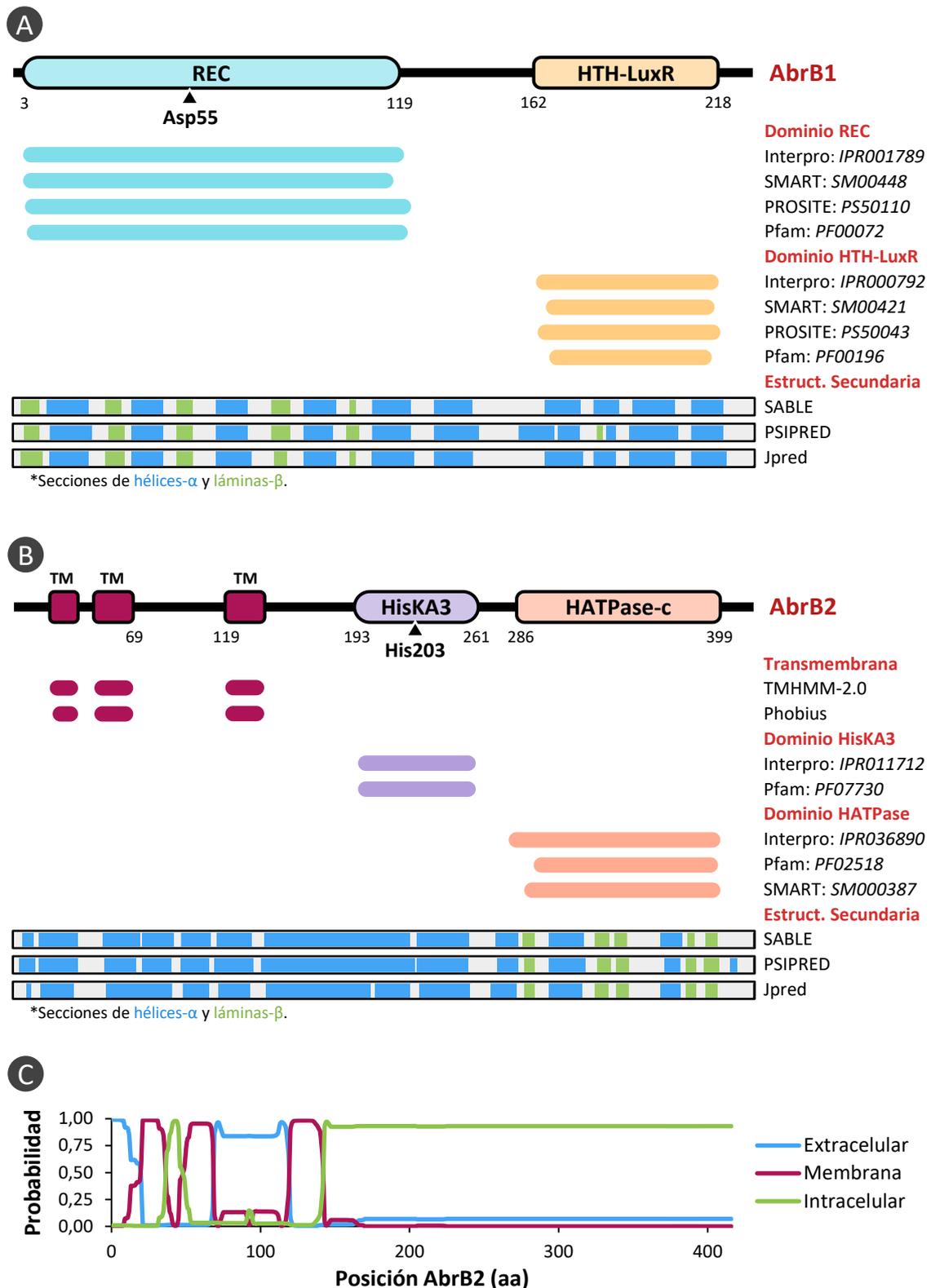
En términos de ontología génica, AbrB1 se encuadra en los procesos biológicos de transducción de señales vía fosfato (GO:0000160) y regulación de la transcripción (GO:0006355), con una función molecular de unión a DNA (GO:0003677). Por otro lado, AbrB2 se enmarca en el proceso biológico de transducción de señales vía fosfato (GO:0000160), se localiza como componente integral de la membrana plasmática (GO:0016021) y con unas funciones moleculares de sensor con actividad quinasa (GO:0000155) y actividad de dimerización proteica (GO:0046983).

El sistema AbrB1/B2 se encuentra altamente conservado en multitud de especies bacterianas más o menos cercanas a nivel filogenético, especialmente en el caso del RR AbrB1. Se encontraron homólogos en especies pertenecientes a otros filos bacterianos, como *Dehalobacter sp. FTH1* (filo *Firmicutes*) o *Microbulbifer variabilis* (filo *Proteobacteria*), con una similitud a nivel de secuencia proteica del 67,2% y 65,5% respectivamente en el caso de los RR (*Figura C1.3.A*). Dentro del género *Streptomyces*, el nivel de conservación de este sistema es extremadamente alto; el promedio de similitud a nivel de secuencia proteica en 22 especies analizadas es del 90,5% para el RR y del 78,8% para la HK (*Figura C1.3.B*). Este grado de conservación no solo se observa en términos de secuencia proteica, sino que también se puede apreciar en el contexto genómico, ya que los genes adyacentes también se encuentran conservados y presentan una distribución idéntica (*Figura C1.3.C*).



**Figura C1.1. Análisis in silico de AbrB1/B2: características generales. [A]** Contexto genómico de *abrB1/B2* en *S. coelicolor*. **[B]** Contenido en GC de los genes *abrB1/B2* y su secuencia promotora. **[C]** Características del sistema AbrB1/B2. **[D]** Composición de aminoácidos del RR AbrB1 y la HK AbrB2.

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**Figura C1.2.** Análisis *in silico* de AbrB1/B2: dominios, estructura secundaria y topología. **[A]** Predicción de dominios y estructura secundaria del RR AbrB1 en diversas bases de datos. Se indica el sitio de fosforilación (Asp55) **[B]** Predicción de dominios y estructura secundaria de la HK AbrB2 en diversas bases de datos. Se indica el sitio de fosforilación (His203). **[C]** Análisis topológico de AbrB2 realizado con TMHMM-2.0.

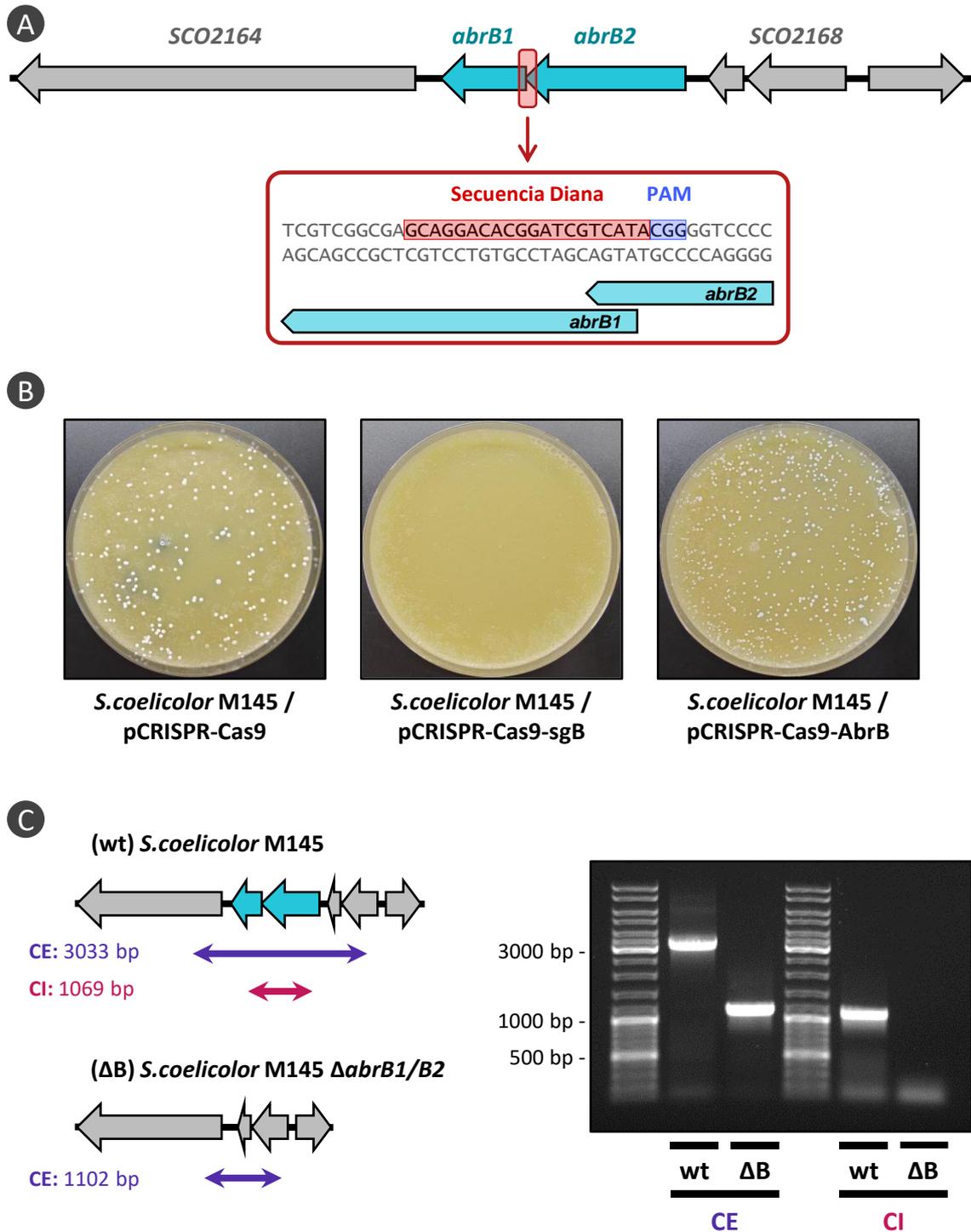


### C1.2 - Construcción de la cepa *Streptomyces coelicolor* M145 $\Delta$ abrB1/B2

La cepa carente del sistema AbrB1/B2 que se había generado previamente en el laboratorio para el estudio de este sistema de regulación no era adecuada ya que presentaba un comportamiento fenotípico excesivamente variable. Esto podría ser debido a que en esta cepa no se realizó una deleción limpia de los genes *abrB1/B2*, sino que se reemplazaron por el casete de resistencia a apramicina *aac3-IV*. Por ello, se decidió generar una nueva cepa mutante mediante la tecnología CRISPR-Cas9 (Tong et al., 2015).

La deleción de genes mediante esta tecnología requiere tres elementos clave: una endonucleasa de DNA (Cas9), una molécula de RNA (sgRNA) que recluta a la enzima Cas9 y la dirige a una secuencia específica donde se realizará el corte, y una secuencia molde que permite la reparación de la rotura mediante recombinación homóloga (se emplean las regiones adyacentes a los genes a deleccionar). Se diseñó un sgRNA para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra los genes *abrB1/B2* (Figura C1.4.A); y se construyeron los plásmidos pCRISPR-Cas9-sgB, que contiene la enzima Cas9 y la secuencia codificante para el sgRNA diseñado contra *abrB1/B2*, y el plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB, que además de lo anterior también incluye un molde para la recombinación homóloga con las regiones adyacentes (tanto a 5' como a 3') de los genes *abrB1/B2* (los detalles se indican en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”).

Se introdujeron los plásmidos pCRISPR-Cas9, pCRISPR-Cas9-sgB y pCRISPR-Cas9-AbrB en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 por conjugación interespecífica a través de *E. coli* ET12567 / pUZ8002 (Figura C1.4.B). Se comprobó que el sistema CRISPR funcionaba correctamente, ya que no se obtuvieron colonias al introducir el plásmido pCRISPR-Cas9-sgB; esto es debido a que la enzima Cas9 produce un corte en el genoma guiada por el sgRNA que, en este caso, no puede ser reparado debido a la ausencia de un molde de recombinación homóloga (además, *S. coelicolor* carece de un sistema de reparación de extremos no homólogos). Al introducir el plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB, sí se obtuvieron colonias, ya que en este caso sí se incluyen las regiones adyacentes a *abrB1/B2* en el plásmido como molde, por lo que en estas colonias tuvo lugar la deleción de *abrB1/B2* durante la reparación por recombinación homóloga. Se seleccionaron varias de estas colonias y se llevó a cabo la eliminación del plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB (plásmido termosensible). Posteriormente se obtuvo DNA genómico de varios clones y se comprobó por PCR que los genes *abrB1/B2* habían sido correctamente deleccionados (Figura C1.4.C). Los detalles del proceso de construcción de esta cepa se indican en el apartado “MM.8 - Edición genómica mediante CRISPR-Cas9”.



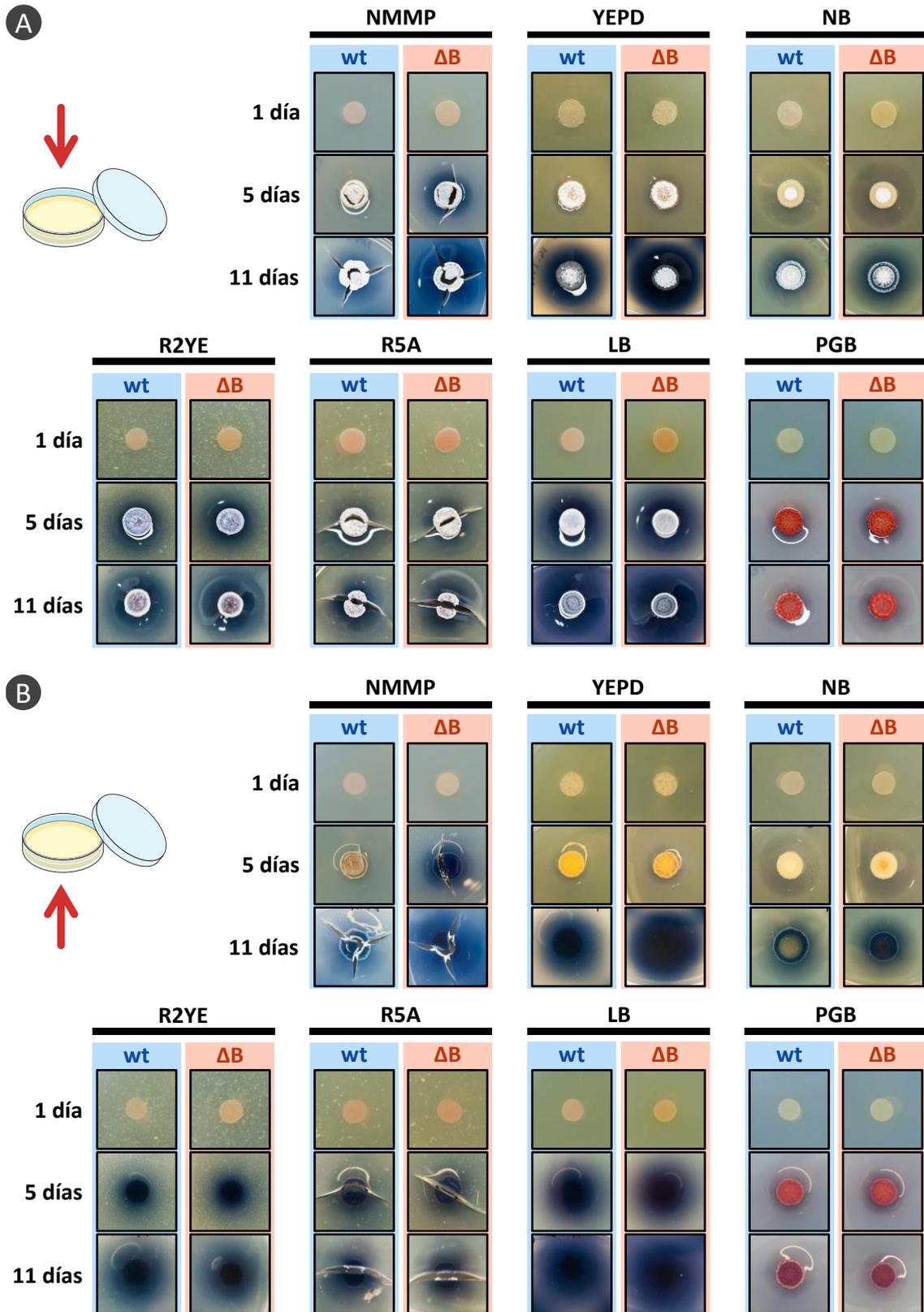
**Figura C1.4. Delección de los genes *abrB1/B2* mediante CRISPR-Cas9.** [A] Secuencia diana seleccionada para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra los genes *abrB1/B2*. [B] Placas resultantes de la introducción en la cepa *S. coelicolor* M145 de los plásmidos pCRISPR-Cas9 (plásmido control vacío), pCRISPR-Cas9-sgB (control de corte; codifica el sgRNA y la enzima Cas9) y pCRISPR-Cas9-AbrB (codifica el sgRNA y la enzima Cas9, y contiene el molde para la reparación por recombinación homóloga) por conjugación interespecífica. [C] Comprobación de la delección de los genes *abrB1/B2* mediante PCR. Se utilizan tanto oligonucleótidos externos (CE: RCD-005 / RCD-006) como internos (CI: RCD-007 / RCD-008) a la zona delecionada. En el esquema se indica el tamaño esperado para los fragmentos amplificados por PCR en la cepa *S. coelicolor* M145 (wt) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrB1/B2* ( $\Delta B$ ).

### C1.3 - Análisis fenotípico del mutante $\Delta abrB1/B2$

El fenotipo de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  se analizó comparándolo con el de la cepa silvestre en múltiples medios de cultivo: NMMP, YEPD, NB, R2YE, R5A, LB y PGB (Figura C1.5). No se observaron diferencias relativas al desarrollo y diferenciación morfológica (desarrollo de micelio aéreo y esporulación) en ninguno de los medios analizados. Sin embargo, sí se observó un aumento en la producción del antibiótico ACT (halo azul mayor y/o más intenso alrededor de las colonias) en la cepa mutante en comparación con la silvestre en los medios NMMP, YEPD y NB. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el medio NMMP para continuar el estudio del sistema AbrB1/B2 y es el que se usó en todos los ensayos y análisis posteriores. ACT es un antibiótico activo frente a bacterias Gram-Positivas, por lo que se realizó un ensayo de antibiosis contra *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis* (Figura C1.6.A). De forma acorde a la mayor producción de ACT observada, la cepa carente del sistema AbrB1/B2 produce un mayor halo de inhibición frente a éstas en comparación a la cepa silvestre.

Paralelamente se realizaron ensayos de complementación y sobreexpresión para comprobar si las diferencias fenotípicas observadas en la cepa mutante eran consecuencia de la eliminación del sistema de dos componentes AbrB1/B2, o se debían a efectos polares o cortes inespecíficos que pudieran haber tenido lugar durante la obtención de la cepa mutante mediante CRISPR-Cas9. Por un lado, la introducción del plásmido integrativo pKCAbrB (incluye los genes *abrB1/B2* bajo el control de su propio promotor) complementa el fenotipo, eliminando el incremento en la producción de ACT observado en la cepa  $\Delta abrB1/B2$  (Figura C1.6.B). Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *abrB1/B2* a través del plásmido multicopia pNAbrB (los genes *abrB1/B2* se encuentran bajo el control de su propio promotor) en la cepa silvestre disminuye la producción de antibióticos (Figura C1.6.C). Por lo tanto, estos resultados confirman que el fenotipo observado en la cepa mutante se debe a la delección de *abrB1/B2*.

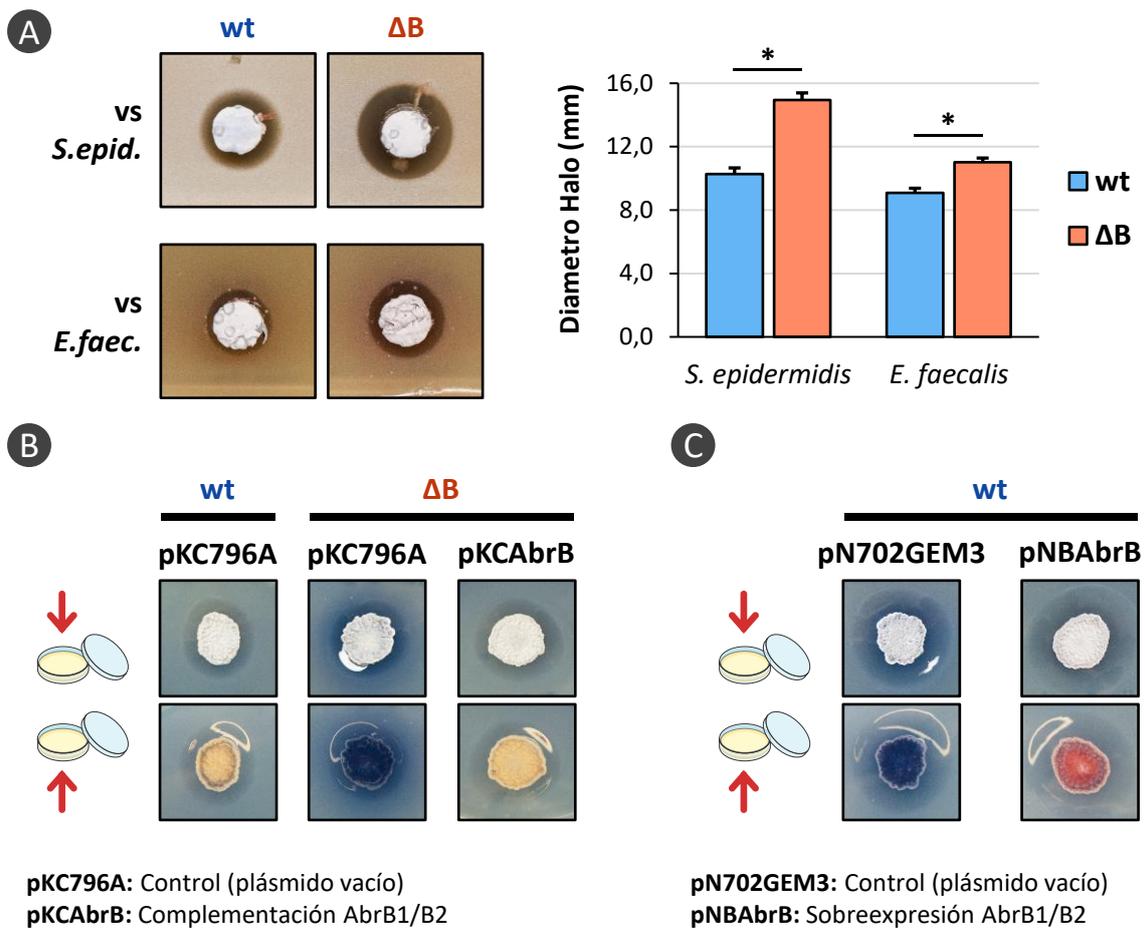
Para un análisis fenotípico más detallado, se realizó una curva de crecimiento de las cepas silvestre y  $\Delta abrB1/B2$  donde se monitorizó la germinación de las esporas, el desarrollo del micelio a nivel microscópico, la biomasa de los cultivos y la producción de los antibióticos ACT y RED (Figura C1.7). En las condiciones de cultivo ensayadas no se observaron diferencias entre ambas cepas en cuanto al tiempo de germinación (8 horas) ni en términos de crecimiento; no se encontraron diferencias significativas entre ambas curvas de crecimiento cuando se analizan con un test de permutación CGGC (Elsó et al., 2004). Sin embargo, sí se observa un incremento significativo de la producción tanto de RED como de ACT en la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  en comparación a la cepa silvestre.



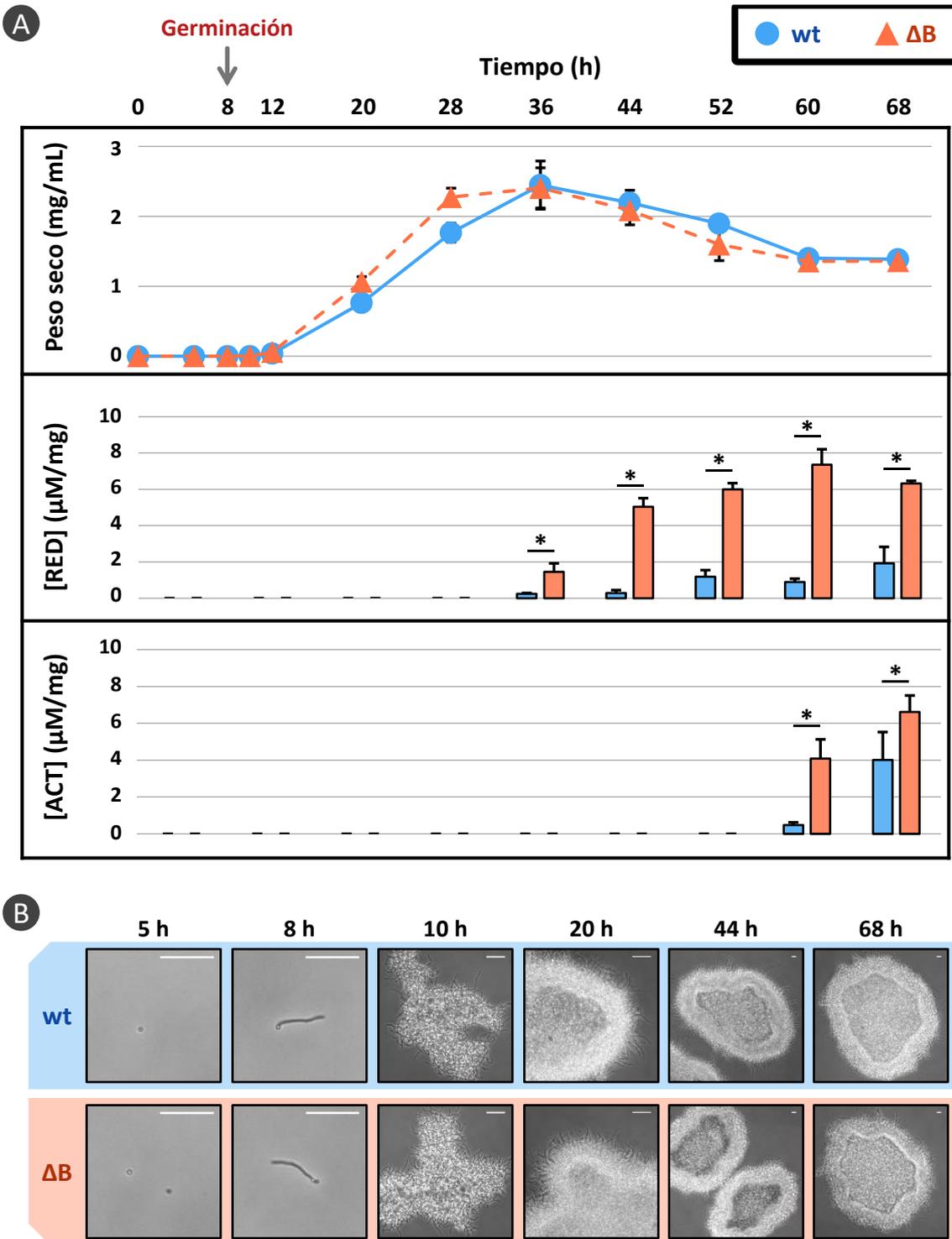
**Figura C1.5.** Análisis fenotípico del mutante  $\Delta abrB1/B2$ : comportamiento en diferentes medios de cultivo. Comparación de la producción de actinorrodina (halo azul alrededor de las colonias) y del proceso de diferenciación en las cepas *S. coelicolor* M145 (wt) y *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) a diferentes tiempos de cultivo (1, 5 y 11 días) y en diferentes medios sólidos (NMMP, YEPD, NB, R2YE, R5A, LB y PGB). Se muestran fotografías de la parte superior de las placas [A], así como de la parte inferior [B].

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

Finalmente se estudió si la eliminación del sistema de dos componentes AbrB1/B2 en *S. coelicolor* M145 induce la producción de compuestos con actividad antibiótica frente a Gram- o actividad antifúngica. Para ello, se realizó un ensayo de antibiosis frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter aerogenes* y *Acinetobacter baylyi*; así como frente a los hongos fitopatógenos *Phytophthora cactorum*, *Phoma exigua*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* (Figura C1.8). No se observó halo de inhibición en ninguno de los casos, a excepción de *P. putida*, donde apareció un pequeño halo difuso al enfrentarla a la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$ .

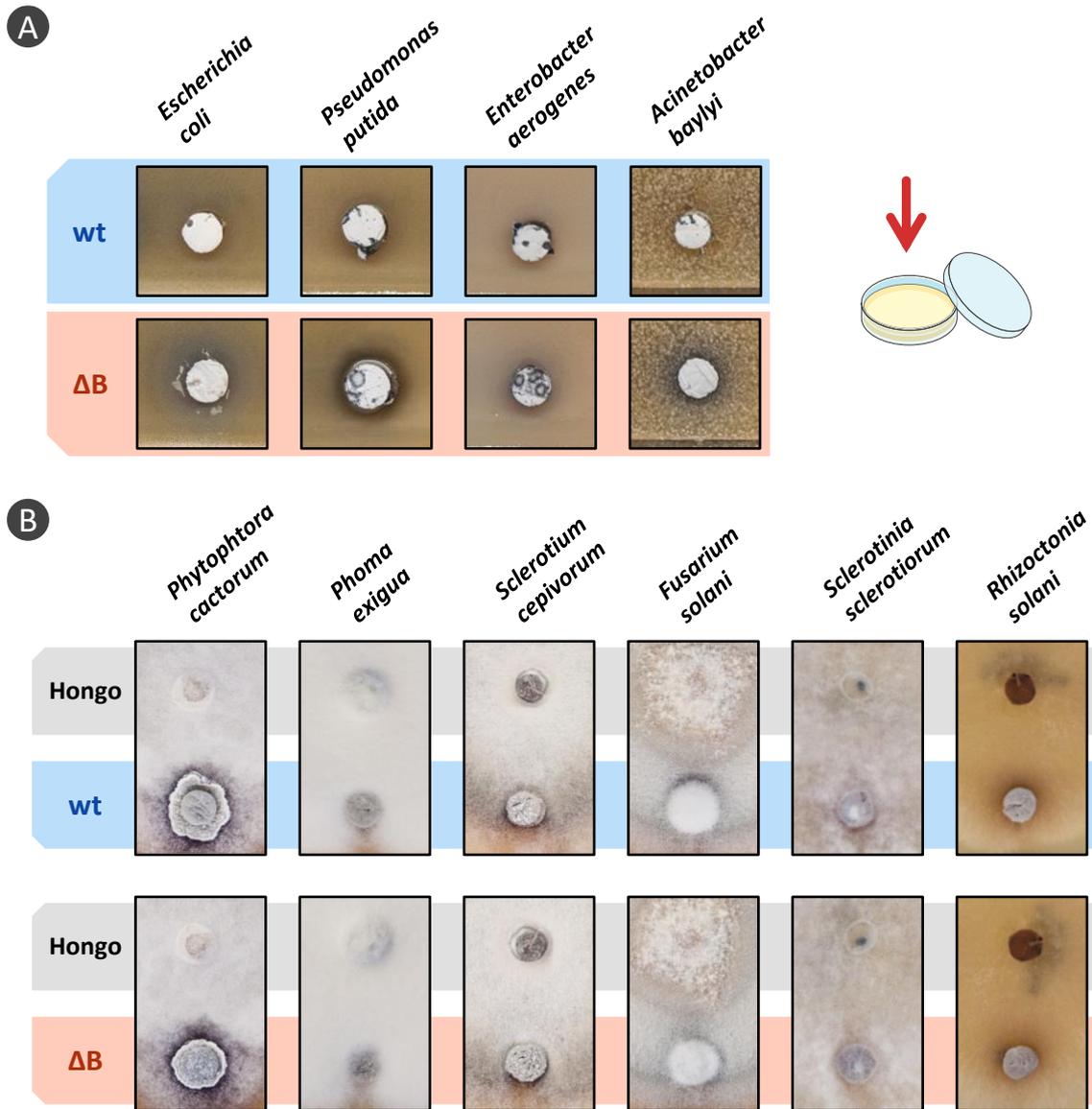


**Figura C1.6. Análisis fenotípico de AbrB1/B2: ensayos de antibiosis (bacterias Gram-Positivas), complementación y sobreexpresión. [A]** Ensayo de antibiosis: efecto inhibitorio de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (wt) y la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) (cultivadas en medio NMMP) en el crecimiento de un césped de las bacterias Gram-Positivas *Staphylococcus epidermidis* (*S. epid.*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faec.*). Se incluyen fotografías de la parte superior de las placas, así como la comparación de los halos de inhibición generados en cada caso (las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas). \*Significación estadística: valor  $p < 0,05$  [B] Complementación de la producción de actinorrodina en la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  / pKCAbrB en medio NMMP tras 5 días de cultivo. Como control se incluyen las cepas silvestre (wt) y mutante ( $\Delta B$ ) con el plásmido vacío pKC796A. Se muestran fotografías de la parte superior e inferior de las placas. [C] Sobreexpresión de los genes *abrB1/B2* (plásmido pNBAbrB) en la cepa silvestre (wt) en medio NMMP tras 10 días de cultivo. Como control se incluye la cepa silvestre (wt) con el plásmido vacío pN702GEM3. Se muestran fotografías de la parte superior e inferior de las placas.



**Figura C1.7. Análisis fenotípico de AbrB1/B2: curva de crecimiento, producción de antibióticos y análisis microscópico (medio líquido).** [A] Curva de crecimiento de las cepas silvestre (wt; círculos azules) y mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ; triángulos naranjas) en medio líquido NMMP; se incluye la producción de los antibióticos undecilprodigiosina (RED) y actinorrodina (ACT). Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas. \*Significación estadística: valor  $p < 0,05$  [B] Análisis microscópico de la germinación y el crecimiento de las cepas silvestre (wt) y mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ). La barra blanca en la parte superior derecha de cada microfotografía se corresponde con  $50 \mu m$ .

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**Figura C1.8. Análisis fenotípico de AbrB1/B2: ensayos de antibiosis (bacterias Gram-Negativas y hongos).** [A] Ensayo de antibiosis: efecto inhibitorio de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (wt) y la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) (cultivadas en medio NMMP) en el crecimiento de las bacterias Gram-Negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter aerogenes* y *Acinetobacter baylyi*. Se incluyen fotografías de la parte superior de las placas. [B] Ensayo de antibiosis: efecto inhibitorio de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (wt) y la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) (cultivadas en medio NMMP) en el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Phytophthora cactorum*, *Phoma exigua*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*. Se incluyen fotografías de la parte superior de las placas.

Todos estos resultados indican que el sistema de dos componentes AbrB1/B2 actúa como un regulador negativo de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, y que no parece ejercer un efecto significativo sobre el desarrollo y diferenciación morfológica. Además, la nueva cepa mutante obtenida mediante CRISPR presenta un comportamiento fenotípico estable, a diferencia de la generada previamente, por lo que es adecuada para el estudio de este sistema de dos componentes.

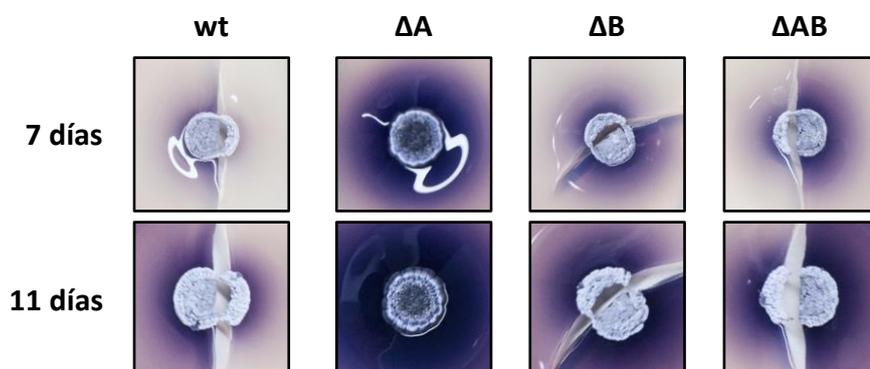
### C1.4 - Análisis fenotípico de mutantes en los sistemas AbrB1/B2 y AbrA1/A2

AbrA1/A2 es otro TCS previamente estudiado en nuestro laboratorio que actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos (Rico, Yepes, et al., 2014; Yepes et al., 2011). Se decidió estudiar de forma conjunta ambos sistemas de regulación para analizar su efecto sobre la producción de antibióticos en *S. coelicolor*.

Como primer paso se construyó la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrA1/A2  $\Delta$ abrB1/B2. Se utilizaron los mismos plásmidos que en la construcción de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrB1/B2, y se siguió el mismo procedimiento, con la diferencia de que, en lugar de la cepa silvestre, la delección por CRISPR-Cas9 de *abrB1/B2* se realizó en la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrA1/A2 previamente obtenida en el laboratorio, también mediante la tecnología CRISPR-Cas9 (Antoraz, 2018).

Se analizó el fenotipo de la cepa silvestre, las cepas mutantes con las delecciones individuales de cada sistema de dos componentes y la cepa carente de ambos sistemas (Figura C1.9). El aumento en la producción de ACT fue mayor en el caso de la cepa mutante  $\Delta$ abrA1/A2 en comparación con la cepa  $\Delta$ abrB1/B2; sin embargo, en la cepa carente de ambos sistemas no se observó un efecto aditivo o sinérgico en cuanto a la producción de antibióticos, sino que presentó un fenotipo idéntico al mutante sencillo  $\Delta$ abrB1/B2. Además, la cepa mutante  $\Delta$ abrA1/A2 también presentó alteraciones en la diferenciación morfológica, aunque este efecto fenotípico tampoco se observó en el doble mutante  $\Delta$ abrA1/A2  $\Delta$ abrB1/B2.

La regulación ejercida por el sistema AbrB1/B2 parece predominar sobre la regulación de AbrA1/A2; por lo que se decidió no proseguir con el análisis conjunto de ambos sistemas.



**Figura C1.9. Análisis fenotípico conjunto de AbrB1/B2 y AbrA1/A2.** Análisis fenotípico de las cepas *S. coelicolor* M145 (wt), *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrA1/A2 ( $\Delta$ A), *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrB1/B2 ( $\Delta$ B) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrA1/A2  $\Delta$ abrB1/B2 ( $\Delta$ AB) en medio NMMP a diferentes tiempos de cultivo (7 y 11 días). Se muestran fotografías de la parte superior de las placas.

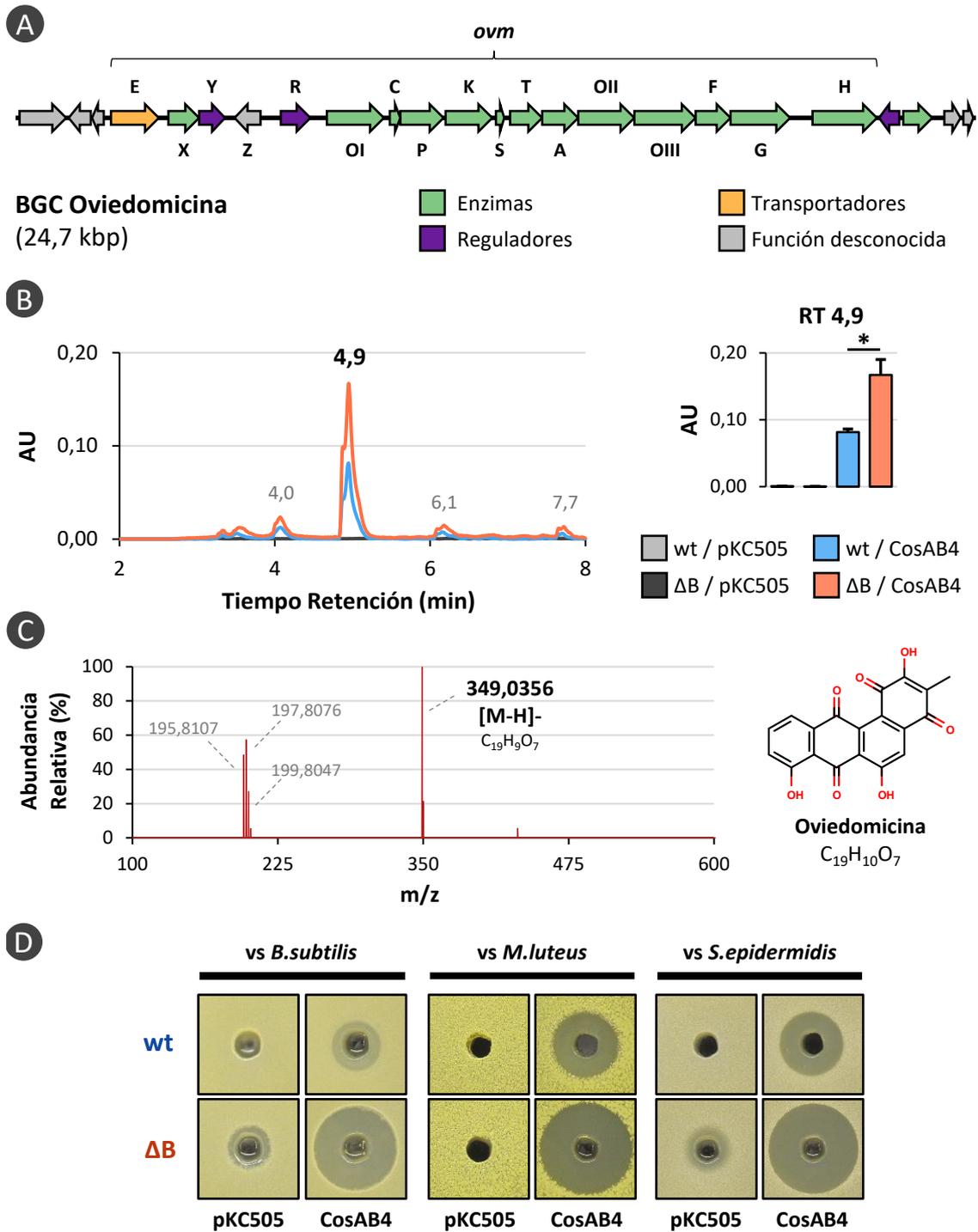
### C1.5 - Producción heteróloga de antibióticos

Los resultados fenotípicos obtenidos señalan que AbrB1/B2 es un regulador negativo de la producción de antibióticos, y su delección induce un incremento significativo de los antibióticos endógenos de *S. coelicolor* (ACT y RED). Teniendo esto en cuenta, se decidió analizar el potencial de *S. coelicolor* M145  $\Delta$ abrB1/B2 como cepa hospedadora para la producción heteróloga de compuestos con actividades de interés, como antibióticos y antitumorales. Para ello, se introdujeron las rutas de síntesis de oviedomicina y mitramicina en las cepas silvestre y mutante  $\Delta$ abrB1/B2, a través de los cósmidos cosAB4 (contiene la ruta de biosíntesis de oviedomicina, como control se utilizó el vector vacío pKC505) y pMTMF (contiene la ruta de biosíntesis de mitramicina, como control se utilizó el vector vacío pCLY10).

La oviedomicina es una anguciclina (poliquétido aromático) producida por *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 (Lombó et al., 2004; Méndez et al., 2002) y *Streptomyces ansochromogenes* (Xu, Zhang, et al., 2017). Este compuesto presenta actividad antibiótica frente a bacterias Gram-Positivas y actividad antitumoral *in vitro* frente a las líneas celulares humanas A549 (cáncer de pulmón), HepG2 (cáncer de hígado) y MCF-7 (cáncer de mama) (Xu, Zhang, et al., 2017).

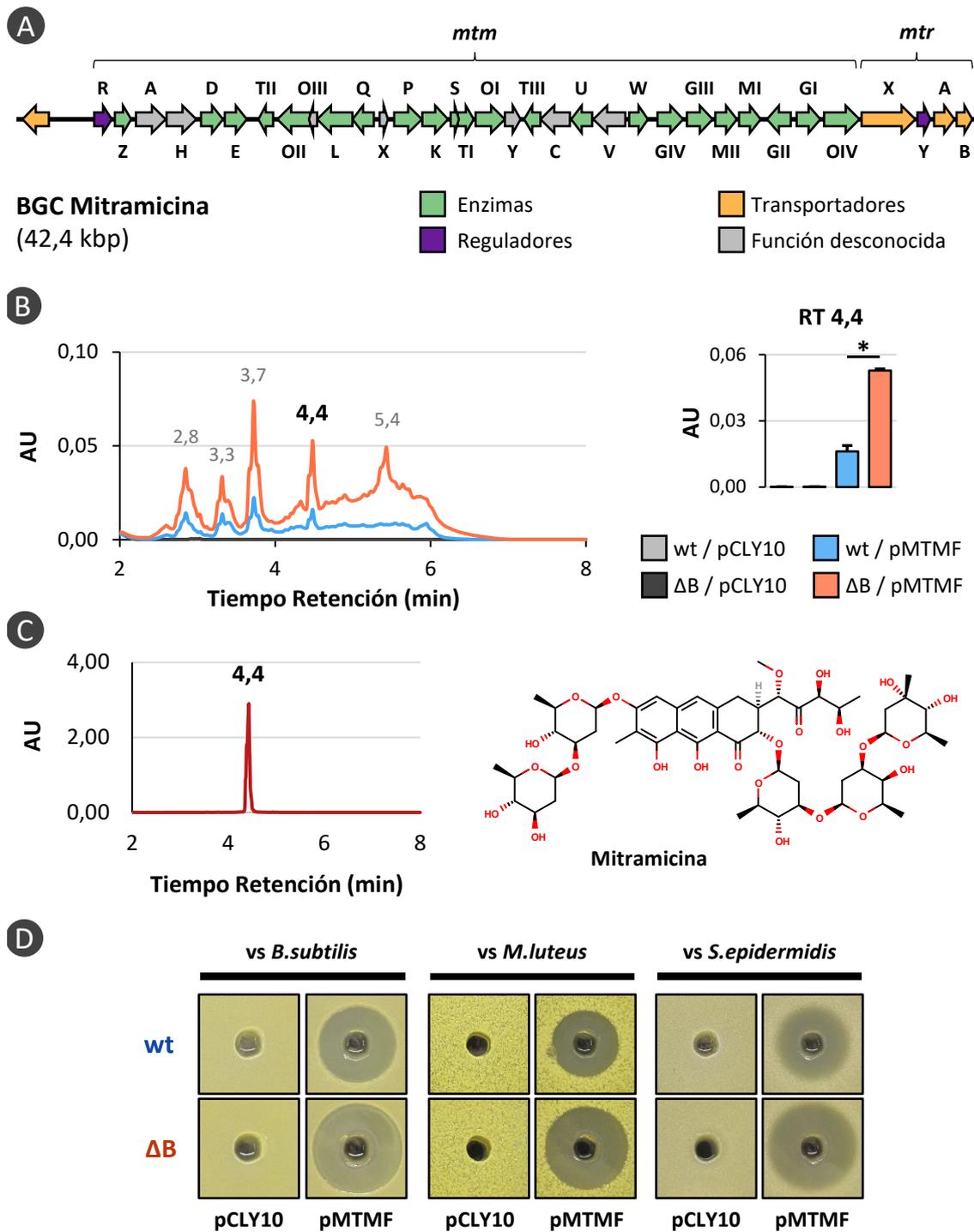
La mitramicina (también conocida como plicamicina) es un glucósido de la familia del ácido aureólico producida por varias especies de *Streptomyces*, como *S. argillaceus* ATCC12956 (Lombó et al., 1996; Rao et al., 1960). Este compuesto presenta actividad antibiótica frente a bacterias Gram-Positivas y actividad antitumoral, entre otras; se ha utilizado en el tratamiento de cáncer testicular (Brown & Kennedy, 1965; Kennedy & Torkelson, 1995) y de la enfermedad ósea de Paget (Condon et al., 1971; Ryan et al., 1970), y se ha investigado su aplicación en otras enfermedades como cáncer pancreático (Gao et al., 2011) o enfermedades neurodegenerativas (Osada et al., 2013).

La producción de oviedomicina y mitramicina se evaluó mediante el análisis de extractos de los sobrenadantes por separación cromatográfica y ensayos de antibiosis frente a bacterias Gram-Positivas (los detalles de los ensayos se indican en los apartados correspondientes de “Materiales y Métodos”). La cepa carente del sistema AbrB1/B2 presentó un aumento significativo de la producción tanto de oviedomicina (Figura C1.10) como de mitramicina (Figura C1.11). Se observó tanto una mayor cantidad de estos compuestos en los análisis cromatográficos como un mayor halo de inhibición en los ensayos de antibiosis frente a las bacterias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.



**Figura C1.10. Producción heteróloga de ovoidomicina.** [A] BGC de la ovoidomicina. [B] Análisis por HPLC de extractos de sobrenadantes de cultivos en medio NMMP de las cepas silvestre (wt) y mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) transformados con pKC505 (control) y CosAB4 (cósmido que contiene el clúster biosintético de la ovoidomicina). Se muestran los cromatogramas de una de las réplicas de cada cepa (izquierda); así como los valores correspondientes al pico de la ovoidomicina (tiempo de retención: 4,95 min), las barras de error muestran la desviación estándar de dos réplicas. \*Significación estadística: valor  $p < 0,05$ . [C] Espectro de masas correspondiente al pico con un tiempo de retención de 4,95 min, y estructura de la ovoidomicina. [D] Ensayo de antibiosis de extractos de sobrenadantes resuspendidos en DMSO. El ensayo se realizó contra varias bacterias Gram-Positivas: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.

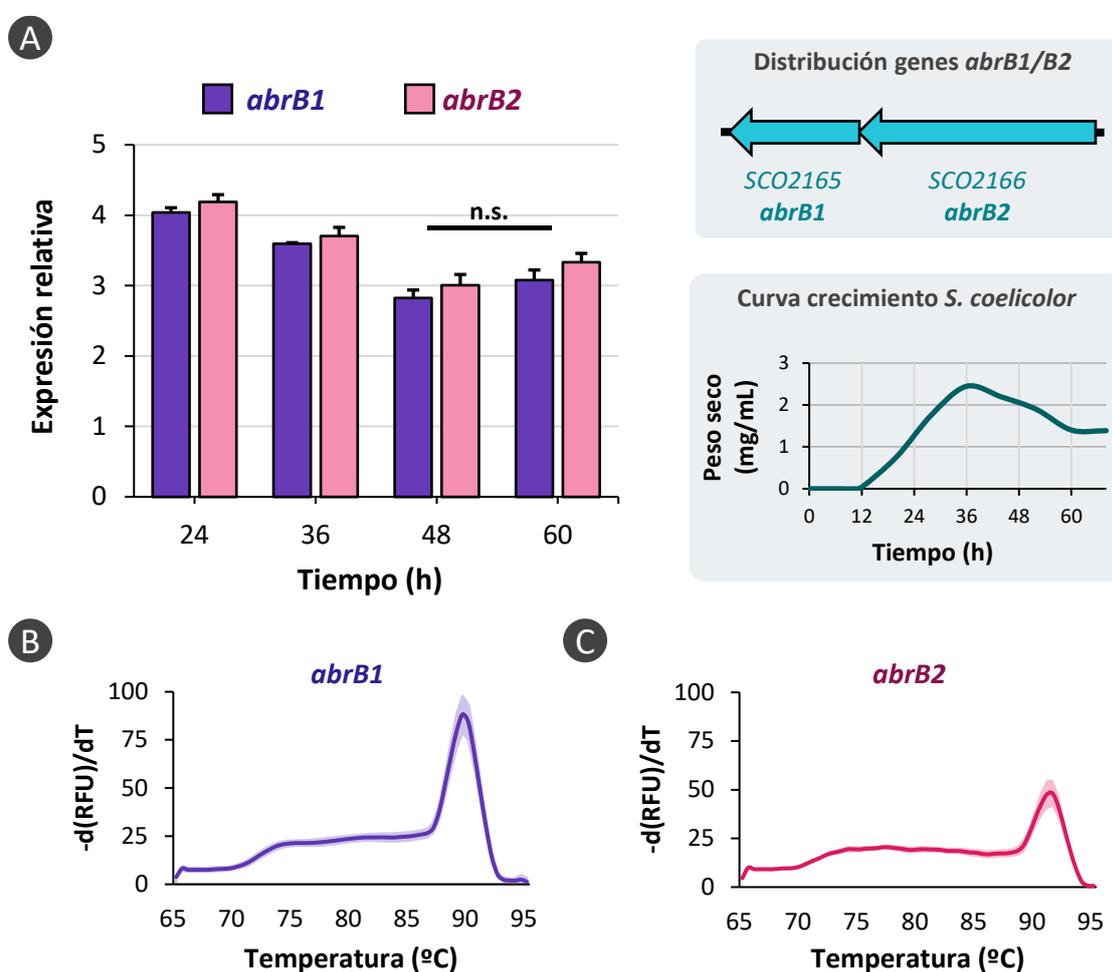
## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**Figura C1.11. Producción heteróloga de mitramicina.** [A] BGC de la mitramicina. [B] Análisis por UPLC de extractos de sobrenadantes de cultivos en medio NMMP de las cepas silvestre (wt) y mutante  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) transformados con pCLY10 (control) y pMTMF (cósmido que contiene el clúster biosintético de la mitramicina). Se muestran los cromatogramas de una de las réplicas de cada cepa (izquierda); así como los valores correspondientes al pico de la mitramicina (tiempo de retención: 4,48 min), las barras de error muestran la desviación estándar de dos réplicas. \*Significación estadística: valor  $p < 0,05$ . [C] Cromatograma (UPLC) de mitramicina pura, y estructura de la mitramicina. [D] Ensayo de antibiosis de extractos de sobrenadantes resuspendidos en DMSO. El ensayo se realizó contra varias bacterias Gram-Positivas: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## C1.6 - Análisis transcripcional de AbrB1/B2

El patrón de expresión a nivel transcripcional de *abrB1* y *abrB2* se determinó mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa de transcripción reversa) en la cepa silvestre a 24, 36, 48 y 60 horas (Figura C1.12). Ambos genes se expresan durante todos los tiempos estudiados, observándose la máxima expresión a las 24 horas (mitad de la fase exponencial de crecimiento). Los niveles de expresión descienden a las 36 horas hasta alcanzar una expresión constante a 48 y 60 horas. Además, se observa una mayor expresión del gen *abrB2* con respecto a *abrB1*, como es esperable al encontrarse al inicio del operón. Como control se analizó también la cepa  $\Delta$ *abrB1/B2*, en la que no se detectó expresión de ninguno de estos genes.



**Figura C1.12. Análisis transcripcional de AbrB1/B2.** [A] Expresión de los genes *abrB1* y *abrB2* a 24, 36, 48 y 60 horas en medio NMMP (análisis realizado por RT-qPCR). La normalización se realizó en base a la expresión del gen *rpsL* (*SCO4659*). Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas. No hay diferencias significativas entre la expresión a 48 y 60 horas en cada gen. Como referencia para la interpretación del gráfico se incluyen la distribución de los genes *abrB1/B2* y la curva de crecimiento de *S. coelicolor* M145 en NMMP. [B] Curva de fusión de los productos de la RT-qPCR correspondientes al gen *abrB1*. El área coloreada muestra la desviación estándar. [C] Curva de fusión de los productos de la RT-qPCR correspondientes al gen *abrB2*. El área coloreada muestra la desviación estándar.

### C1.7 - Análisis transcriptómico

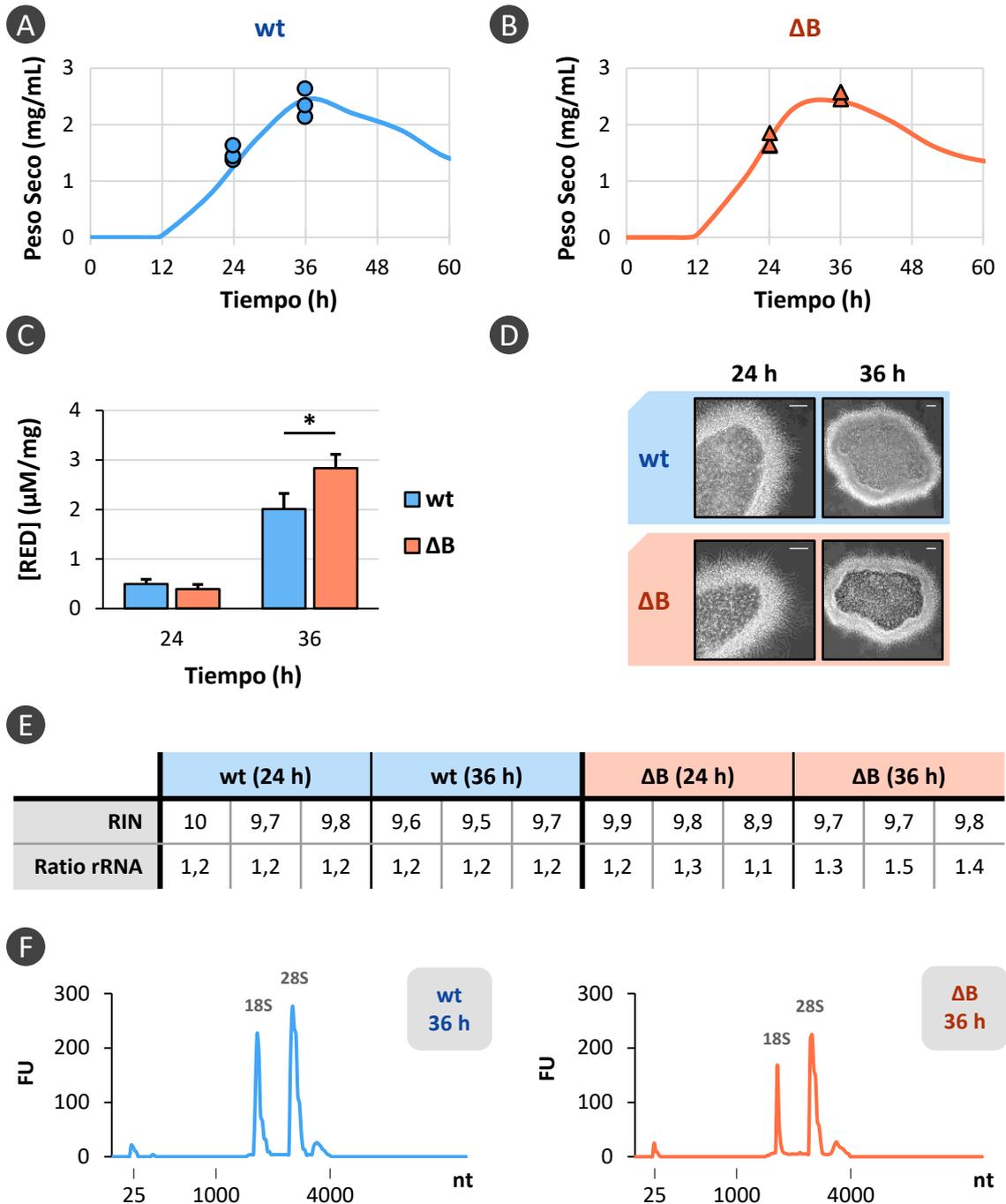
Para determinar la cascada de regulación del sistema AbrB1/B2 se realizó un análisis transcriptómico global de la cepa silvestre y de la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  mediante RNAseq. Teniendo en consideración las observaciones fenotípicas y transcripcionales realizadas hasta el momento, se decidió realizar el análisis transcriptómico a 24 y 36 horas (en medio NMMP), que se corresponden con la mitad y el final de la fase exponencial de crecimiento, y en las que existe una mayor expresión de los genes *abrB1/B2*. Además, a 36 horas ya se detecta producción del antibiótico RED, por lo que estos tiempos suponen una ventana óptima para identificar la vía de regulación por la que se encuentra actuando AbrB1/B2 en relación con la producción de antibióticos.

Se monitorizó el comportamiento fenotípico de las muestras que iban a ser procesadas para su análisis transcriptómico, y se evaluó la calidad del RNA extraído (*Figura C1.13*). En todas las muestras el crecimiento, desarrollo y producción de antibióticos fue similar al observado en los experimentos previos. Además, la calidad del RNA obtenido fue óptima, con valores de RIN (Número de Integridad del RNA) superiores a 7, y ratios de rRNA 28S/18S superiores a 1.

La secuenciación de los transcriptomas (RNAseq) de las diferentes muestras analizadas fue realizada por la empresa *Macrogen*, los detalles se indican en el apartado “*MM.4.8 - Análisis transcriptómico por RNAseq*”. Los datos de secuenciación obtenidos se convirtieron a formato FASTQ mediante el paquete *bcl2fastq*, y se depositaron en la base de datos NCBI SRA (*BioProject\_ID*: PRJNA637401<sup>1</sup>; *BioSample\_Accessions*: SAMN15105054, SAMN15105055, SAMN15105056, SAMN15105057). El procesamiento de los datos se realizó en colaboración con el Dr. Juan F. Alzate (Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Universidad de Antioquía, Colombia). Se utilizó el software *RaNA-Seq* (Prieto & Barrios, 2020) para el preprocesamiento por *fastp 0.19.4* (Chen et al., 2018) y la cuantificación por *salmon 0.9.1* (Patro et al., 2017). Se obtuvieron entre 36 y 52 millones de lecturas totales de cada librería durante el proceso de secuenciación, de las cuales aproximadamente el 99% pasaron los filtros de calidad (secuencias muy cortas, con demasiadas Ns, etc.). Tras este filtrado, los valores de calidad de Q30 se encontraron en torno al 96%. Entre el 89% y el 94% de las secuencias filtradas fueron mapeadas correctamente en el genoma de referencia (*Streptomyces coelicolor* A3(2); *GenBank\_ID*: NC\_003888).

---

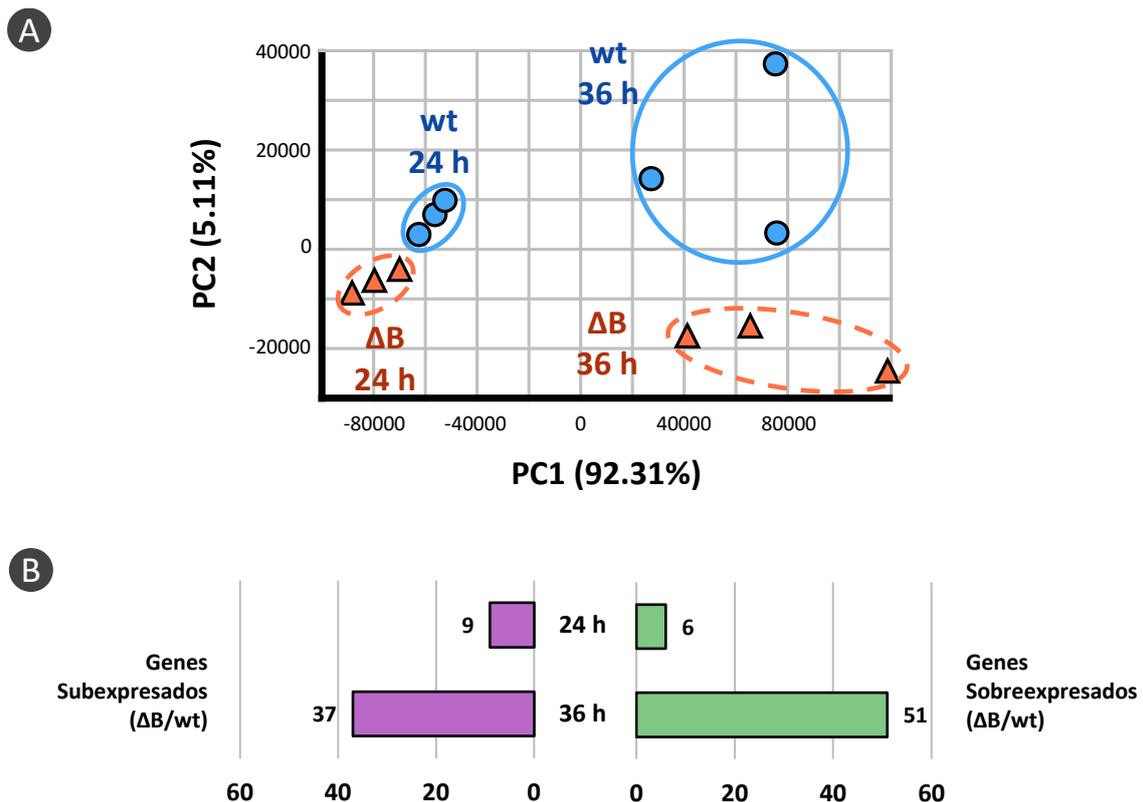
<sup>1</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA637401>



**Figura C1.13. Control fenotípico de las muestras analizadas por RNAseq y evaluación de la calidad del RNA.** [A] Control de crecimiento de las muestras de la cepa silvestre (wt) analizadas por RNAseq. Se incluye como referencia la curva de crecimiento de esta cepa. [B] Control de crecimiento de las muestras de la cepa  $\Delta abrB1/B2$  ( $\Delta B$ ) analizadas por RNAseq. Se incluye como referencia la curva de crecimiento de esta cepa. [C] Control de producción del antibiótico undecilprodigosina de las muestras analizadas por RNAseq. \*Significación estadística: valor  $p < 0,05$ . [D] Control de crecimiento a nivel microscópico de las muestras analizadas por RNAseq. La barra blanca en la parte superior derecha de cada microfotografía se corresponde con 50  $\mu m$ . [E] Evaluación de la calidad del RNA de las muestras analizadas por RNAseq. Se muestran los valores de RIN (número de integridad del RNA) y el ratio de rRNAs 28S/18S. [F] Ejemplos de electroferogramas de RNA obtenidos de dos de las muestras analizadas por RNAseq; una se corresponde a la cepa silvestre y la otra la cepa mutante (en ambos casos se tratan de cultivos de 36 horas).

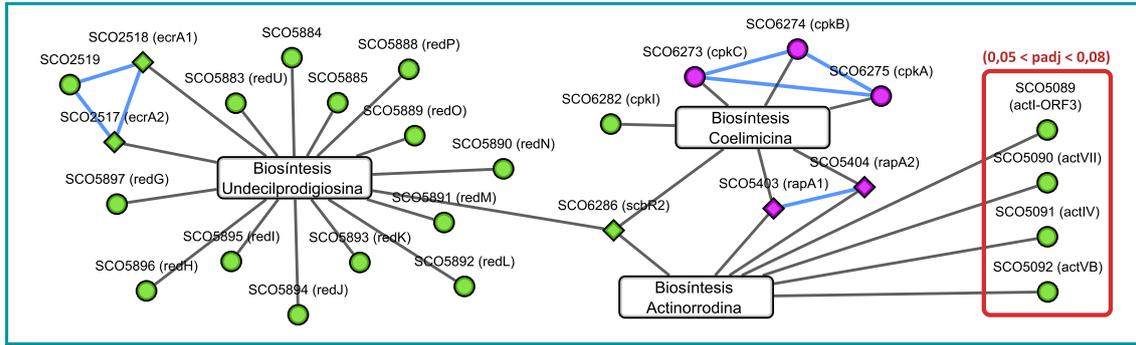
## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

El análisis de la expresión diferencial génica se realizó con *DEseq2* (se aplicó un test de Wald y un ajuste paramétrico). Las muestras analizadas se agruparon perfectamente en función de la cepa y el tiempo de cultivo al aplicar un análisis de componentes principales (*Figura C1.14.A*). Antes de proceder al análisis de los datos normalizados de expresión diferencial se aplicaron los siguientes filtros:  $\text{padj} \leq 0,05$  y  $|\text{FC}| \geq 2$ . Por un lado, a las 24 horas de cultivo se identificaron 15 genes diferencialmente expresados entre la cepa silvestre (*S. coelicolor* M145) y la cepa mutante (*S. coelicolor* M145  $\Delta\text{abrB1/B2}$ ); de los cuales 6 genes se encontraban sobreexpresados, y 9 genes subexpresados, en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre (*Figura C1.14.B*). Por otro lado, a las 36 horas de cultivo se identificaron 88 genes diferencialmente expresados entre la cepa silvestre y la cepa mutante  $\Delta\text{abrB1/B2}$ ; de los cuales 51 genes se encontraban sobreexpresados, y 37 genes subexpresados, en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre (*Figura C1.14.B*). Los genes diferencialmente expresados con papel biológico conocido pertenecen a los siguientes procesos: respuesta a estrés, metabolismo primario, metabolismo secundario y desarrollo / diferenciación (*Figura C1.15*).

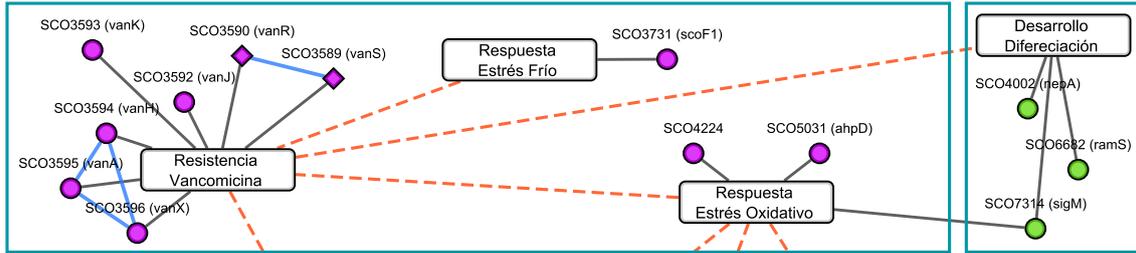


**Figura C1.14. Análisis transcriptómico por RNAseq. [A]** Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras analizadas por RNAseq: triplicados de la cepa silvestre (wt) y de la cepa  $\Delta\text{abrB1/B2}$  ( $\Delta\text{B}$ ) cultivados durante 24 y 36 horas en medio NMMP. **[B]** Número de genes sobreexpresados ( $\text{FC} \geq 2$ ) y subexpresados ( $\text{FC} \leq -2$ ) en la cepa  $\Delta\text{abrB1/B2}$  con respecto a la cepa silvestre a 24 y 36 horas. Los genes seleccionados presentaban  $\text{padj} \leq 0,05$ .

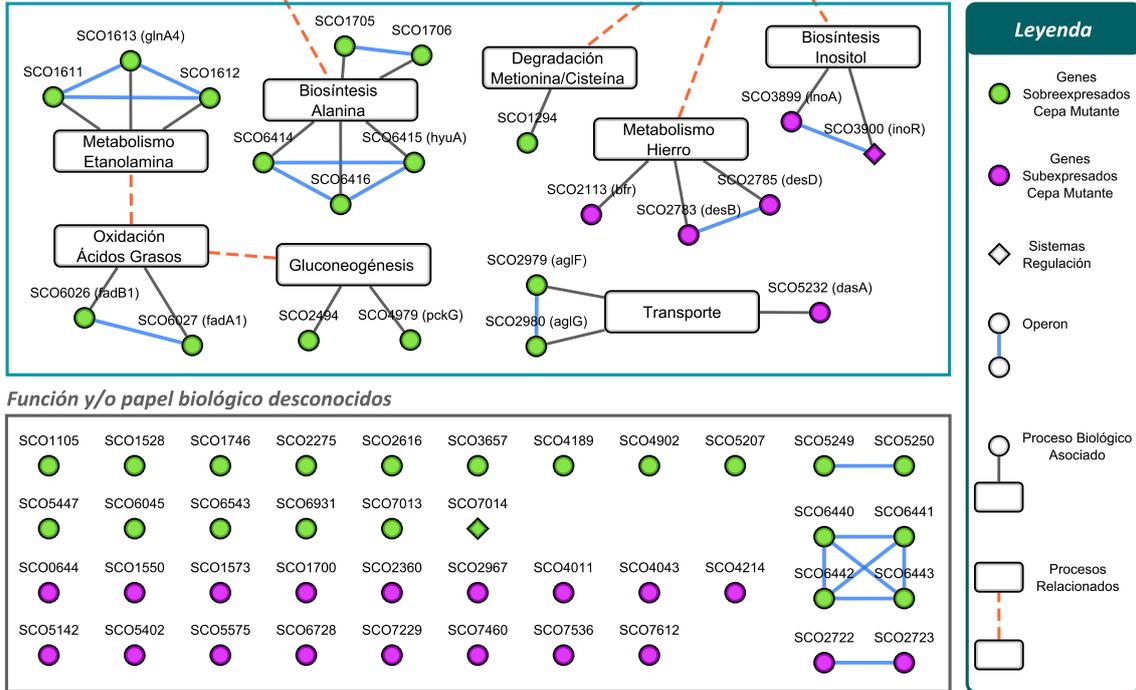
Metabolismo Secundario



Respuesta Estrés



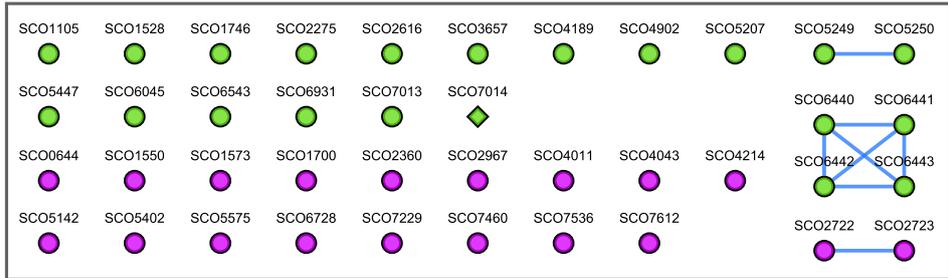
Metabolismo primario



**Leyenda**

- Genes Sobreexpresados Cepa Mutante
- Genes Subexpresados Cepa Mutante
- ◇ Sistemas Regulación
- Operon
- Proceso Biológico Asociado
- Procesos Relacionados

Función y/o papel biológico desconocidos



**Figura C1.15. Análisis de los genes diferencialmente expresados por la delección  $\Delta abrB1/B2$ .** Se muestran los genes diferencialmente expresados en la cepa  $\Delta abrB1/B2$  con respecto a la cepa silvestre organizados en función del proceso biológico al que están asociados. Se incluyen también aquellos genes con función y/o papel biológico desconocidos. Los genes sobreexpresados en la cepa mutante se muestran en color verde, mientras que los genes subexpresados se muestran en color magenta; también se indican los operones mediante líneas azules entre los genes que los forman.

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

### C1.7.1 - Genes implicados en respuesta a estrés

Los genes expresados diferencialmente entre las cepas silvestre y mutante  $\Delta abrB1/B2$  relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés se muestran en la *Tabla C1.1*.

**Tabla C1.1.** Genes diferencialmente expresados por la delección  $\Delta abrB1/B2$  relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés. Los genes subexpresados en la cepa mutante (FC < -2) aparecen marcados en rosa.

Gen	Nombre	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto	Referencia
<b>Resistencia a vancomicina</b>						
SCO3589	<i>vanS</i>	36 h	-2,2	1,8E-5	Histidina quinasa (TCS)	(Hong et al., 2004)
SCO3590	<i>vanR</i>	36 h	-2,5	9,1E-6	Regulador respuesta (TCS)	
SCO3592	<i>vanJ</i>	36 h	-3,9	1,1E-4	Producto desconocido	
SCO3593	<i>vanK</i>	36 h	-4,2	1,7E-6	Transferasa	
SCO3594	<i>vanH</i>	36 h	-4,0	1,6E-6	D-Lactato deshidrogenasa	
SCO3595	<i>vanA</i>	36 h	-4,3	2,3E-7	D-Ala : D-Lac ligasa	
SCO3596	<i>vanX</i>	36 h	-3,6	1,3E-4	D-Ala : D-Ala dipeptidasa	
<b>Respuesta a estrés oxidativo</b>						
SCO4224	-	36 h	-2,3	1,0E-2	Lantionina sintetasa	(Darbon et al., 2012)
SCO5031	<i>ahpD</i>	36 h	-3,1	1,0E-3	Alquil hidroperóxido reductasa	(Hahn et al., 2002)
<b>Respuesta a estrés por frío</b>						
SCO3731	<i>scoF1</i>	36 h	-2,3	5,0E-3	Proteína shock por frío	(Kormanec & Sevcikova, 2000)

#### Resistencia a vancomicina

El clúster completo de resistencia a vancomicina, *vanSRJKHAX* (SCO3589/90; SCO3592-96) se encontró subexpresado en la cepa mutante a 36 horas. Este clúster se divide en cuatro unidades transcripcionales: *vanSR*, *vanJ*, *vanK* y *vanHAX*.

La vancomicina es un antibiótico glucopeptídico que inhibe la síntesis de la pared celular al unirse a precursores del peptidoglicano (se une al extremo D-Ala-D-Ala del Lípido II) y bloquear la formación de entrecruzamientos necesarios para generar una pared celular funcional. La vancomicina solo afecta a bacterias Gram-Positivas (no puede atravesar la membrana externa presente en bacterias Gram-Negativas), y su importancia clínica es clave, ya que es el único tratamiento efectivo contra *Staphylococcus aureus* MRSA. El clúster de resistencia a vancomicina (*van*) está presente en múltiples patógenos humanos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, etc.) y en varios actinomicetos (productores de antibióticos glucopeptídicos: *Amycolatopsis orientalis*, *Streptomyces toyocaensis*, etc.; y no productores: *Streptomyces coelicolor*) (Hong et al., 2008).

El clúster de resistencia a vancomicina está controlado por el sistema de dos componentes VanSR que forma parte del mismo. En *S. coelicolor*, la señal de activación de VanS es la propia molécula de vancomicina, que debe encontrarse unida al precursor del peptidoglicano Lípido II (Hutchings, Hong, & Buttner, 2006; Koteva et al., 2010; Kwum et al., 2013; Lockey et al., 2020; Novotna et al., 2016). En ausencia de vancomicina, VanS actúa como fosfatasa de VanR (que puede ser fosforilado vía acetilfosfato en estas condiciones). En presencia de vancomicina, VanS pasa a actuar como quinasa, lo que permite la activación de VanR, que a su vez activa el clúster de resistencia a vancomicina completo (Hutchings, Hong, & Buttner, 2006). La resistencia a vancomicina se logra al modificar la síntesis de la pared celular, sustituyendo el extremo D-Ala-D-Ala del Lípido II por D-Ala-D-Lac, que no es reconocido por este antibiótico. Esta sustitución es llevada a cabo por VanHAX: VanH es una enzima lactato deshidrogenasa que transforma el piruvato en D-lactato; VanX es una dipeptidasa que rompe los péptidos D-Ala-D-Ala; y VanA es una ligasa que une D-Ala y D-Lac; adicionalmente, VanK es la enzima encargada de unir una ramificación de glicina al precursor modificado Lípido II (en el precursor no modificado, la reacción es catalizada por FemX) (Hong et al., 2004).

### Respuesta a estrés oxidativo

En la cepa mutante varios genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo se encontraron subexpresados a 36 horas: *ahpD* (*SCO5031*) y *SCO4224*.

AhpD pertenece al sistema alquil-hidroperóxido-reductasa, uno de los sistemas antioxidantes más relevantes en *S. coelicolor*. AhpD cataliza la regeneración del sitio activo de AhpC (*SCO5032*). Se postula que en el crecimiento aerobio de *S. coelicolor*, la producción endógena de peróxido de hidrógeno en la respiración durante las primeras fases de crecimiento induce el sistema antioxidante AhpDC, para proteger los lípidos de membrana y el material genético; en las fases tardías de crecimiento es sustituido por el sistema catalasa (Hahn et al., 2002).

En el caso de *SCO4224*, aunque su producto no ha sido caracterizado, la delección de este gen restringe el crecimiento de *S. lividans* (especie muy cercana a *S. coelicolor* a nivel filogenético) en presencia de estrés oxidativo (Darbon et al., 2012).

La respuesta a estrés oxidativo está muy relacionada a la resistencia a antibióticos. La presencia de antibióticos, sobre todo aquellos activos contra las envueltas celulares, incrementa las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a la toxicidad del antibiótico contra la bacteria, aunque el mecanismo molecular por el que sucede se encuentra aún en debate (Ezraty & Barras, 2016).

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

### Respuesta a estrés por frío

El gen *scoF1* (*SCO3731*), que codifica una proteína de shock por frío similar a CspA (Kormanec & Sevcikova, 2000), se encontró subexpresado a 36 horas en la cepa  $\Delta$ *abrB1/B2*. Las bajas temperaturas suelen producir defectos en los procesos de transcripción y traducción por la formación de estructuras secundarias en el RNA. Las proteínas de shock por frío previenen estos procesos actuando como chaperonas de RNA, impidiendo la formación de estructuras que provoquen paradas prematuras de la transcripción y/o ralenticen la traducción. Más allá de los cambios de temperatura, los mecanismos de respuesta a shock térmico también se han asociado a la resistencia a antibióticos que afectan a diferentes procesos biológicos (Bianchi & Baneyx, 1999; van Bogelen & Neidhardt, 1990).

### C1.7.2 - Genes implicados en metabolismo secundario

Los genes expresados diferencialmente entre las cepas silvestre y mutante  $\Delta$ *abrB1/B2* relacionados con el metabolismo secundario se muestran en la *Tabla C1.2*.

**Tabla C1.2. Genes diferencialmente expresados por la delección  $\Delta$ *abrB1/B2* relacionados con el metabolismo secundario.** Los genes sobreexpresados en la cepa mutante ( $FC > 2$ ) aparecen marcados en verde; mientras que los genes subexpresados en la cepa mutante ( $FC < -2$ ) aparecen marcados en rosa.

Gen	Nombre	Tiempo	FC ( $\Delta$ B/WT)	padj	Producto	Referencia
<b>Biosíntesis de undecilprodigiosina (RED)</b>						
<i>SCO2517</i>	<i>ecrA2</i>	36 h	2,4	4,9E-2	Regulador respuesta (TCS)	(Li et al., 2004)
<i>SCO2518</i>	<i>ecrA1</i>	36 h	2,5	2,1E-2	Histidina quinasa (TCS)	
<i>SCO2519</i>	-	36 h	4,7	5,0E-3	Transportador	
<i>SCO5883</i>	<i>redU</i>	36 h	2,5	3,9E-2	Producto desconocido	-
<i>SCO5884</i>	-	36 h	3,3	5,1E-6	Producto desconocido	-
<i>SCO5885</i>	-	36 h	3,9	1,1E-11	Producto desconocido	-
<i>SCO5888</i>	<i>redP</i>	36 h	3,4	3,7E-4	Reductasa	(Cerdeño et al., 2001)
<i>SCO5889</i>	<i>redO</i>	36 h	3,7	1,6E-4	Producto desconocido	
<i>SCO5890</i>	<i>redN</i>	36 h	3,0	5,3E-5	Sintasa	
<i>SCO5891</i>	<i>redM</i>	36 h	3,0	1,5E-5	Sintasa	
<i>SCO5892</i>	<i>redL</i>	36 h	2,8	8,4E-6	Sintasa	
<i>SCO5893</i>	<i>redK</i>	36 h	3,3	2,7E-6	Oxidorreductasa	
<i>SCO5894</i>	<i>redJ</i>	36 h	3,1	2,3E-5	Tioesterasa	
<i>SCO5895</i>	<i>redI</i>	36 h	3,5	1,1E-6	Metiltransferasa	
<i>SCO5896</i>	<i>redH</i>	36 h	3,2	1,7E-7	Sintetasa	
<i>SCO5897</i>	<i>redG</i>	36 h	2,5	2,0E-3	Oxidasa	
<i>SCO6286</i>	<i>scbR2</i>	36 h	2,1	5,0E-3	Regulador	(Xu et al., 2010)
<b>Biosíntesis de coelimidina</b>						
<i>SCO5403</i>	<i>rapA1</i>	36 h	-3,3	3,6E-4	Regulador respuesta (TCS)	(Lu et al., 2007)
<i>SCO5404</i>	<i>rapA2</i>	36 h	-3,0	1,0E-3	Histidina quinasa (TCS)	
<i>SCO6273</i>	<i>cpkC</i>	24 h	-2,0	2,9E-2	Poliquétido tipo I sintetasa	(Pawlik et al., 2007)
<i>SCO6274</i>	<i>cpkB</i>	24 h	-2,2	4,0E-3	Poliquétido tipo I sintetasa	
<i>SCO6275</i>	<i>cpkA</i>	24 h	-2,3	1,0E-3	Poliquétido tipo I sintetasa	
<i>SCO6282</i>	<i>cpkI</i>	36 h	2,8	6,0E-3	Reductasa	

Gen	Nombre	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto	Referencia
<b>Genes de interés que no superan los filtros por poco</b>						
SCO3288	<i>abeB</i>	24 h	1,9	3,4E-7	Producto desconocido	(Hindra & Elliot, 2010)
SCO3289	<i>abeC</i>	24 h	1,9	5,6E-8	Producto desconocido	
SCO3290	<i>abeD</i>	24 h	1,9	2,7E-6	Producto desconocido	
SCO5889	<i>actI-ORF3</i>	36 h	5,0	5,5E-2	Poliquétido sintasa ACP	(Fernández-Moreno et al., 1992)
SCO5090	<i>actVII</i>	36 h	4,3	7,9E-2	Ciclasa / Deshidratasa	
SCO5091	<i>actIV</i>	36 h	4,5	6,2E-2	Ciclasa	
SCO5092	<i>actVB</i>	36 h	4,7	5,8E-2	Poliquétido dimerasa	

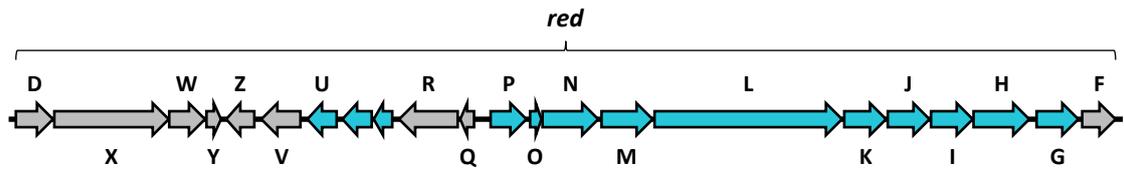
### Biosíntesis de undecilprodigiosina

Acorde al análisis fenotípico de la cepas silvestre y la cepa  $\Delta abrB1/B2$ , la mayor parte de los genes del clúster *red* de biosíntesis de este antibiótico (Stankovic et al., 2014) se encontraron sobreexpresados a 36 horas en la cepa mutante: *redUPONMLKJIHG* (SCO5883; SCO5888-97) y SCO5884/85). RedPLKJ participan en la síntesis del intermediario 2-undecilpirrol (2-UP), RedONMI intervienen en la síntesis del intermediario 4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído (MBP), y RedH cataliza la condensación de ambos intermediarios para dar lugar a la RED (Figura C1.16).

El regulador específico de este clúster, *redD* (SCO5877) no superó el filtro de expresión diferencial. Sin embargo, el operón SCO2517-19 que contiene a *ecrA1/A2* (SCO2518/17), sistema de dos componentes que actúa como regulador positivo de la producción de RED (Li et al., 2004), se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a las 36 horas. El regulador *scbR2* (SCO6286) también se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas; el papel de este regulador es coordinar la producción de RED, ACT, el antibiótico dependiente de calcio CDA (actúa como regulador positivo de estos tres compuestos) y la coelomicina (actúa como regulador negativo de este compuesto) (Bednarz et al., 2019; Xu et al., 2010), lo cual concuerda con las observaciones fenotípicas realizadas en las cepas silvestre y mutante  $\Delta abrB1/B2$ .

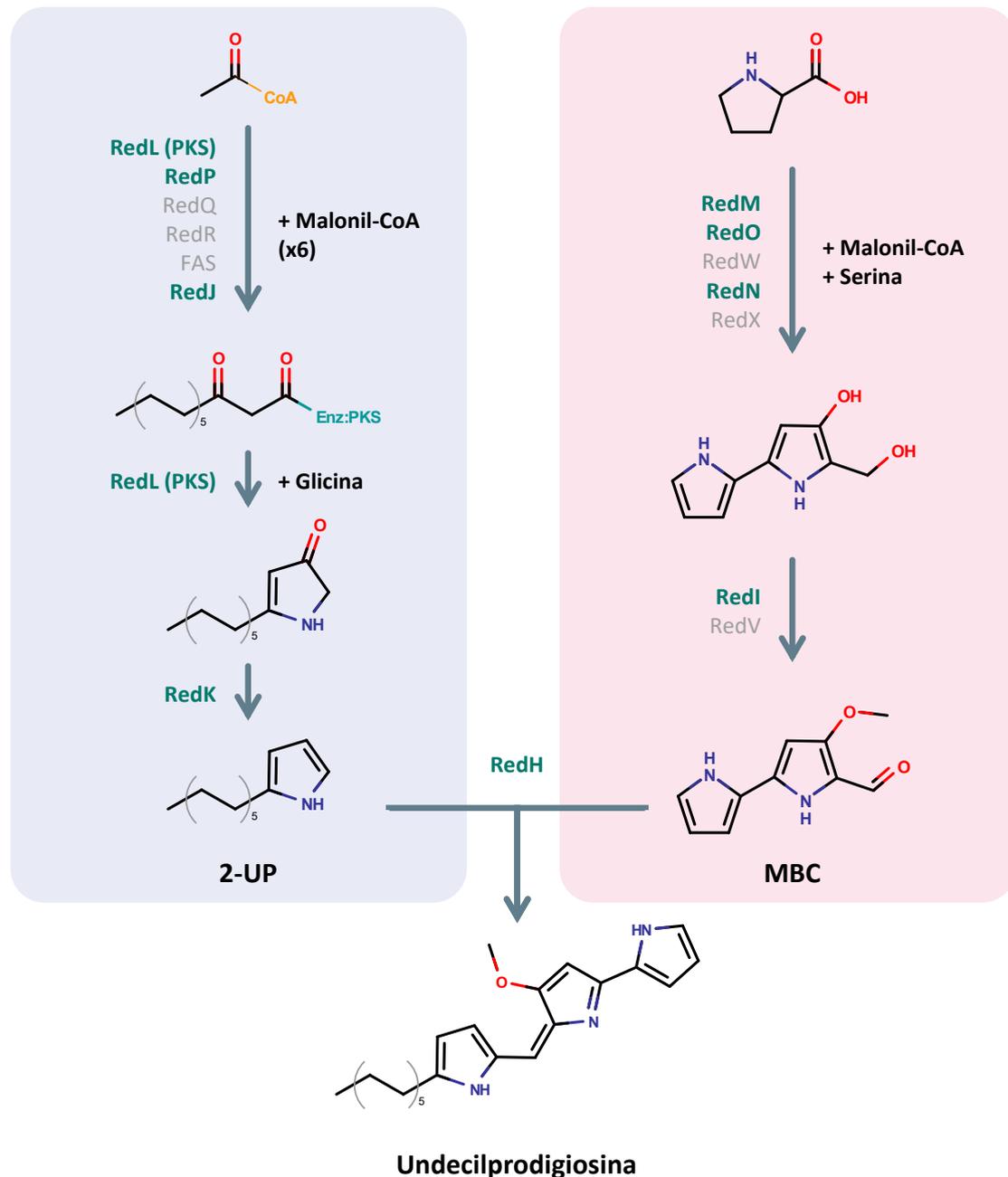
En este punto hay que destacar la similitud encontrada entre los sistemas de dos componentes AbrB1/B2 y EcrA1/A2: los reguladores de respuesta AbrB1 y EcrA2 comparten una similitud en la secuencia de aminoácidos del 65,6%, mientras que las histidinas quinasa AbrB2 y EcrA1 comparten una similitud del 46,8%. Esta relación podría indicar posibles eventos de regulación cruzada entre ambos sistemas.

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**BGC Undecilprodigiosina**  
(31,6 kbp)

■ Genes diferencialmente expresados ( $\Delta B / WT$ )



**Figura C1.16.** Clúster *red* y ruta de biosíntesis de la undecilprodigiosina. Se indican resaltados los genes pertenecientes al clúster *red* sobreexpresados en la cepa mutante  $\Delta abrB1/B2$  con respecto a la cepa silvestre, así como sus productos en la ruta de síntesis de la undecilprodigiosina (aquellos genes no expresados diferencialmente se muestran en gris).

### Biosíntesis de coelimidina

La producción de coelimidina también se vio afectada en el mutante  $\Delta abrB1/B2$ , varios genes relacionados con su síntesis se mostraron diferencialmente expresados: *cpkABC* (SCO6275-73), *cpkI* (SCO6282), *rapA1/A2* (SCO5403/04) y *scbR2* (SCO6286). Los genes *cpkABC*, que codifican el núcleo de la enzima poliquétido sintasa encargada de la síntesis de la coelimidina, se encontraron subexpresados en la cepa mutante a 24 horas; mientras que *cpkI*, que participa en etapas posteriores de la síntesis (Bednarz et al., 2019; Pawlik et al., 2007), se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas. El sistema de dos componentes *rapA1/A2* se encontró subexpresado en la cepa mutante a 36 horas; este sistema actúa como regulador positivo de la producción de coelimidina y ACT (Lu et al., 2007). Por último, como ya se mencionó en el apartado anterior “Biosíntesis de undecilprodigiosina”, *scbR2* (SCO6286), que actúa como regulador negativo de la producción de coelimidina, se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas.

El papel de AbrB1/B2 como regulador negativo de la producción de antibióticos en *S. coelicolor* parece ser contradictoria con la subexpresión de los genes relacionados con la síntesis de coelimidina en la cepa mutante carente de este sistema de dos componentes. Sin embargo, aunque tradicionalmente el papel que se ha asignado a la coelimidina ha sido de antibiótico, su función no está clara a nivel fisiológico. A pesar de la actividad antibiótica de la coelimidina A, esta molécula es altamente inestable y reacciona espontáneamente con compuestos presentes en el medio, como N-acetilcisteína y glutamato, dando lugar a coelimidina P1 y P2 respectivamente, compuestos sin ninguna propiedad antibiótica y que constituyen los productos finales de la ruta (Bednarz et al., 2019).

### Biosíntesis de actinorrodina

Aunque a nivel fenotípico se observó un aumento significativo de la producción de ACT en la cepa mutante, muy pocos genes relacionados con este proceso superaron los filtros establecidos, seguramente debido a que los tiempos analizados en el RNAseq eran un poco tempranos. Sin embargo, los sistemas de regulación previamente mencionados ScbR2 y RapA1/A2, y que mostraron expresión diferencial entre las cepas analizadas, se encuentran asociados a la producción de ACT. ScbR2 actúa como regulador positivo de la síntesis de este antibiótico, y su sobreexpresión en la cepa mutante es acorde con su fenotipo. Por el contrario, el sistema de dos componentes RapA1/A2 (también regulador positivo) se encuentra subexpresado en la cepa mutante, lo que podría indicar que ScbR2 presenta un efecto dominante sobre el mismo.

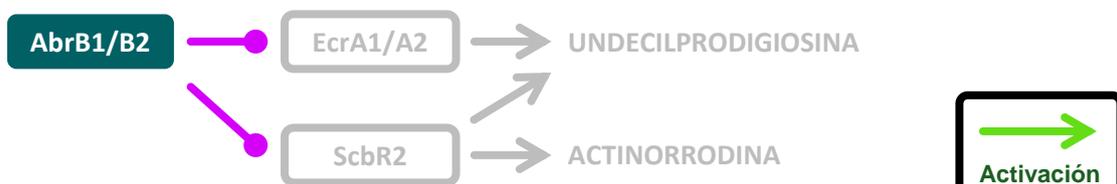
## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

Más allá de estos sistemas de regulación, se identificaron varios genes que, aunque no superaron por poco los filtros establecidos ( $0,05 < \text{padj} < 0,08$ ), son relevantes para el análisis: *actI-ORF3* (SCO5089), *actVII* (SCO5090), *actIV* (SCO5091) y *actVB* (SCO5092). Estos genes (sobrexpresados en la cepa mutante) pertenecen al clúster *act* y codifican enzimas relacionadas con la producción de ACT (Okamoto et al., 2009).

Otros genes destacables son el operón *abeBCD* (SCO3288-90), que se encontraron sobrexpresados en la cepa mutante a 24 horas, aunque con valores de FC ligeramente inferiores al establecido como filtro (en torno a 1,9). No se conoce la función de ninguno de estos genes, aunque se ha observado que su sobreexpresión incrementa la producción de ACT (Hindra & Elliot, 2010).

Los datos transcriptómicos obtenidos apoyan el papel de AbrB1/B2 como regulador negativo de la producción de antibióticos observado a nivel fenotípico. La cascada de regulación de este sistema en este proceso parece involucrar al sistema de dos componentes EcrA1/A2 en el caso de la producción de RED, y al regulador ScbR2 en el caso de la producción tanto de ACT como de RED. En definitiva, AbrB1/B2 podría estar actuando como represor de EcrA1/A2 y ScbR2, reguladores positivos de la producción de antibióticos en *S. coelicolor* (Figura C1.17).

### *S. coelicolor* M145



### *S. coelicolor* M145 $\Delta\text{abrB1/B2}$



**Figura C1.17. Modelo de regulación de la producción de antibióticos por AbrB1/B2.** Se muestra la cascada de regulación propuesta para el sistema de dos componentes AbrB1/B2 en relación a la producción de los antibióticos undecilprodigiosina y actinorrodina, comparando la cepa silvestre con la cepa mutante  $\Delta\text{abrB1/B2}$ .

C1.7.3 - Genes implicados en metabolismo primario

Los genes expresados diferencialmente entre las cepas silvestre y mutante  $\Delta abrB1/B2$  relacionados con el metabolismo primario se muestran en la *Tabla C1.3*.

**Tabla C1.3. Genes diferencialmente expresados por la delección  $\Delta abrB1/B2$  relacionados con el metabolismo primario.** Los genes sobreexpresados en la cepa mutante (FC > 2) aparecen marcados en verde; mientras que los genes subexpresados en la cepa mutante (FC < -2) aparecen marcados en rosa.

Gen	Nombre	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto	Referencia
<b>Metabolismo del hierro</b>						
SCO2113	<i>bfr</i>	36 h	-2,9	8,0E-3	Bacterioferritina	-
SCO2783	<i>desB</i>	36 h	-2,1	8,0E-3	Monooxigenasa	(Barona-Gómez et al., 2004)
SCO2785	<i>desD</i>	36 h	-2,1	8,0E-3	Sideróforo sintetasa	
<b>Gluconeogénesis</b>						
SCO2494	-	36 h	4,0	1,0E-3	Piruvato fosfato diquinasa	(Llamas-Ramírez et al., 2020)
SCO4979	<i>pckG</i>	36 h	3,7	8,0E-3	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	
<b>Oxidación de ácidos grasos</b>						
SCO6026	<i>fadB1</i>	36 h	2,4	2,3E-2	Complejo de oxidación de ácidos grasos	(Menéndez-Bravo et al., 2017)
SCO6067	<i>fadA1</i>	36 h	2,6	8,0E-3	Tiolasa	
<b>Metabolismo de la etanolamina</b>						
SCO1611	-	36 h	2,2	2,1E-5	Deshidrogenasa	(Krysenko et al., 2019)
SCO1612	-	36 h	2,3	2,2E-4	Deshidrogenasa	
SCO1613	<i>glnA4</i>	36 h	2,3	1,3E-4	Sintetasa	
<b>Biosíntesis de alanina</b>						
SCO1705	-	36 h	2,2	2,8E-2	Oxidasa	KEGG BioCyc
SCO1706	-	36 h	2,9	3,0E-3	Deshidrogenasa	
SCO6414	-	36 h	3,2	3,0E-5	Ureidopropionasa	
SCO6415	<i>hyuA</i>	36 h	3,3	8,0E-7	Hidantoinasa	
SCO6416	-	36 h	3,1	1,3E-5	Deshidrogenasa	
<b>Biosíntesis de inositol</b>						
SCO3899	<i>inoA</i>	24 h	-3,1	1,4E-93	Mio-inositol-1-fosfato sintasa	(Zhang et al., 2012)
SCO3900	<i>inoR</i>	24 h	-2,8	2,4E-35	Regulador	
<b>Degradación de metionina / cisteína</b>						
SCO1294	-	36 h	2,4	1,1E-2	Metionina gamma-liasa	-
<b>Transportadores</b>						
SCO2979	<i>aglF</i>	36 h	2,3	8,0E-3	Transportador	(Bertram et al., 2004)
SCO2980	<i>aglG</i>	36 h	2,3	8,0E-3	Transportador	
SCO5232	<i>dasA</i>	36 h	-2,4	7,0E-3	Transportador	(Saito et al., 2007)
<b>Genes de interés que no superan los filtros por poco</b>						
SCO2781	<i>viuB</i>	36 h	-2,1	7,6E-2	Producto desconocido	(Tunca et al., 2007)
SCO6732	<i>fadB2</i>	36 h	3,0	6,1E-2	Complejo de oxidación de ácidos grasos	(Menéndez-Bravo et al., 2017)
SCO6788	<i>fadA3</i>	36 h	2,6	6,0E-2	Tiolasa	
SCO6789	<i>fadB3</i>	36 h	2,5	5,1E-2	Complejo de oxidación de ácidos grasos	

### Metabolismo del hierro

Los sistemas de captación de hierro (*desBD*) y almacenamiento de hierro (*bfr*) se encontraron subexpresados en la cepa mutante a 36 horas. Los genes *desB* (*SCO2783*) y *desD* (*SCO2875*) participan en la biosíntesis de deferoxamina, sideróforo que interviene en la captación de hierro (Barona-Gómez et al., 2004). El gen *bfr* (*SCO2113*) codifica una bacterioferritina, una proteína de almacenamiento de hierro intracelular.

Otro gen destacable que no superó por poco los filtros establecidos (*padj* 0,076) fue *viuB* (*SCO2781*), que se encontró subexpresado en la cepa mutante a 36 horas. Este gen, adyacente a *desBD* y con una tendencia similar, parece estar implicado en la captación de sideróforos como la deferoxamina (Tunca et al., 2007).

El metabolismo del hierro se puede integrar con la respuesta a antibióticos y al estrés oxidativo. La acción de los antibióticos en procesos celulares esenciales (como la síntesis de la pared celular en el caso de la vancomicina) puede generar ciertas disfunciones en la cadena respiratoria. Esto daría lugar a un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), que desestabilizan los clústeres hierro-azufre presentes en múltiples proteínas, liberando hierro y dando lugar a la reacción de Fenton, lo que potencia como un bucle de retroalimentación positivo el efecto tóxico de los ROS, y a su vez del antibiótico.

### Gluconeogénesis

La cepa mutante  $\Delta$ *abrB1/B2* presentó, a 36 horas, la sobreexpresión de los genes *SCO2494* y *pckG* (*SCO4979*), implicados en los pasos iniciales de la gluconeogénesis. Ambos genes forman parte del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxalacetato (PEP-PYR-OXA), punto central en el metabolismo del carbono. El gen *SCO2494* codifica una enzima piruvato fosfato diquinasa, mientras que el gen *pckG* codifica una enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Llamas-Ramírez et al., 2020).

### Oxidación de ácidos grasos

El sistema *fadA1/B1* (*SCO6026/27*) se encontró sobreexpresado a 36 horas en la cepa mutante. Este sistema está involucrado en los pasos finales de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y es esencial en la asimilación de ácidos grasos exógenos ya que es clave en la acumulación y movilización de triacilglicerol en *S. coelicolor* (Menéndez-Bravo et al., 2017).

Otros genes destacables que no superaron por poco los filtros establecidos ( $0,05 < p_{adj} < 0,07$ ) fueron los otros sistemas implicados en los pasos finales de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos: *fadB2* (SCO6732) y *fadA3/B3* (SCO6788/89) (Menéndez-Bravo et al., 2017), que se encontraron también sobreexpresados en la cepa mutante a 36 horas.

### Metabolismo de la etanolamina

El operón *SCO1611-13* se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas. Aunque el operón completo se encuentra relacionado con el metabolismo de la etanolamina, solo *glnA4* (SCO1613) ha sido estudiado en profundidad. Gln4 es una enzima  $\gamma$ -glutamil-etanolamida sintetasa, que permite a *S. coelicolor* utilizar la etanolamina como fuente alternativa de carbono y nitrógeno. GlnA4 es inducida en presencia de etanolamina (que podría ser captada por *S. coelicolor* mediante difusión o transportadores de baja afinidad, ya que no se han identificado permeasas específicas de esta molécula), y cataliza la reacción entre glutamato y la etanolamina para dar lugar a  $\gamma$ -glutamiletanolamida. Se ha propuesto que *SCO1611* podría catalizar la deshidratación de  $\gamma$ -glutamiletanolamida para dar lugar a  $\gamma$ -glutamilacetaldehído, que a su vez sería convertido en  $\gamma$ -glutamilglicina por *SCO1612*, que finalmente podría ser hidrolizada a glicina y glutamato, aunque estas últimas reacciones no se han demostrado experimentalmente en *S. coelicolor* (Krysenko et al., 2019; Reuther & Wohlleben, 2007; Rexer et al., 2006).

La etanolamina es uno de los componentes de la fosfatidil-etanolamina, principal fosfolípido en las membranas bacterianas, por lo que el metabolismo de este compuesto se podría relacionar directamente con la oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la resistencia a vancomicina, y podría indicar la coordinación de estos procesos dentro de la cascada de regulación del sistema AbrB1/B2. Los antibióticos activos contra la pared celular (y en general cualquier daño contra este componente de la célula) pueden dar lugar a lisis celular y a la liberación de membranas celulares al medio. La utilización de estas membranas, y en concreto de sus fosfolípidos constituyentes, como fuente energética se lleva a cabo a través de la oxidación de ácidos grasos y la metabolización de la etanolamina, lo que a su vez afecta a otros procesos metabólicos como un favorecimiento de la gluconeogénesis frente a la glucólisis.

### Biosíntesis de alanina

La cepa mutante  $\Delta$ *abrB1/B2* presentó la sobreexpresión a 36 horas de varios genes implicados en la biosíntesis de alanina: *SCO1705/06* y *SCO6414/15/16*, de acuerdo con las bases de datos *KEGG* (Kanehisa et al., 2021) y *BioCyc* (Karp et al., 2018).

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

La alteración en la síntesis de alanina podría estar relacionada con la resistencia a vancomicina, ya que los cambios en la síntesis de la pared celular que dirige el clúster *van* suponen una alteración de los requerimientos de alanina (se modifica el extremo D-Ala-D-Ala del Lípido II por D-Ala-D-Lac).

### **Biosíntesis de inositol**

El operón *inoAR* (*SCO3899/3900*) se encontró subexpresado a 24 horas en la cepa mutante *ΔabrB1/B2*. Este operón, que permite la biosíntesis de inositol, está formado por el regulador InoR y la enzima mio-inositol-fosfato sintasa InoA. Aunque el inositol normalmente está relacionado con el proceso de diferenciación como precursor de fosfolípidos de membrana (Zhang et al., 2010, 2012), esta molécula también juega un papel como precursor del micotiol, un compuesto que protege a *S. coelicolor* del estrés oxidativo, como el glutatión en otros organismos (Park & Roe, 2008). La ausencia de diferencias fenotípicas significativas a nivel de desarrollo entre las cepas silvestre y mutante parecen indicar que, en las condiciones estudiadas, la síntesis de inositol esté más relacionada con la respuesta a estrés oxidativo (comparten la misma tendencia de expresión diferencial) que con el proceso de diferenciación.

### **Degradación de metionina / cisteína**

El gen *SCO1294* se encontró sobreexpresado en *S. coelicolor* a 36 horas. Aunque este gen no ha sido estudiado en *S. coelicolor*, su homólogo en *S. avermitilis*, *SAV7062* (con el que comparte una identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos del 80%, inclusive los residuos esenciales Lys221 y Tyr131), se ha descrito como una enzima L-metionina- $\gamma$ -liasa que degrada metionina, cisteína y derivados (Kudou et al., 2015). La alteración de la degradación de metionina / cisteína podría estar relacionada con la alteración en la respuesta a estrés oxidativo identificada, ya que se requiere de cisteína para la síntesis de micotiol que se ha mencionado previamente (en el apartado “Biosíntesis de inositol”).

### **Transportadores**

Varios sistemas de transporte se encontraron diferencialmente expresados entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

El operón *aglFG* (*SCO2979/80*) se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas. Estudios *in silico* sugieren que estos genes codifican una permeasa de  $\alpha$ -glucósidos (Bertram et al., 2004).

El gen *dasA* (*SCO5232*) se encontró subexpresado en la cepa mutante a 36 horas. DasA participa en el sistema de captación de N,N'-diacetil-quitobiosa y moléculas similares como N-acetil-glucosamina (Saito et al., 2007). Aunque el papel de DasA normalmente se relaciona con el metabolismo de la quitina, en el contexto estudiado podría estar relacionado con la remodelación de la pared celular del mecanismo de resistencia a vancomicina, en cuanto al reciclaje de la N-acetil-glucosamina de la pared celular.

#### C1.7.4 - Genes implicados en desarrollo y diferenciación

Los genes expresados diferencialmente entre las cepas silvestre y mutante  $\DeltaabrB1/B2$  relacionados con el desarrollo y diferenciación se muestran en la *Tabla C1.4*.

**Tabla C1.4. Genes diferencialmente expresados por la delección  $\DeltaabrB1/B2$  relacionados con los procesos de desarrollo / diferenciación.** Los genes sobreexpresados en la cepa mutante (FC > 2) aparecen marcados en verde.

Gen	Nombre	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto	Referencia
<i>SCO4002</i>	<i>nepA</i>	36 h	2,5	7,0E-3	Proteína estructural	(De Jong et al., 2009)
<i>SCO6682</i>	<i>ramS</i>	24 h	2,9	4,5E-9	Péptido SapB	(Kodani et al., 2004)
<i>SCO7314</i>	<i>sigM</i>	24 h	2,1	6,6E-7	Factor sigma de la RNA polimerasa	(Lee et al., 2005)

El gen *nepA* (*SCO4002*) se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 36 horas. NepA es una proteína estructural de la pared celular y está relacionada con el mantenimiento del proceso de latencia de las esporas en condiciones desfavorables (Dalton et al., 2007; De Jong et al., 2009).

El gen *ramS* (*SCO6682*) se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 24 horas. RamS es el precursor de SapB, un péptido morfogenético que interviene como surfactante en el desarrollo del micelio aéreo (Kodani et al., 2004).

El gen *sigM* (*SCO7314*) se encontró sobreexpresado en la cepa mutante a 24 horas. El Factor Sigma M (SigM) constituye el último paso en la cascada de regulación del Factor Sigma B (*sigB*, *SCO0600*), y participa en los procesos de diferenciación y protección frente a estrés oxidativo y osmótico (Lee et al., 2005). La ruta del Factor Sigma B induce la respuesta a estrés oxidativo vía Factor Sigma M al controlar la expresión de la catalasa CatB (*SCO0666*). Aunque esto parece estar en contradicción con la subexpresión del sistema de respuesta a estrés oxidativo hidropéroxido-reductasa que presenta el mutante  $\DeltaabrB1/B2$ , hay que tener en cuenta que el sistema catalasa y el sistema hidropéroxido-reductasa actúan de forma alternativa, por lo que el papel de SigM podría tener que ver con la coordinación del estrés oxidativo más que con su

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

inducción propiamente dicha a nivel global. SigM está controlado por el factor anti-sigma RsmA (SCO7313); sin embargo, esta regulación no está dada por los niveles de RsmA sino por la presencia de un clúster hierro-azufre en este regulador (Gaskell et al., 2007), por lo que, aunque la expresión de *rsmA* no se ve alterada en las condiciones estudiadas, su acción puede encontrarse alterada como consecuencia de las diferencias observadas en el metabolismo del hierro y la respuesta a estrés oxidativo.

No se observaron cambios fenotípicos significativos en el crecimiento, desarrollo ni diferenciación entre las cepas silvestre y mutante, a pesar de la expresión diferencial de estos tres genes. En el caso de *nepA*, su expresión diferencial podría tratarse de un efecto secundario de la remodelación de la pared celular debida a la resistencia a vancomicina, ya que codifica una proteína estructura ubicada en la pared celular. En el caso de *ramS*, la ausencia de cambios fenotípicos en medio mínimo ya se ha descrito previamente, puesto que solo las chaplinas ChpA-H son necesarias para la formación del micelio aéreo en este medio (Capstick et al., 2007; Kodani et al., 2004), y su expresión diferencial (*ramS*) también podría estar provocada por la remodelación de la pared celular. Finalmente, en el caso de *sigM*, podría deberse a que su papel en las condiciones estudiadas esté más relacionado con la coordinación de la respuesta a estrés oxidativo que con el proceso de diferenciación.

### C1.7.5 - Otros genes diferencialmente expresados

Los genes expresados diferencialmente entre las cepas silvestre y mutante  $\DeltaabrB1/B2$  cuya función y/o papel biológico se desconocen se muestran en la [Tabla C1.5](#).

Un gen destacable es SCO7536, que presentó las mayores diferencias de expresión a 24 horas (FC -17) y a 36 horas (FC -27), y codifica para un potencial exportador de drogas, aunque no hay ningún estudio acerca del mismo.

**Tabla C1.5. Genes diferencialmente expresados por la delección  $\DeltaabrB1/B2$  con función y/o papel biológico desconocidos.** Los genes sobreexpresados en la cepa mutante (FC > 2) aparecen marcados en verde; mientras que los genes subexpresados en la cepa mutante (FC < -2) aparecen marcados en rosa.

Gen	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto
SCO0644	36 h	-2,1	3,0E-3	Producto desconocido
SCO1105	36 h	2,5	1,5E-5	Producto desconocido
SCO1528	36 h	2,9	1,9E-2	Factor de elongación G
SCO1550	24 h	-2,2	8,7E-15	Producto desconocido
	36 h	-2,2	3,0E-3	
SCO1573	36 h	-2,1	2,8E-2	Oxidorreductasa
SCO1700	36 h	-2,0	2,5E-2	Producto desconocido
SCO1746	36 h	3,0	6,0E-5	Proteasa

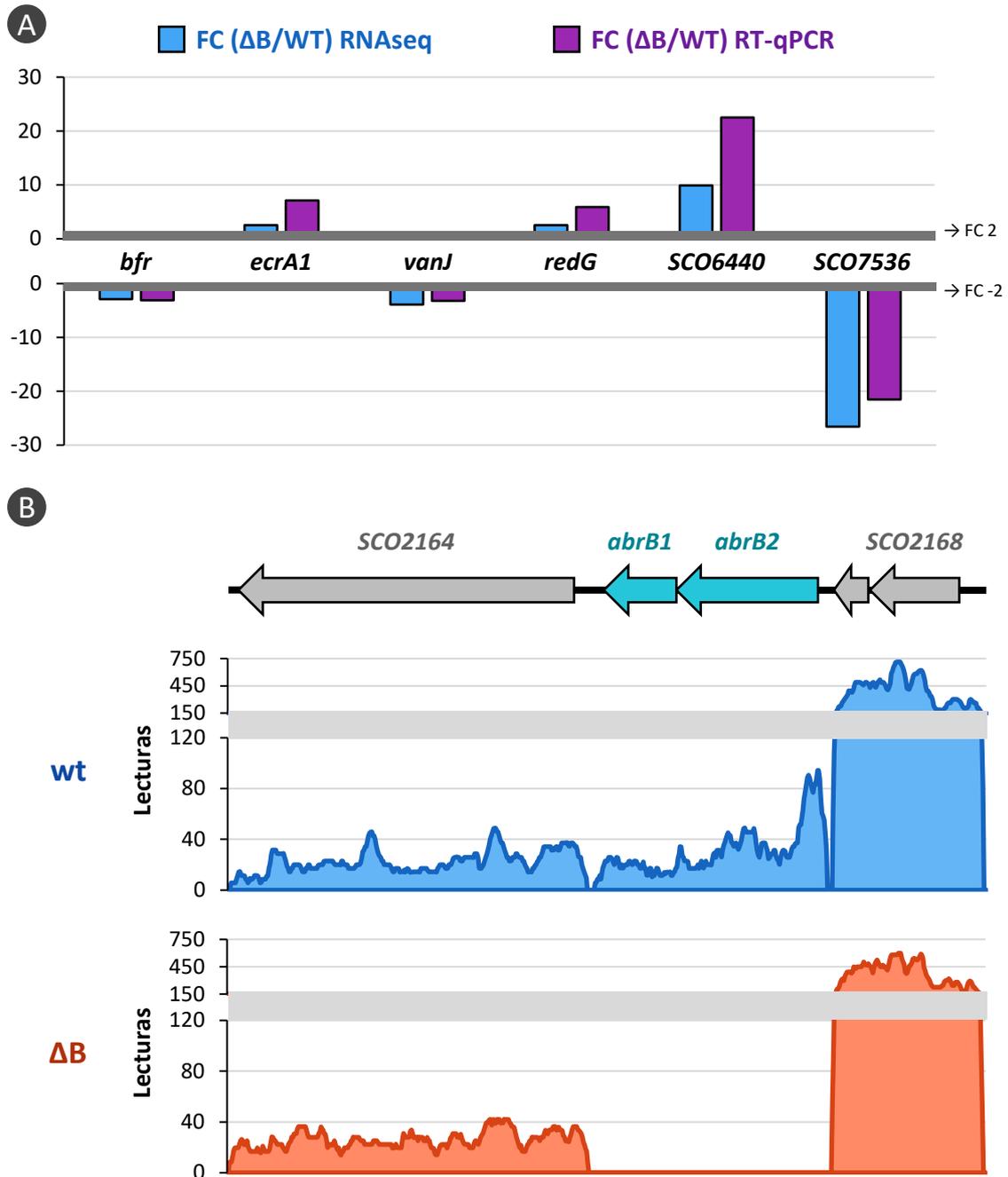
Gen	Tiempo	FC ( $\Delta B/WT$ )	padj	Producto
SCO2275	36 h	2,1	2,1E-2	Transportador
SCO2360	36 h	-4,0	2,0E-3	Producto desconocido
SCO2616	36 h	3,0	1,0E-3	Producto desconocido
SCO2722	36 h	-5,3	5,6E-13	Transportador
SCO2723	36 h	-6,6	9,3E-20	Transportador
SCO2967	36 h	-2,1	1,0E-2	Proteasa
SCO3657	36 h	2,9	1,5E-5	Producto desconocido
SCO4011	36 h	-2,5	7,7E-6	Producto desconocido
SCO4043	36 h	-2,0	2,7E-2	Producto desconocido
SCO4189	36 h	3,0	2,0E-3	Producto desconocido
SCO4214	36 h	-2,2	2,1E-2	Producto desconocido
SCO4902	24 h	2,4	3,1E-7	Proteína de unión a ATP
SCO5142	36 h	-2,2	3,9E-2	Producto desconocido
SCO5207	36 h	4,2	3,2E-4	Producto desconocido
SCO5249	36 h	3,1	7,4E-7	Proteína de unión a nucleótidos
SCO5250	36 h	2,3	3,1E-2	Poliprenil sintetasa
SCO5402	36 h	-3,4	1,0E-3	Proteasa
SCO5447	36 h	5,5	2,7E-12	Proteasa
SCO5575	36 h	-2,0	4,2E-2	Producto desconocido
SCO6045	36 h	2,7	3,8E-5	Producto desconocido
SCO6440	36 h	9,9	5,6E-13	Sintasa
SCO6441	36 h	9,8	2,2E-14	Deshidrogenasa
SCO6442	36 h	9,4	2,7E-13	Deshidrogenasa
SCO6443	36 h	9,4	4,2E-10	Metiltransferasa
SCO6543	36 h	4,0	4,0E-3	Producto desconocido
SCO6728	36 h	-2,6	1,9E-2	Producto desconocido
SCO6931	24 h	2,3	4,5E-5	Producto desconocido
SCO7013	24 h	7,1	8,8E-13	Proteína de unión a soluto extracelular
SCO7014	24 h	4,2	2,2E-5	Regulador
SCO7229	36 h	-2,2	3,9E-2	Producto desconocido
SCO7460	36 h	-2,3	6,8E-5	Producto desconocido
SCO7536	24 h	-17,2	4,8E-254	Transportador
	36 h	-26,6	1,2E-51	
SCO7612	36 h	-2,4	2,1E-5	Producto desconocido

### C1.7.6 - Validación de los resultados

Para validar los resultados obtenidos mediante RNAseq, se analizó la expresión diferencial de varios genes mediante RT-qPCR; se seleccionaron tanto genes sobreexpresados como subexpresados en la cepa mutante que estuvieran implicados en diferentes procesos biológicos (producción de antibióticos, respuesta a estrés, etc.): *bfr* (SCO2113), *ecrA1* (SCO2518), *vanJ* (SCO3592), *redG* (SCO5897), SCO6440 y SCO7536. La tendencia de expresión diferencial obtenida para todos estos genes fue la misma tanto por RT-qPCR como por RNAseq. En el caso de los genes subexpresados en la cepa mutante, los valores de FC fueron similares; mientras que en los genes sobreexpresados en la cepa mutante, se observaron FC aún mayores por RT-qPCR (Figura C1.18.A).

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

Adicionalmente, se comprobaron las lecturas obtenidas mediante el RNAseq en la región correspondiente a los genes *abrB1/B2*. En la cepa silvestre se detectó la expresión de ambos genes como operón, y de forma independiente a los genes adyacentes. En la cepa mutante, no se obtuvo ninguna lectura en la región deletada, tal y como era de esperar (Figura C1.18.B).



**Figura C1.18. Validación de los resultados obtenidos por RNAseq.** [A] Comparación de los FC de varios genes diferencialmente expresados en la cepa  $\Delta abrB1/B2$  obtenidos por RNAseq y por RT-qPCR. [B] Lecturas obtenidas por RNAseq en la región genómica 2326280-2333070 (incluye los genes SCO2164-68) en una de las muestras de la cepa silvestre y en una de las muestras de la cepa mutante (en ambos casos de 36 horas de cultivo).

### C1.7.7 - Búsqueda de motivos implicados en la regulación de AbrB1/B2

Se analizaron los promotores de los genes diferencialmente expresados obtenidos cuando se delecta AbrB1/B2, para buscar potenciales motivos implicados en la regulación que ejerce este sistema. Este análisis se realizó mediante las herramientas *MEME* (Bailey & Elkan, 1994) y *GLAM2* (Frith et al., 2008).

No se encontraron potenciales motivos implicados en la regulación de AbrB1/B2. Esto podría indicar que el motivo de unión a DNA que reconoce el regulador de respuesta AbrB1 es muy degenerado, por lo que los algoritmos de búsqueda utilizados no pudieron identificarlo.

### C1.8 - Análisis de la resistencia a vancomicina

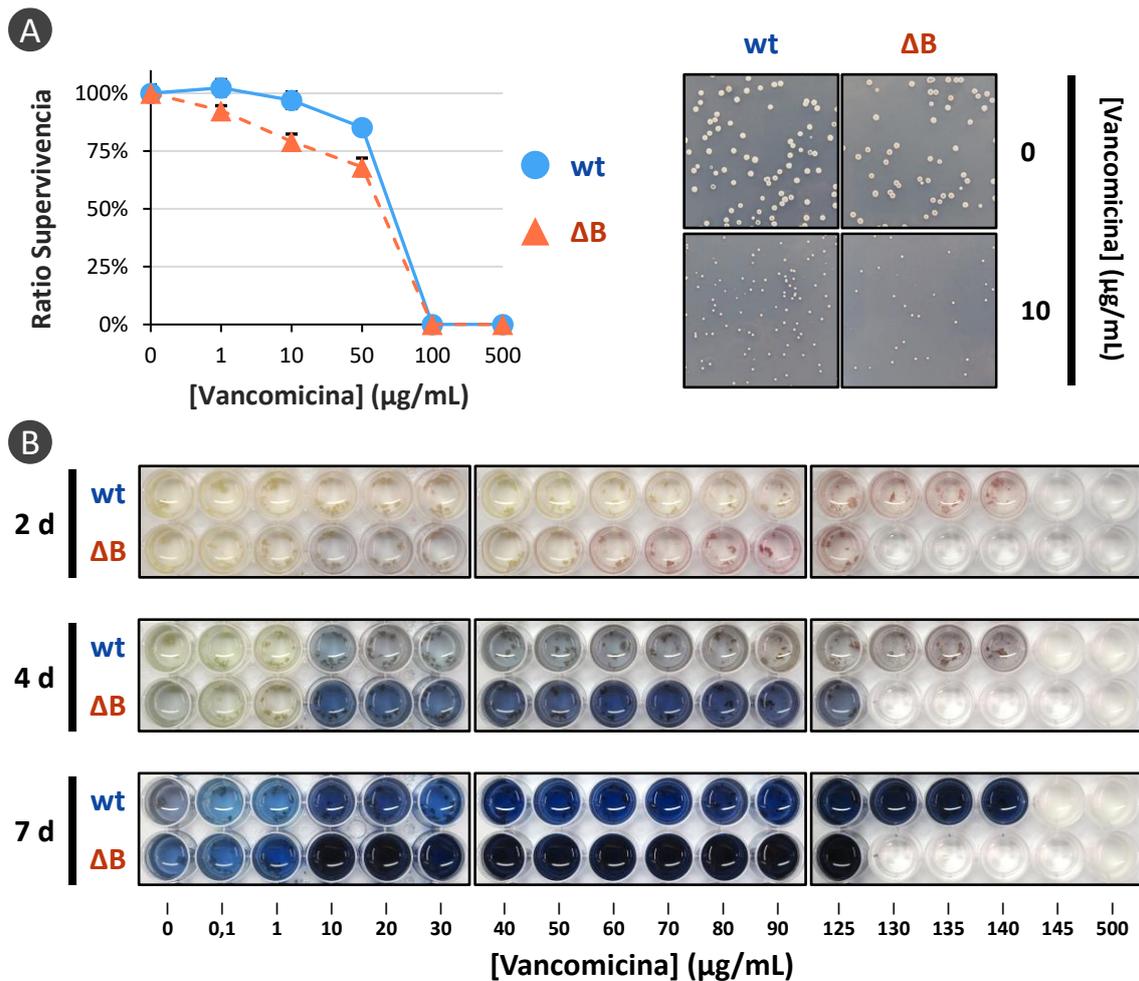
AbrB1/B2 parece controlar los niveles basales de expresión del clúster de resistencia a vancomicina (*vanSRJKHAX*), tal y como mostraron los resultados del análisis transcriptómico. Sin embargo, esto no indica necesariamente que afecte al nivel de resistencia a vancomicina de *S. coelicolor*, ya que el operón de resistencia *van* responde a la presencia del antibiótico a través del sistema de dos componentes VanSR.

Para determinar el papel de AbrB1/B2 en este proceso se analizó el comportamiento fenotípico de las cepas silvestre y mutante  $\Delta$ *abrB1/B2* en respuesta a concentraciones crecientes de vancomicina en el medio. Por un lado, se analizó la ratio de supervivencia de esporas de ambas cepas en medio NMMP sólido (*Figura C1.19.A*). Por otro lado, se analizó la concentración mínima inhibitoria de ambas cepas a la vancomicina en medio NMMP líquido (*Figura C1.19.B*).

La delectación del sistema AbrB1/B2 incrementa la susceptibilidad de *S. coelicolor* a la vancomicina, ya que disminuye la ratio de supervivencia de sus esporas frente a este antibiótico, así como la concentración de antibiótico necesaria para inhibir su crecimiento. Estos resultados, junto con la alteración de los niveles basales de expresión del clúster de resistencia *van*, indican que el sistema AbrB1/B2 contribuye a la resistencia a vancomicina en *S. coelicolor*.

Aunque el principal interés a la hora de estudiar AbrB1/B2 fue su implicación en la producción de antibióticos, su participación en la resistencia a vancomicina podría ser clave en cuanto a su papel fisiológico. Además, este proceso presenta un especial interés ya que está alineado con una de las principales motivaciones de este trabajo, hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos.

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**Figura C1.19. Análisis de la resistencia a vancomicina.** [A] Ratio de supervivencia de esporas de las cepas silvestre (wt) y mutante ( $\Delta B$ ) frente a concentraciones crecientes de vancomicina. Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas. A la derecha se muestra fotografías de las colonias de ambas cepas en ausencia de antibiótico y frente a 10  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina (todas las fotografías se corresponden a secciones de 4 cm de las placas). [B] Análisis del crecimiento de las cepas silvestre (wt) y mutante ( $\Delta B$ ) tras 2, 4 y 7 días de cultivo en presencia de concentraciones crecientes de vancomicina. El color rojo que muestra el micelio se corresponde con la undecilprodigiosina; el color azul de los pocillo se corresponde con la actinorrodina.

### C1.9 - AbrB1/B2, homólogo de VraR/S y LiaR/S

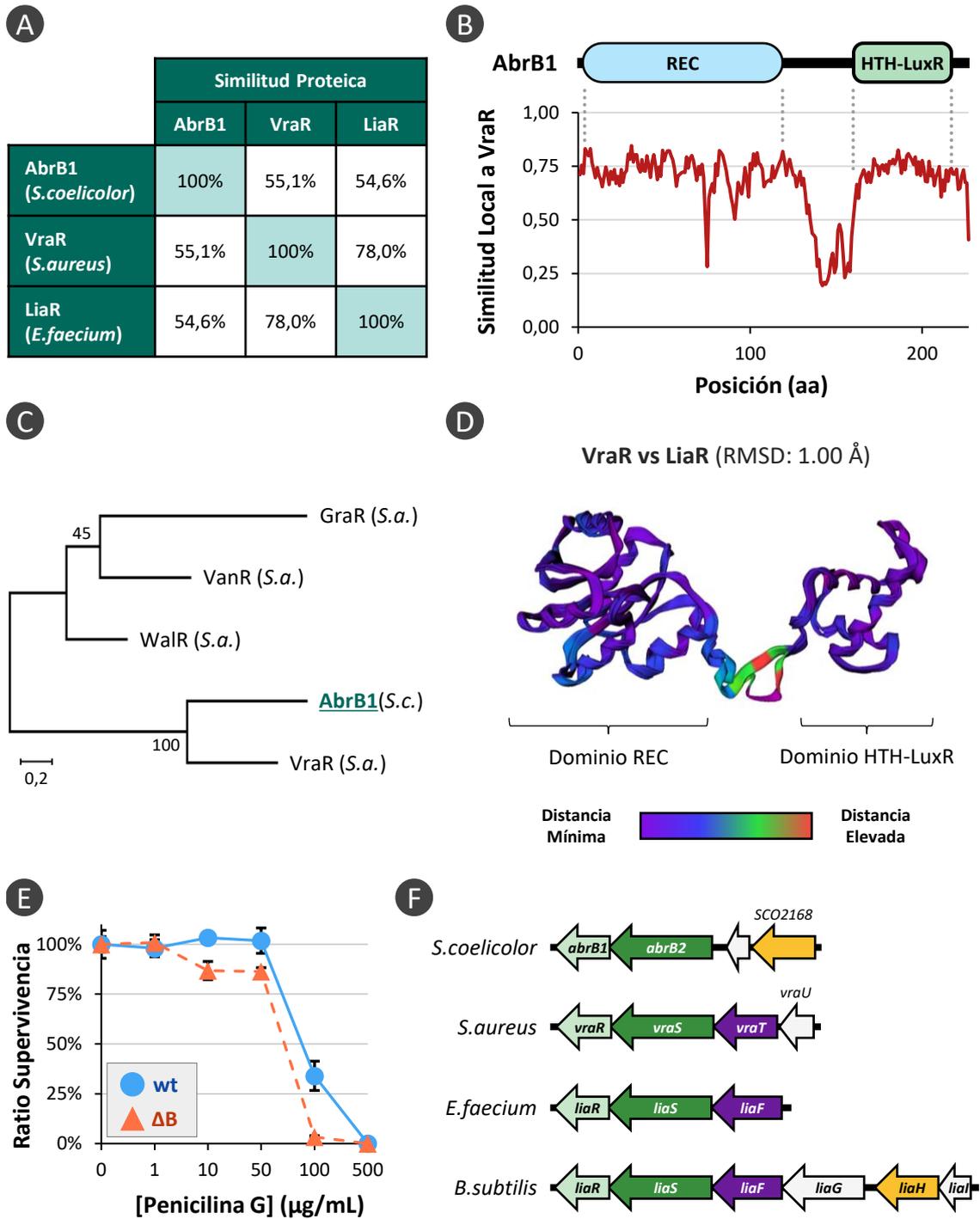
El papel de AbrB1/B2 en la resistencia a vancomicina nos llevó a buscar homólogos de este sistema en bacterias de relevancia clínica, como enterococos, cuyas cepas resistentes a vancomicina (VRE) constituyen una seria amenaza para la salud pública. La búsqueda y análisis se realizaron fundamentalmente en base a los RR, mucho mejor conservados entre las distintas especies en comparación con las HK y, además, mucho mejor caracterizados y estudiados.

En la literatura, uno de los pocos sistemas descrito que regula a VanR/S (como AbrB1/B2 en *S. coelicolor*, tal y como se ha observado en este trabajo) es VraR/S en *Staphylococcus aureus* (Qureshi et al., 2014). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre AbrB1 y VraR mostró una identidad y una similitud del 34% y del 55% respectivamente (*Figura C1.20.A*), similar a la descrita para otros homólogos presentes en ambas especies. La similitud de secuencia a nivel local entre ambos reguladores de respuesta es incluso más reveladora (*Figura C1.20.B*), ya que tanto el dominio de fosforilación/oligomerización (REC) como el dominio de unión a DNA (HTH-LuxR) presentan mayor similitud que la media global (la sección que une ambos dominios se encuentra muy poco conservada, lo que disminuye la similitud global). Es más, se realizó un análisis filogenético entre AbrB1 (*S. coelicolor*), VraR (*S. aureus*) y otros reguladores de respuesta involucrados en la resistencia a vancomicina en *S. aureus* (VanR, WalR y GraR), que mostró que VraR presenta una relación más próxima a AbrB1 que a los otros reguladores presentes en el estafilococo (*Figura C1.20.C*).

Resultados similares se encontraron cuando se comparó AbrB1 con LiaR, perteneciente al TCS LiaRS presente en *Enterococcus faecium* (y en otros muchos organismos como *Bacillus subtilis* o *Streptococcus mutans*). Es destacable además que VraR y LiaR son homólogos muy cercanos, ya que presentan una alta similitud a nivel de secuencia proteica (similitud del 78%, e identidad del 59%), una estructura terciaria casi idéntica (en ambos casos, la estructura terciaria ha sido obtenida experimentalmente por difracción de rayos X), y un papel biológico similar (*Figura C1.20.A-D*).

Tanto VraR/S como LiaR/S están involucrados en la respuesta a estrés de las envueltas celulares, y parecen detectar perturbaciones en la pared celular más que a un determinado antibiótico (como sucede por ejemplo en el caso del sistema VanR/S); aunque la señal o señales específicas de activación no están claras (Draper et al., 2015; Gardete et al., 2006; Klinzing et al., 2013; Kuroda et al., 2003; Mascher et al., 2004; Qureshi et al., 2014; Suntharalingam et al., 2009; Tierney & Rather, 2019; Yin et al., 2006). Ambos sistemas responden a daños en esta envuelta celular a través de la activación de sistemas involucrados en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (como la ruta de biosíntesis de peptidoglicano) y otros procesos celulares claves (Chen, Xiong, et al., 2016; Draper et al., 2015; Gardete et al., 2006; Klinzing et al., 2013; Kuroda et al., 2003; Suntharalingam et al., 2009; Tierney & Rather, 2019).

CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2



**Figura C1.20. AbrB1/B2, homólogo de VraR/S y LiaR/S.** [A] Similitud global de la secuencia proteica entre los reguladores AbrB1 (*Streptomyces coelicolor*), VraR (*Staphylococcus aureus*) y LiaR (*Enterococcus faecium*). [B] Similitud local de la secuencia proteica entre los reguladores AbrB1 (*S.coelicolor*) y VraR (*S.aureus*). [C] Análisis filogenético de los siguientes reguladores de respuesta implicados en la resistencia a vancomicina: AbrB1 (*S.coelicolor*), VraR, VanR, WalR y GraR (todos ellos de *S.aureus*). La fiabilidad se evaluó mediante un test *Bootstrap* de 1000 réplicas (los porcentajes obtenidos se muestran en los nodos). [D] Comparación de las estructuras de VraR de *S.aureus* (PDB ID: 4IF4) y LiaR de *E.faecium* (PDB ID: 5HEV). [E] Ratio de supervivencia de esporas de las cepas silvestre (wt) y mutante ( $\Delta B$ ) frente a concentraciones crecientes de penicilina G. Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas. [F] Contexto genómico de los sistemas AbrB (*S.coelicolor*), Vra (*S.aureus*) y Lia (*E.faecium* y *B.subtilis*).

Para determinar si el papel de AbrB1/B2 era similar, se analizó la capacidad de supervivencia de esporas de las cepas silvestre y mutante  $\Delta abrB1/B2$  en medio sólido NMMP con concentraciones crecientes de penicilina G, un antibiótico  $\beta$ -lactámico que inhibe la síntesis de la pared celular, aunque de forma distinta a la vancomicina, ya que en este caso inhibe a la enzima transpeptidasa encargada de formar los entrecruzamientos en el peptidoglucano (*Figura C1.20.E*). Se observó que el mutante  $\Delta abrB1/B2$  presentó una mayor sensibilidad a este antibiótico.

Los genes adyacentes a estos sistemas también son relevantes (*Figura C1.20.F*). En el caso de VraR/S, que forma parte del operón *vraUTSR* en *Staphylococcus aureus*, se ha observado que VraT es una proteína de membrana que podría detectar daños en la pared celular e interactuar con VraS para permitir la activación de VraR y por ende, la respuesta a estrés regulada por este sistema (Boyle-Vavra et al., 2013). En el caso de LiaR/S, otro de los componentes de su operón, la proteína de membrana LiaF, es la que parece participar en la activación de la respuesta a estrés (Jordan et al., 2006; Tran et al., 2015). En el caso de *Streptomyces coelicolor*, AbrB1/B2 no está asociada a ninguna proteína de membrana que pueda estar implicada en la activación del sistema como VraT o LiaF, ya que el operón solo está formado por *abrB1/B2*. Sin embargo, el gen *SCO2168*, cercano al sistema, es homólogo a *pspA*, y ha sido estudiado en *Streptomyces lividans* (Vrancken et al., 2008), donde se ha observado su participación en la respuesta a estrés de la membrana plasmática. De hecho, un homólogo de PspA es LiaH de *Bacillus subtilis* (en este organismo el clúster *lia* está formado por dos operones: *liaIH* y *liaGFSR*), y se ha observado que también interviene en la respuesta a daños en la pared celular (Jordan et al., 2006; Tran et al., 2015). Aunque el gen *SCO2168* no parece estar regulado por AbrB1/B2 en las condiciones estudiadas, ya que la eliminación del sistema no da lugar a una expresión diferencial de este gen, es interesante su proximidad en el genoma, su conservación a nivel evolutivo y la participación en la respuesta a daños en las envolturas celulares.

Teniendo todo esto en cuenta, el papel fisiológico de AbrB1/B2 podría estar relacionado con la detección de daño en la pared celular (de forma similar a VraR/S y LiaR/S) y la regulación de sistemas que participan en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, como el clúster *van*, cuyo sistema de dos componentes VanR/S detecta moléculas de vancomicina y promueve la remodelación de la pared celular como protección.

Hasta ahora, la principal ruta de control de la integridad de la pared celular descrita en *S. coelicolor* era la formada por el TCS CseC/B, que responde a daños en esta envoltura (proceso en el que está implicada la lipoproteína CseA) y activa la ruta del factor sigma de función extracitoplasmática SigE, que controla la composición de la pared celular y está relacionado con

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

el clúster *van* (Hong et al., 2002; Hutchings, Hong, Leibovitz, et al., 2006; Paget, Chamberlin, et al., 1999; Paget, Leibovitz, et al., 1999). CseC/B también actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos (de forma similar a AbrB1/B2) y regulador positivo del proceso de esporulación. Sin embargo estos efectos solo aparecen a bajas concentraciones de magnesio (0,1 mM) y no a alto niveles (2,0 - 5,0 mM), que son las condiciones en las que se ha estudiado AbrB1/B2, por lo que pueden actuar como sistemas alternativos de control de la integridad de la pared celular en diferentes situaciones.

Finalmente hay que destacar que en *S. coelicolor* la resistencia a vancomicina es dependiente de los niveles de fosfato, ya que altas concentraciones del mismo en el medio incrementan la susceptibilidad a este antibiótico. Sin embargo, este proceso no está mediado por el principal regulador del metabolismo del fosfato, el sistema de dos componentes PhoR/P (Santos-Beneit & Martín, 2013), sino que parece estar relacionado con el metabolismo de la pared celular, ya que la delección o mutación de genes implicados en este proceso superan el efecto del fosfato en la resistencia a vancomicina (Santos-Beneit, 2018; Santos-Beneit et al., 2014).

### C1.10 - Modelización estructural del regulador de respuesta AbrB1

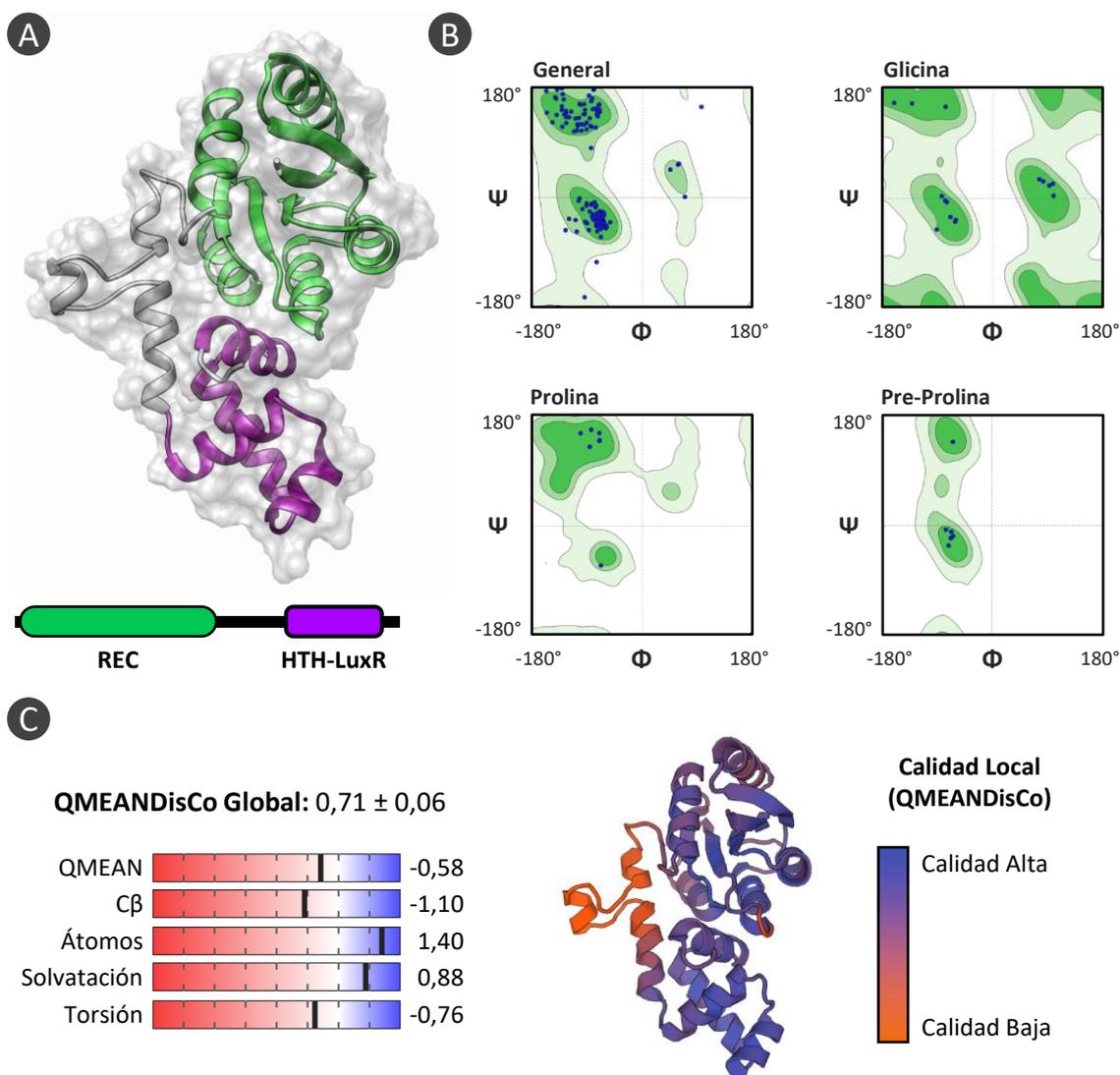
La estructura de los homólogos de AbrB1, VraR y LiaR, ha sido determinada experimentalmente (Tabla C1.6), lo que ha permitido establecer su dinámica molecular así como los residuos claves para que estos reguladores lleven a cabo su función (Davlieva et al., 2015, 2016; Donaldson, 2008; Leonard et al., 2013).

**Tabla C1.6. Modelos estructurales de los homólogos de AbrB1: VraR (*S. aureus*) y LiaR (*E. faecium*).**

PDB ID	Proteína	Estado	Método	Resolución	R <sub>free</sub>	R <sub>work</sub>	Referencia
4GVP	VraR	Inactivo	Difracción Rayos-X	2,03 Å	0,229	0,172	(Leonard et al., 2013)
4IF4	VraR	Activo-BeF <sub>3</sub>	Difracción Rayos-X	2,35 Å	0,226	0,181	(Leonard et al., 2013)
5HEV	LiaR	Activo-BeF <sub>3</sub>	Difracción Rayos-X	3,19 Å	0,270	0,219	(Davlieva et al., 2016)

\*Sólo se incluyen los modelos estructurales de las proteínas completas, no aquellos correspondientes únicamente al dominio de unión al DNA (VraR-*S.aureus*: 2RNJ; LiaR-*E.faecalis*: 4WSZ, 4WT0, 4WU4, 4WUH, 4WUL).

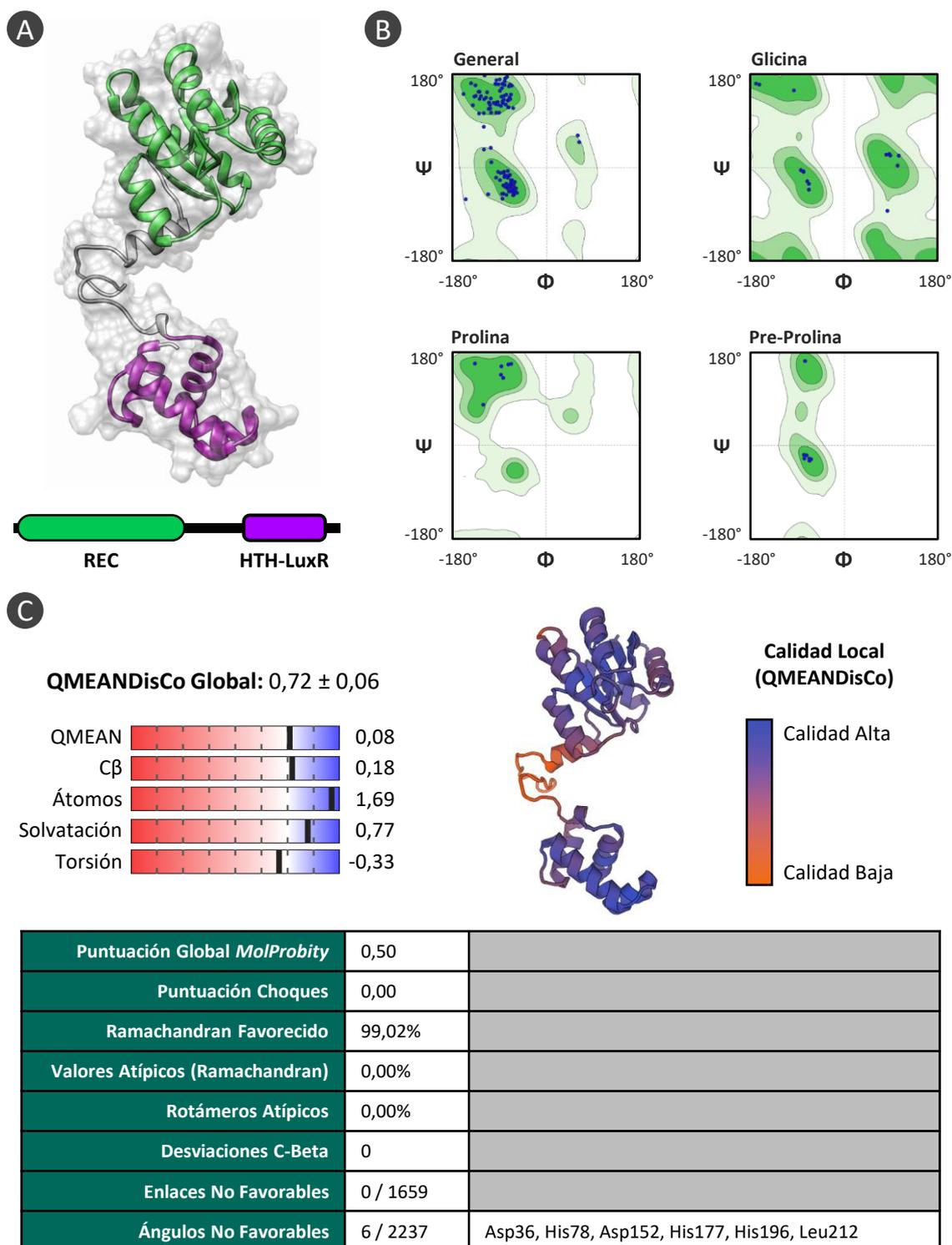
Se llevó a cabo la modelización estructural por homología del regulador de respuesta AbrB1 mediante *SWISS-Model* (Waterhouse et al., 2018). Las estructuras de VraR se utilizaron como modelo: en el caso del regulador inactivo se empleó la estructura 4GVP, mientras que en el caso del regulador activo se empleó la estructura 4IF4. Las estructuras de AbrB1 obtenidas se refinaron y optimizaron mediante *GalaxyRefine2* (Lee et al., 2019), y su calidad se evaluó mediante *MolProbity* (Williams et al., 2018) (Figura C1.21, Figura C1.22).



Puntuación Global <i>MolProbity</i>	0,50	
Puntuación Choques	0,00	
Ramachandran Favorecido	98,54%	
Valores Atípicos (Ramachandran)	0,49%	Ala138
Rotámeros Atípicos	0,00%	
Desviaciones C-Beta	6	Ser75, Leu136, Ile137, Ala138, Arg151, Glu187
Enlaces No Favorables	0 / 1677	
Ángulos No Favorables	12 / 2261	Asp10, Met28, His78, Leu136, Ala138, Arg151, Asp152, His177, His196, (Asp152-Pro153)

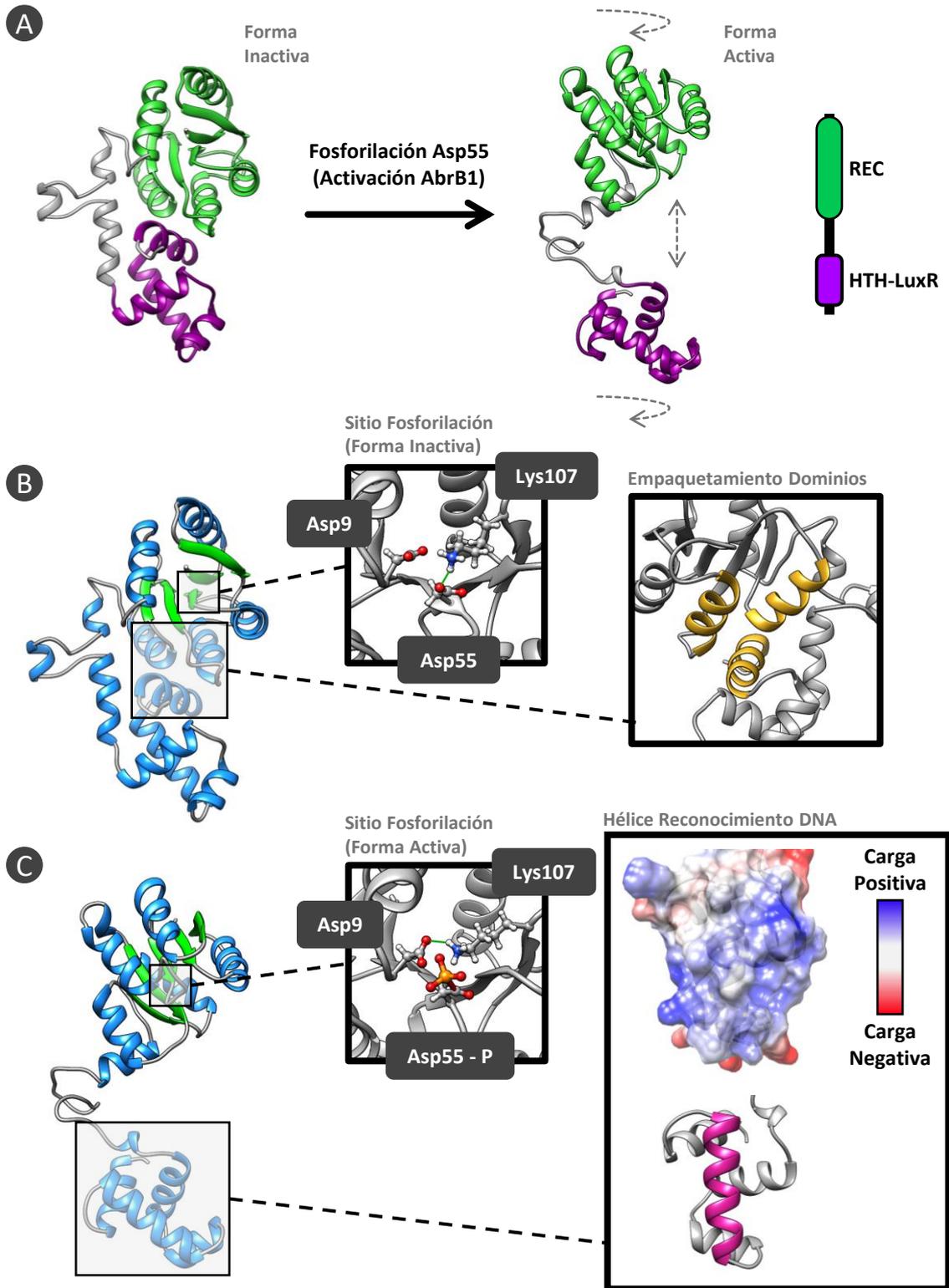
**Figura C1.21. Evaluación de la calidad del modelo estructural de AbrB1 (estado inactivo).** [A] Modelo estructural de AbrB1 en estado inactivo; se indican los dominios del regulador, así como la superficie de Van der Waals. La modelización por homología se realizó en base a la estructura 4GVP (regulador VraR inactivo). [B] Diagramas de Ramachandran del modelo estructural de AbrB1 en estado inactivo. [C] Evaluación de la calidad global y local de la estructura mediante la función QMEANDisCo, así como un análisis detallado realizado con *MolProbity*.

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

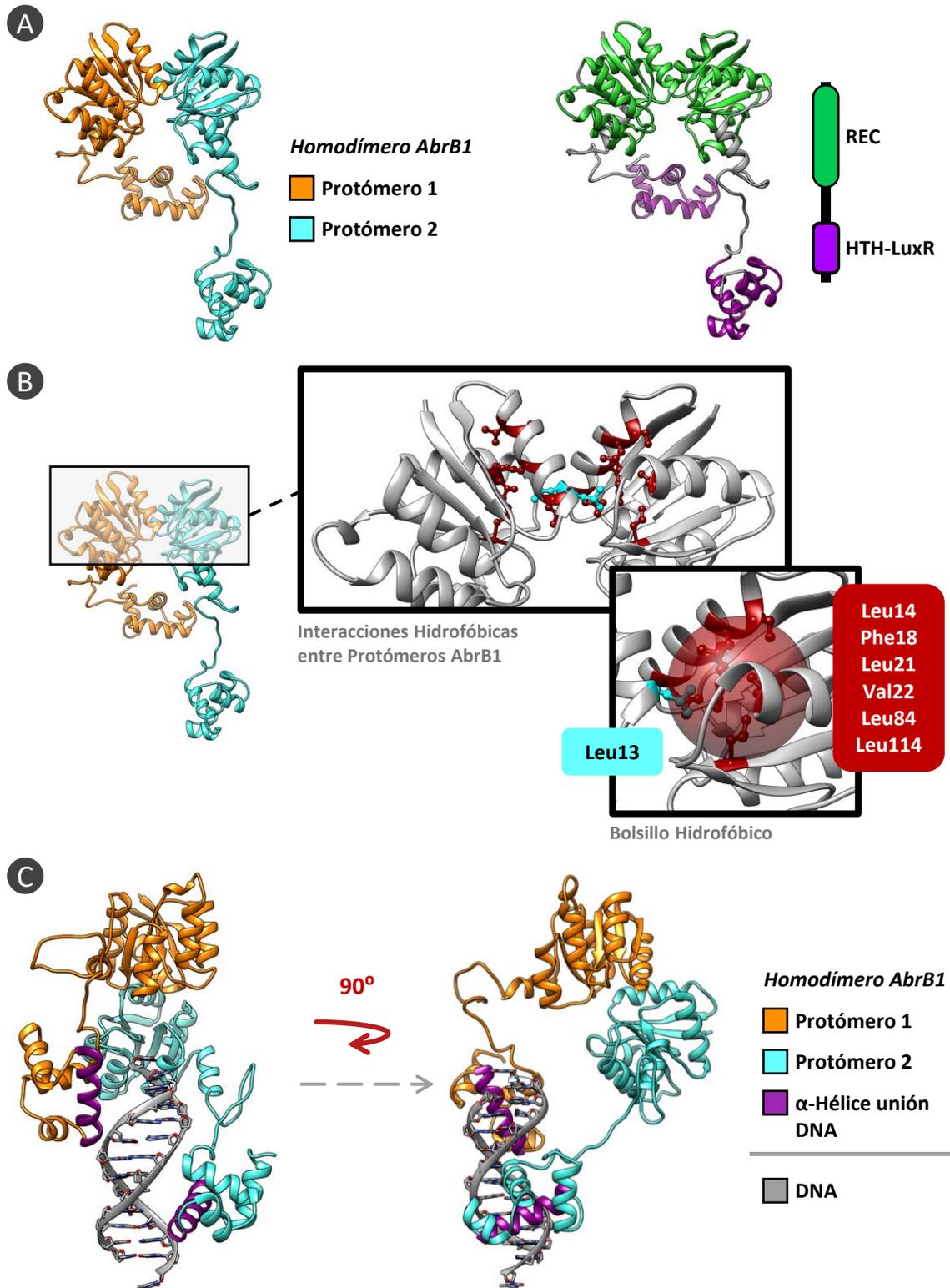


**Figura C1.22. Evaluación de la calidad del modelo estructural de AbrB1 (estado activo).** [A] Modelo estructural de AbrB1 en estado activo; se indican los dominios del regulador, así como la superficie de Van der Waals. La modelización por homología se realizó en base a la estructura 4IF4 (regulador VraR activo por  $\text{BeF}_3$ ). [B] Diagramas de Ramachandran del modelo estructural de AbrB1 en estado activo. [C] Evaluación de la calidad global y local de la estructura mediante la función QMEANDisCo, así como un análisis detallado realizado con *MolProbity*.





**Figura C1.24. Características estructurales del regulador AbrB1.** [A] Cambio conformacional correspondiente a la activación de AbrB1 por la fosforilación de Asp55. [B] Modelo de AbrB1 en su estado inactivo (se indica la estructura secundaria: láminas- $\beta$  en verde, y hélices- $\alpha$  en azul). Se muestra el sitio de fosforilación en el estado inactivo; así como las hélices- $\alpha$  que intervienen en el empaquetamiento de los dominios REC y HTH-LuxR. [C] Modelo de AbrB1 en su estado activo (se indica la estructura secundaria: láminas- $\beta$  en verde, y hélices- $\alpha$  en azul). Se muestra el sitio de fosforilación en el estado activo; así como la hélice que se une al DNA (se indica también la superficie de Van der Waals y las cargas).



**Figura C1.25. Características estructurales del regulador AbrB1 (homodímero).** [A] Homodímero de AbrB1. A la izquierda se indican los protómeros de regulador que forman la proteína oligomérica. A la derecha se indican los dominios de los protómeros. [B] Interacción que permite la formación de homodímeros de AbrB1. Leucinas protuberantes (Leu13) en cada uno de los protómeros interactúan con un bolsillo hidrofóbico presente en el otro protómero (formado por Leu14, Phe18, Leu21, Val22, Leu84 y Leu114). [C] Interacción de un homodímero de AbrB1 con una molécula de DNA (se marcan las hélices que interactúan con el DNA).

## CAPÍTULO 1: El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2

### Dominios REC y HTH-LuxR

Tanto el núcleo de láminas- $\beta$  del dominio REC, como el núcleo de hélices- $\alpha$  del dominio HTH-LuxR mostraron un elevado grado de conservación en AbrB1 con respecto a VraR y LiaR (*Figura C1.23*).

### Cambios conformacionales (activación del regulador)

Cuando el regulador se encuentra en su forma inactiva, el dominio REC (a través de las hélices  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) se encuentra interaccionando con el dominio HTH-LuxR (a través de hélice  $\alpha 4$ ) mediante una interfase hidrofóbica estabilizada por puentes salinos y puentes de hidrógeno. Este empaquetamiento da lugar a una conformación “cerrada” del regulador. Cuando se produce la fosforilación de Asp55, se originan una serie de cambios conformacionales que permiten la separación del dominio REC y HTH-LuxR, adquiriendo una conformación mucho más “flexible” que permite la formación de homodímeros y la interacción con el DNA (*Figura C1.24.A-B*).

### Sitio de fosforilación

El sitio de fosforilación se encuentra completamente conservado: tanto el residuo que se fosforila para la activación del regulador (Asp55), como los residuos que interaccionan con el mismo (Asp9 y Lys107) (*Figura C1.23*).

En el regulador en estado inactivo, el residuo Asp55 se encuentra interaccionando con Lys107 (*Figura C1.24.B*). Cuando Asp55 se fosforila y el regulador se encuentra en estado activo, Lys107 pasa a interaccionar con Asp9 (*Figura C1.24.C*).

### Sitio de reconocimiento del DNA

Todos los residuos pertenecientes al sitio de unión al DNA se encuentran conservados, desde Thr192 a Asn198, además de los residuos que estabilizan la unión al DNA (Arg165, Asn179 y Arg209) (*Figura C1.23*). La hélice- $\alpha$  que forman estos residuos presenta carga positiva, lo que favorece su unión al DNA (*Figura C1.24.C*).

Hay que destacar que la secuencia consenso identificada para LiaR es T(X)<sub>4</sub>C(X)<sub>4</sub>G(X)<sub>4</sub>A (Davlieva et al., 2015). El elevado grado de degeneración de la secuencia diana del regulador podría ser similar en el caso de AbrB1, lo que explicaría la dificultad de encontrar motivos de unión cuando se analizaron los promotores de los genes diferencialmente expresados obtenidos en el análisis transcriptómico.

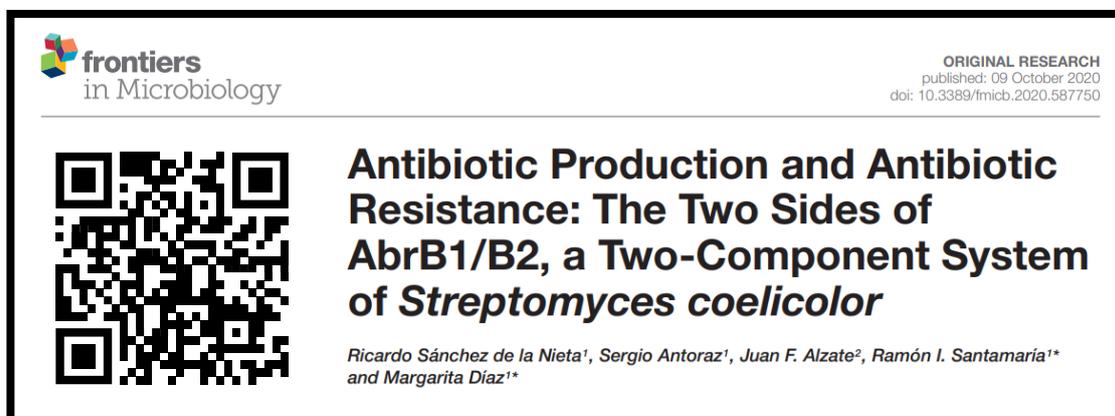
### Dimerización del regulador activo

La formación de homodímeros en el caso del regulador VraR es posible gracias a la interacción de una metionina protuberante presente en cada uno de los protómeros con un “bolsillo” hidrofóbico del dominio REC presente en el otro protómero, sólo accesible cuando el regulador se encuentra fosforilado y activo.

En el caso de AbrB1, aunque los residuos no están completamente conservados, si se mantiene la hidrofobicidad de la región. La metionina protuberante presente en VraR ha sido sustituida por una leucina (Leu13) en AbrB1; ambos aminoácidos presentan una hidrofobicidad casi idéntica (Finney et al., 1980; Guy, 1985). Lo mismo ocurre con el “bolsillo” hidrofóbico; aunque los residuos no son idénticos, se sigue conservando la hidrofobicidad: Leu14, Phe18, Leu21, Val22, Leu84 y Leu114 (*Figura C1.25*).

### C1.11 - Publicaciones científicas

Parte de los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en la revista *Frontiers in Microbiology* (Factor de Impacto 2020: 5,64; Q1 en la categoría “Microbiología”).



Sánchez de la Nieta, R., Antoraz, S., Alzate, J.F., Santamaría, R.I., & Díaz, M. (2020). Antibiotic production and antibiotic resistance: the two sides of AbrB1/B2, a two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 11(587750). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587750>



## CAPÍTULO 2

### El Regulador de Respuesta huérfano Aor1

Aor1 es un oRR de *S. coelicolor* codificado por el gen *SCO2281*. Está implicado en la regulación de la producción de antibióticos, entre otros procesos, y ha sido descrito por nuestro grupo de investigación (Antoraz et al., 2017).

Al ser un regulador huérfano, el gen *aor1* no está asociado a ninguna HK a nivel genómico, aunque forma parte del operón *SCO2279-82* (se desconoce la función de los productos de *SCO2279* y *SCO2282*; *SCO2281* codifica un potencial regulador transcripcional; *Figura C2.1.A*). La proteína Aor1 presenta un tamaño de 227 aminoácidos (24,7 kDa), y consta de un dominio receptor REC (aa 9-128) que contiene el sitio de fosforilación (Asp60), y un dominio de unión a DNA HTH-LuxR (aa 156-218) de la familia NarL (*Figura C2.1.B*). Además, se encuentra muy conservada dentro del género *Streptomyces*.

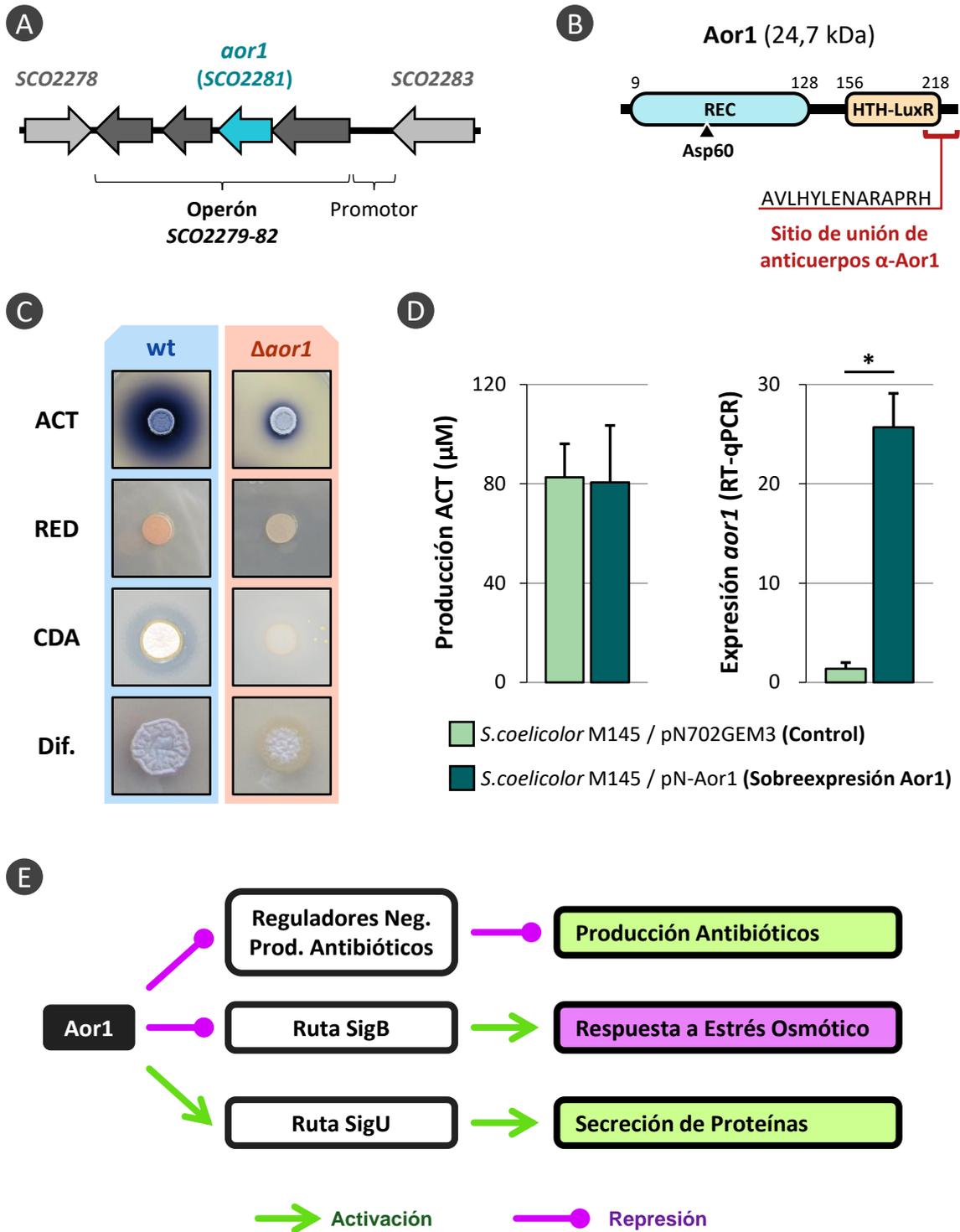
Se han identificado potenciales HK que podrían estar relacionadas con Aor1 a través de herramientas<sup>2,3</sup> *in silico* de predicción de interacciones proteína-proteína (Balewski & Hallberg, 2019; Burger & Van Nimwegen, 2008): *SCO3750*, *SCO6424*, *SCO4667*, *SCO4598*, *SCO4597*, *SCO2215*, *SCO2359* y *SCO0211*. Tres de estas HK son huérfanas (*SCO0211*, *SCO3750* y *SCO6424*), mientras que el resto están asociadas a RR; cabe destacar que Aor1 comparte una elevada similitud de secuencia con dichos RR: *SCO2216* (67,8%), *SCO2358* (65,1%), *SCO4596* (68,4%) y *SCO4668* (65,2%). De las HK propuestas, varias ya han sido descritas: *SCO4598* y *SCO4597*, que pertenecen al Sistema de Dos Componentes (TCS) atípico AbrC1/C2/C3 (Rico, Santamaría, et al., 2014; Rodríguez et al., 2015; Yepes et al., 2011), y *SCO4667*, que pertenece al TCS SitK/R (Gongerowska-Jac et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado experimentalmente las HK que interaccionan con Aor1.

Para el estudio detallado de este regulador huérfano, se generó la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *SCO2281::aac3-IV* (gen *aor1* reemplazado por un casete de resistencia a apramicina) mediante la tecnología REDIRECT (Gust et al., 2003). La delección del gen *aor1* dio lugar a un efecto pleiotrópico negativo sobre la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA, así como sobre la diferenciación (*Figura C2.1.C*). El medio LB fue donde se observaron mayores diferencias fenotípicas y mayor reproducibilidad, por lo que el estudio posterior de este regulador se realizó en dicho medio.

<sup>2</sup> <https://portal.nersc.gov/project/nstaff/orakle2018/predictions/>

<sup>3</sup> <https://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>

CAPÍTULO 2: El Regulador de Respuesta huérfano Aor1



**Figura C2.1.** Antecedentes del regulador huérfano Aor1 (Antoraz et al., 2017). [A] Contexto genómico de *aor1* en *S. coelicolor*. [B] Predicción de dominios del regulador huérfano Aor1. Se indica el sitio de fosforilación (Asp60), así como el péptido utilizado en la obtención de anticuerpos policlonales α-Aor1. [C] Análisis fenotípico de las cepas *S. coelicolor* M145 (wt) y *S. coelicolor* M145 Δ*aor1*. Se muestra el análisis comparativo de la producción de los antibióticos actinorrodina (ACT), undecilprodigiosina (RED) y del antibiótico dependiente de calcio (CDA); así como del proceso de diferenciación (Dif.). [D] Análisis de sobreexpresión del regulador Aor1. A la izquierda se muestra la producción de actinorrodina; a la derecha se muestra la expresión del gen *aor1* (RT-qPCR). \*Significación estadística: valor-p < 0,05 [E] Esquema del modelo de regulación de Aor1.

La sobreexpresión de *aor1* bajo el promotor del operón del que forma parte (SCO2279-82) en un plásmido multicopia no dio lugar a un incremento de la producción de antibióticos (Figura C2.1.D), lo que sugiere que su modo de actuación podría ser como regulador negativo de otros reguladores negativos, al menos con relación a la producción de antibióticos.

Además de los análisis fenotípicos, se llevó a cabo un análisis transcriptómico de la cepa silvestre y la cepa mutante  $\Delta aor1$  mediante RNAseq (medio LB, 36 horas de cultivo). Al aplicar los filtros convencionales ( $FDR \leq 0,05$ ;  $|FC| \geq 2$ ) se identificaron 4039 genes diferencialmente expresados, lo que supone gran parte de los genes de *S. coelicolor* (concretamente el 51,6%). Estos resultados implican que el regulador Aor1 podría tratarse de uno de los reguladores globales más importantes de *S. coelicolor*, capaz de integrar muchos de sus procesos celulares; y lo sitúan en las etapas iniciales de las cascadas de regulación en este organismo. Sin embargo, debido a la complejidad de analizar un número tan grande de genes, se decidió aplicar filtros más estrictos ( $FDR \leq 0,01$ ;  $|FC| \geq 3$ ), lo que acotó el análisis a 504 genes diferencialmente expresados.

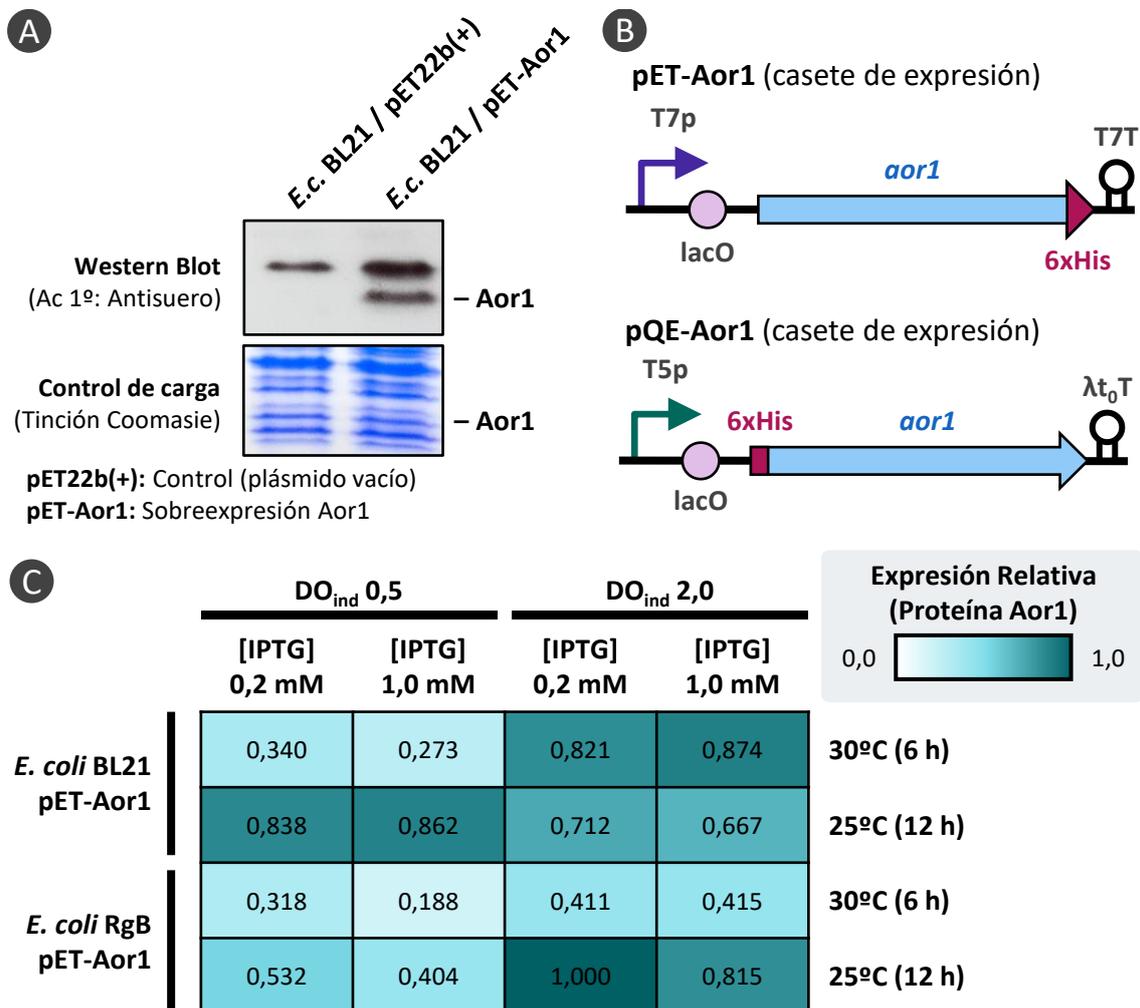
En el análisis transcriptómico se observó que la mayor parte de los genes de los clústeres *act* (síntesis de actinorrodina) y *cda* (síntesis del antibiótico dependiente de calcio) se encontraban subexpresados en la cepa mutante  $\Delta aor1$  (acorde a las observaciones fenotípicas). La ruta de regulación del Factor Sigma U (SigU), implicada en la secreción de proteínas, también se encontró subexpresada en la cepa mutante  $\Delta aor1$ . Sin embargo, la ruta de regulación del Factor Sigma B (SigB) relacionada con la respuesta a estrés osmótico se encontró sobreexpresada en la cepa mutante. Estos resultados sitúan a Aor1 como un regulador positivo de la producción de antibióticos y la secreción de proteínas, y como un regulador negativo de la respuesta a estrés osmótico (Figura C2.1.E).

Aunque el análisis transcriptómico reveló los diferentes procesos biológicos en los que está implicado Aor1, la gran cantidad de genes diferencialmente expresados no permitió identificar sus dianas directas. Por lo tanto, durante la presente Tesis Doctoral, se decidió realizar un ensayo de ChIP-Seq para identificar las secuencias diana del regulador Aor1 y establecer de forma exacta su red de regulación. Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se decidió purificar y utilizar anticuerpos policlonales  $\alpha$ -Aor1 obtenidos previamente en el laboratorio (Rico, 2014) mediante inmunización de un conejo con un péptido del extremo carboxilo del regulador huérfano Aor1 (Figura C2.1.A).

En este capítulo se desarrollará el **Objetivo 2: "Identificar los genes diana del Regulador de Respuesta huérfano Aor1 (SCO2281) de *Streptomyces coelicolor*"**.

### C2.1 - Optimización de la producción de Aor1 en *Escherichia coli*

Los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -Aor1 obtenidos previamente en el laboratorio (Rico, 2014) no habían sido purificados, sino que se encontraban en los antisueros extraídos del conejo inmunizado con un péptido de Aor1. Se analizó la capacidad de inmunodetección del regulador Aor1 de este antisuero mediante *Western Blot* (Figura C2.2.A). Aunque en este análisis se observaron señales inespecíficas, aparte de Aor1, es un resultado esperable ya que en el antisuero utilizado hay presentes otros muchos anticuerpos; por lo que tras la purificación de los anticuerpos de interés ( $\alpha$ -Aor1) este problema seguramente se solventara.



**Figura C2.2. Optimización de la producción de Aor1 en *Escherichia coli*.** [A] Análisis de la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -Aor1 en el antisuero del conejo inmunizado con un péptido de Aor1. Se analizaron mediante *Western Blot* extractos de las cepas *E. coli* BL21 (DE3) / pET22b(+) (control, plásmido vacío) y *E. coli* BL21 (DE3) / pET-Aor1 (sobreexpresión de Aor1); como anticuerpo primario se utilizó el antisuero. Como control de carga se incluye gel teñido con azul de Coomassie. [B] Esquema de los casetes de expresión de Aor1 de los plásmidos pET-Aor1 y pQE-Aor1. [C] Batería de ensayos para la optimización de la producción de Aor1. Se muestra la expresión relativa de la proteína en las distintas condiciones analizadas: cepa hospedadora, densidad óptica del cultivo a la que se añade el inductor, concentración del inductor (IPTG) y condiciones de cultivo tras la adición del inductor.

La purificación de los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad requería grandes cantidades del regulador Aor1 purificado; por lo tanto, como paso previo, se llevó a cabo la expresión y purificación de esta proteína en *Escherichia coli*. Las condiciones utilizadas en el laboratorio para la expresión de Aor1 consistían en su inducción en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) / pET-Aor1 mediante una concentración de IPTG de 1,0 mM al alcanzar una densidad óptica de 0,5, y posterior incubación a 37°C durante 12 h (posteriormente la rotura celular se realizaba mediante sonicación y se llevaba a cabo la purificación a través de la “cola” de histidinas mediante una resina de Ni-NTA). Sin embargo, en estas condiciones, la cantidad de Aor1 producida era insuficiente (se obtenían 0,05 µg Aor1 / mL de cultivo; y para la cromatografía de afinidad se requerían 5 mg de proteína), por lo que se decidió optimizar la producción de este regulador. Para ello se realizó una batería de ensayos en la que se analizaron diferentes condiciones de expresión y purificación, siguiendo las recomendaciones del servicio *Protein Expression and Purification Core Facility*<sup>4</sup> (EMBL), y de la literatura (Jia & Jeon, 2016; Kaur et al., 2018; Rosano & Ceccarelli, 2014). Las condiciones de expresión de Aor1 analizadas fueron:

- **Cepa hospedadora:** Se emplearon las cepas especializadas en la expresión de proteínas *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) (la denominación DE3 indica que estas cepas contienen el virus lisogénico λDE3, que presenta la RNA polimerasa T7).
- **Plásmido de expresión:** Se utilizaron los plásmidos de expresión pET-Aor1 (derivado de pET22b[+]) y pQE-Aor1 (derivado de pQE30). El plásmido pET-Aor1 expresa el regulador Aor1 marcado con 6xHis en el extremo Ct, mientras que en el caso de pQE-Aor1, el regulador está marcado en el extremo Nt. En ambos casos, la expresión del gen *aor1* es inducible por IPTG (ya que contienen el operador *lacO*), aunque el promotor es diferente: T7p en el caso de pET-Aor1, y T5p en el caso de pQE-Aor1 (*Figura C2.2.B*).
- **DO<sub>ind</sub>:** Las densidades ópticas de cultivo (λ 600 nm) a las que se comenzó la inducción (por adición de IPTG) fueron 0,5 y 2,0.
- **Concentración de inductor:** Se evaluaron las concentraciones de IPTG 0,2 mM y 1,0 mM para inducir la expresión de Aor1.
- **Condiciones de cultivo:** Tras la adición del inductor los cultivos fueron incubados a 30°C durante 6 h, o a 25°C durante 12 h.
- **Rotura celular:** Los diferentes procedimientos analizados fueron homogenización con esferas de vidrio, disrupción por ultrasonidos (sonicación) y rotura en molino criogénico. La rotura celular en estos sistemas se complementó con lisis química mediante la adición de detergentes a los búferes utilizados durante el proceso de rotura.

<sup>4</sup><https://www.embl.org/groups/protein-expression-purification/>

## CAPÍTULO 2: El Regulador de Respuesta huérfano Aor1

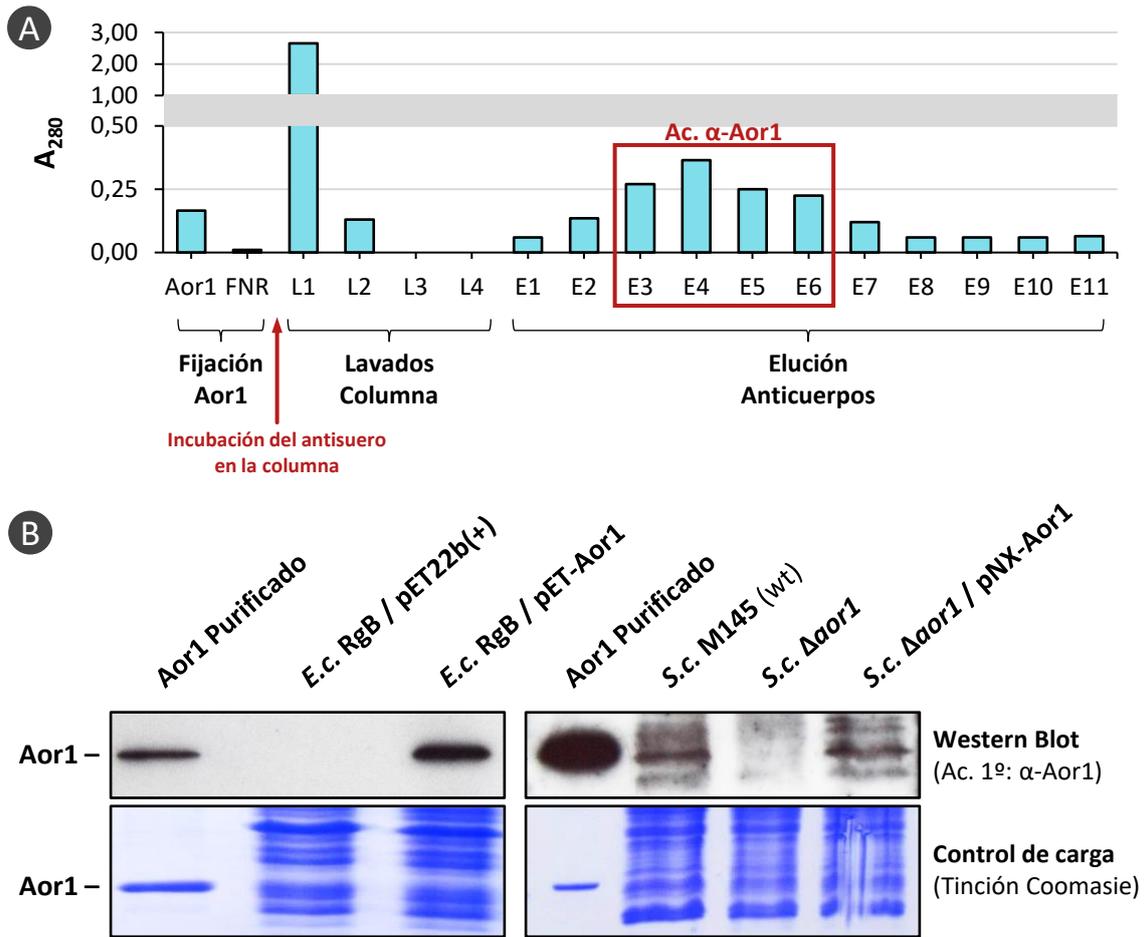
La comparación de la expresión de Aor1 en las diferentes condiciones indicadas se muestra en [Figura C2.2.C](#). Sin embargo, el plásmido pQE-Aor1 no se incluye, ya que su utilización mostró toxicidad en las células. Esto podría ser debido a que el sistema de inducción en los plásmidos derivados de pQE30 funciona peor que en los derivados de pET22b[+], ya que depende del represor LacI expresado por la cepa hospedadora (el plásmido no contiene el gen *lacI*, a diferencia de pET22b[+]), que podría ser insuficiente para limitar la expresión basal de *aor1*, lo cual en etapas tempranas de crecimiento podría resultar perjudicial para las células. Además, también podría implicar que el marcaje de Aor1 en el extremo Nt impide su correcto plegamiento, dando lugar a la formación de agregados proteicos citotóxicos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el proceso de optimización, la expresión de Aor1 se llevó a cabo en *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) / pET-Aor1. La inducción de esta proteína se realizó cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 2,0 con una concentración de IPTG de 0,2 mM; tras la adición de IPTG los cultivos se incubaron a 25°C durante 12 h. La rotura celular se realizó mediante molino criogénico. En estas condiciones se consiguió obtener 6,25 µg Aor1 / mL de cultivo (lo que supone 125 veces más que en las condiciones previas a la optimización), con lo que se pudo obtener la cantidad requerida de la proteína Aor1 purificada para la purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

### C2.2 - Purificación de anticuerpos policlonales α-Aor1

Los anticuerpos policlonales α-Aor1 presentes en el antisuero de conejo inmunizado se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Para ello, se llevó a cabo la fijación de la proteína Aor1 purificada a la columna cromatográfica de sefarosa activada por CNBr, permitiendo la posterior unión y retención de los anticuerpos presentes en el antisuero capaces de reconocer a este regulador. El proceso se detalla en el apartado “[MM.9.4 - Purificación de anticuerpos](#)”; la monitorización realizada se muestra en la [Figura C2.3.A](#).

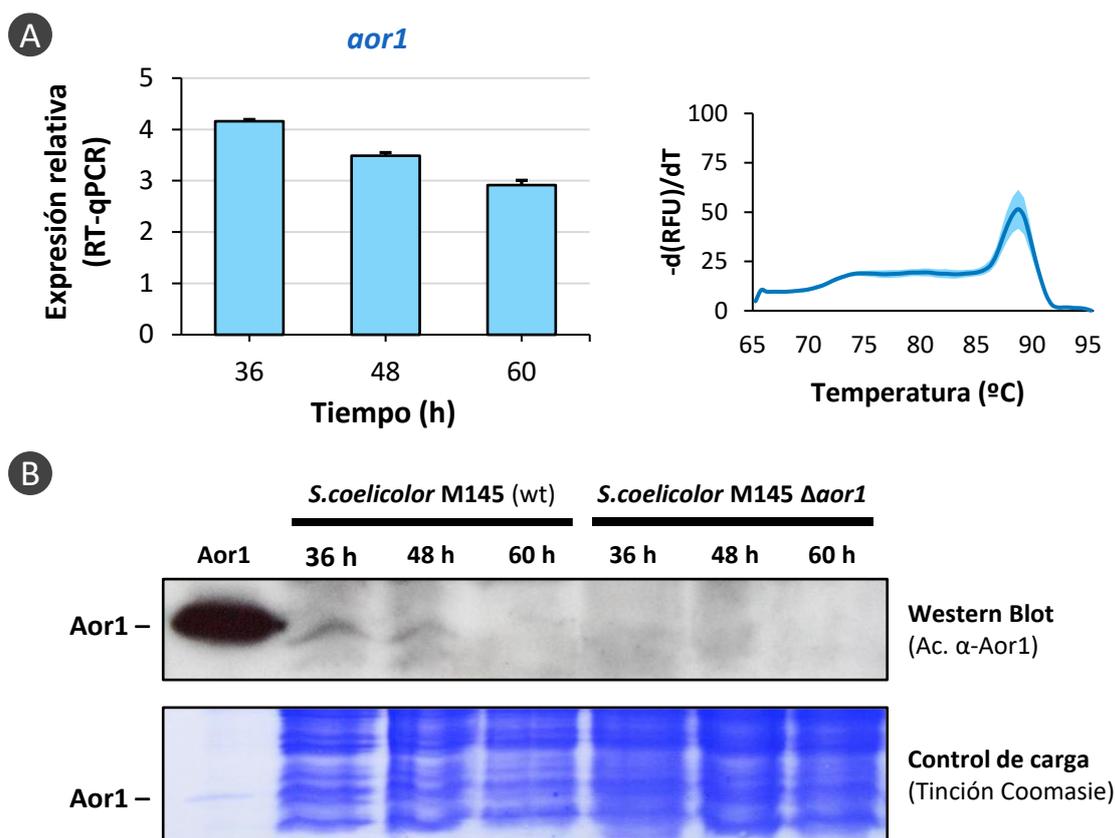
Tras el proceso de purificación se evaluó la capacidad de inmunodetección de los anticuerpos α-Aor1 obtenidos mediante *Western Blot* ([Figura C2.3.B](#)). El análisis se realizó tanto en la cepa *E. coli* Rosetta-gammi B (DE3) / pET-Aor1 (como control se incluyó la cepa transformada con el plásmido vacío) como en diferentes cepas de *S. coelicolor*: la cepa silvestre, la cepa mutante  $\Delta aor1$  y la cepa mutante  $\Delta aor1$  complementada con el plásmido pNX-Aor1. En todos los casos se detectó la presencia del regulador huérfano Aor1 según lo esperado; además, no se observaron las señales inespecíficas que aparecían cuando se empleaba el antisuero ([Figura C2.2.A](#)).



**Figura C2.3. Purificación de anticuerpos α-Aor1.** [A] Monitorización del proceso de purificación de anticuerpos policlonales α-Aor1 a partir de suero de conejo inmunizado mediante cromatografía de afinidad. Los niveles de proteína se controlaron mediante la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm durante la fijación de Aor1 a la columna (se incluyen los valores previos a la unión, así como los de la fracción no retenida), los lavados tras la incubación del suero en la columna y la elución de los anticuerpos. [B] Análisis de los anticuerpos α-Aor1 purificados. Se analizaron mediante *Western Blot* la proteína purificada (control positivo), extractos de las cepas *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) / pET22b(+) (control, plásmido vacío) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) / pET-Aor1 (expresión de Aor1), así como extractos de las cepas *S. coelicolor* M145 (cepa silvestre), *S. coelicolor* M145 Δaor1 y *S. coelicolor* M145 Δaor1 / pNX-Aor1 (complementación de Aor1); como anticuerpo primario se utilizaron los anticuerpos α-Aor1 purificados. Como control de carga se incluye gel teñido con azul de Coomassie.

### C2.3 - Análisis de la expresión de Aor1 en *Streptomyces coelicolor*

El patrón de expresión del regulador huérfano Aor1 en *S. coelicolor* se analizó a nivel transcripcional (mediante RT-qPCR) y a nivel proteico (mediante *Western Blot* con los anticuerpos purificados) a 36, 48 y 60 horas (*Figura C2.4*). En ambos casos, los mayores niveles de expresión se observaron a 36 horas (fin de la fase exponencial de crecimiento), que se van reduciendo a 48 y 60 horas. Como control se analizó la cepa mutante Δaor1, en la que no se detectó expresión de Aor1 (solo se muestran los resultados correspondientes al análisis de expresión a nivel proteico en esta cepa).



**Figura C2.4. Análisis de la expresión de Aor1 en *Streptomyces coelicolor*.** [A] Expresión del gen *aor1* a 36, 48 y 60 horas en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 en medio LB (análisis realizado por RT-qPCR). La normalización se realizó en base a la expresión del gen *rpsL* (*SCO4659*). Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro réplicas. A la derecha se muestra la curva de fusión de los productos de la RT-qPCR; el área coloreada muestra la desviación estándar. [B] Expresión de la proteína Aor1 a 36, 48 y 60 horas en medio LB (análisis realizado por *Western Blot*). Se analizó la proteína purificada (control positivo), y las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta aor1$ ; como anticuerpo primario se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -Aor1 purificados. Como control de carga se incluye gel teñido con azul de Coomassie.

## C2.4 - Identificación de las secuencias diana de Aor1 por ChIP-Seq

El análisis transcriptómico de Aor1 (Antoraz et al., 2017) reveló que este regulador es clave en la coordinación de una enorme cantidad de procesos biológicos en *S. coelicolor*, ya que su delección afecta a la expresión de la mitad de los genes de este organismo. Por lo tanto, resulta esencial identificar las secuencias dianas de Aor1 mediante ChIP-Seq, metodología en la que se inmunoprecipitan moléculas del regulador junto con las secuencias génicas a las que se une, lo que permite la secuenciación e identificación de las mismas. El proceso se detalla en el apartado “MM.4.9 - Identificación de secuencias diana por ChIP-Seq”.

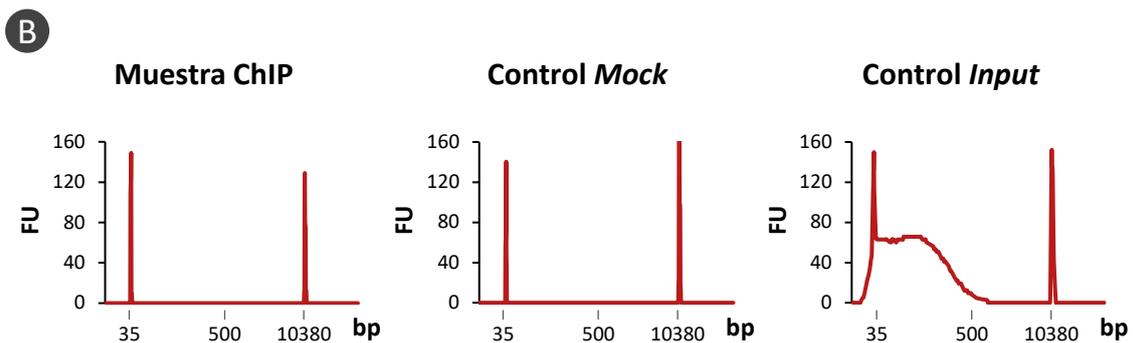
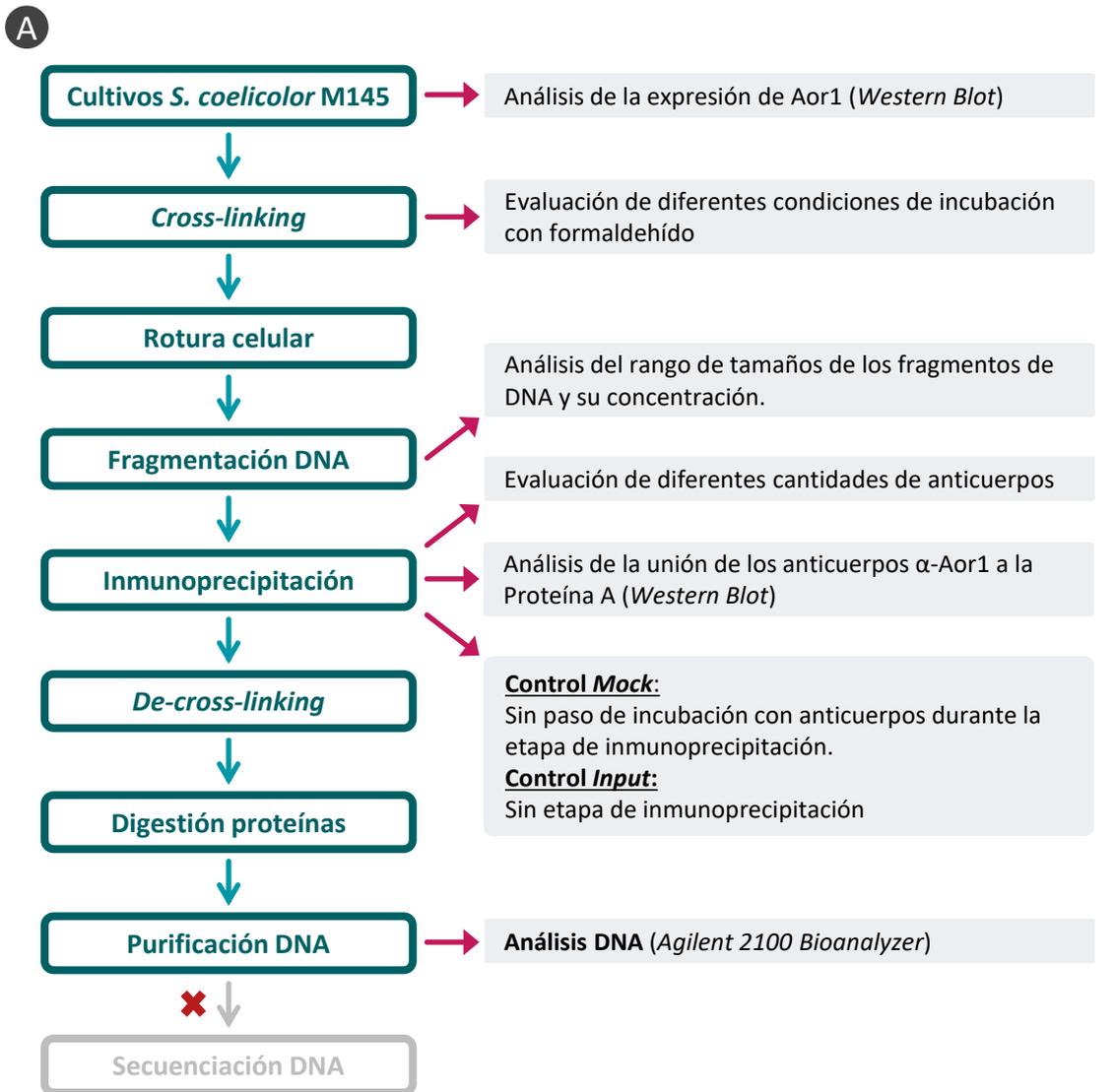
Sin embargo, el proceso no se pudo completar de forma satisfactoria, ya que no se consiguió obtener DNA en el proceso de inmunoprecipitación con los anticuerpos  $\alpha$ -Aor1.

Se realizaron múltiples chequeos en las diferentes etapas del proceso (*Figura C2.5*), para descartar problemas como que el regulador Aor1 no se estuviera expresando en las muestras analizadas, que el *cross-linking* (fijación de complejos proteína-DNA mediante formaldehído) fuera excesivo, que los anticuerpos  $\alpha$ -Aor1 no se estuvieran uniendo a la Proteína A durante la inmunoprecipitación, o que la concentración del anticuerpo no fuera la adecuada. Además, se incluyeron controles *Mock* e *Input*: por un lado, en los controles *Mock* no se realizó el paso de incubación con anticuerpos durante la etapa de inmunoprecipitación, por lo que sirven como control negativo para detectar moléculas que se unan de forma inespecífica a la Proteína A durante la inmunoprecipitación; por otro lado, en los controles *Input* no se realizó el paso de inmunoprecipitación, por lo que son representativos del material genético de partida, y permiten evaluar, entre otras, la cantidad de DNA de partida, el rango de tamaños de DNA tras la fragmentación por ultrasonidos o el potencial enriquecimiento de ciertas secuencias debido a causas distintas a la inmunoprecipitación. Teniendo en cuenta las comprobaciones realizadas, algunos de los problemas que podrían estar impidiendo la obtención de las secuencias dianas de Aor1 por inmunoprecipitación son:

- **Anticuerpos no adecuados para inmunoprecipitación:** Aunque los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -Aor1 purificados durante el presente trabajo son adecuados para la inmunodetección del regulador Aor1 por *Western Blot* tanto en *E. coli* como en *S. coelicolor* (*Figura C2.3.B*, *Figura C2.4.B*), pueden no serlo para su inmunoprecipitación. Esto podría ser debido a que el epítipo reconocido por los anticuerpos no esté accesible cuando Aor1 se encuentra realizando su función biológica (en los análisis por *Western Blot*, la separación de proteínas se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes, por lo que este problema no afectaría en la inmunodetección).
- **Niveles muy bajos de proteína Aor1:** La cantidad de regulador Aor1 expresada en *S. coelicolor* es bastante baja, incluso a 36 horas (donde se observan mayores niveles de expresión), por lo que, a pesar de ser suficiente para cumplir su papel fisiológico, puede no ser suficiente para la purificar la cantidad requerida de DNA para realizar el ChIP-Seq.

Como estrategia alternativa para solventar estos problemas se decidió sobreexpresar el gen *aor1* para la realización del ChIP-Seq. Los estudios previos indican que esto no afecta significativamente al fenotipo ni resulta tóxico (Antoraz et al., 2017), por lo que al haber más cantidad de regulador se podría facilitar la purificación de secuencias dianas por ChIP-Seq. También se decidió marcar la proteína con un epítipo que permitiese el empleo de anticuerpos comerciales cuya aplicación en procesos de inmunoprecipitación en *S. coelicolor* haya sido previamente contrastada.

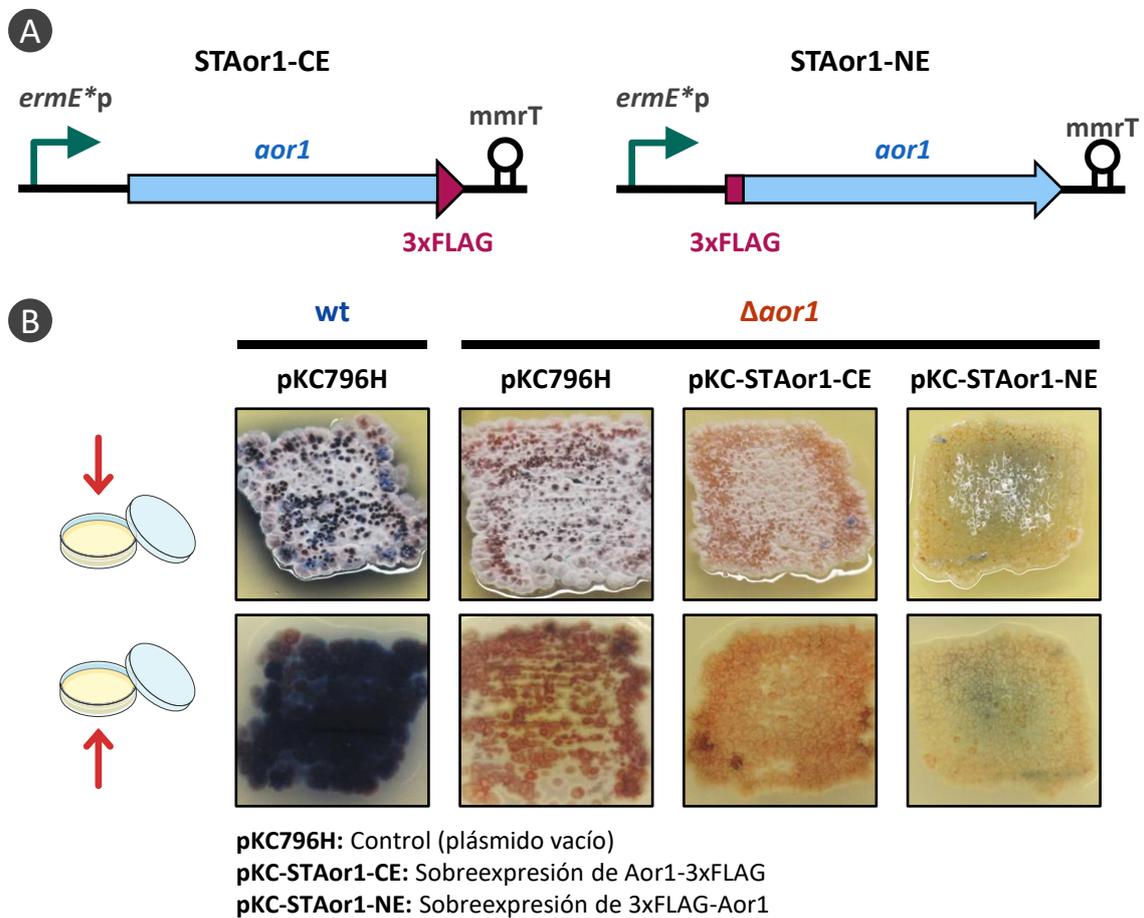
## CAPÍTULO 2: El Regulador de Respuesta huérfano Aor1



**Figura C2.5. Comprobaciones realizadas en el ChIP-Seq de Aor1. [A]** Esquema de las etapas del ChIP-Seq y chequeos realizados a lo largo del proceso. **[B]** Análisis de la concentración y calidad de DNA de las muestras y controles previo al paso final de secuenciación. Se muestran los electroferogramas (*Agilent 2100 Bioanalyzer*) de una de las muestras ChIP, de uno de los controles *Mock* (control sin paso de incubación con anticuerpos durante la etapa de inmunoprecipitación) y de uno de los controles *Input* diluido (control sin etapa de inmunoprecipitación). Los picos de 35 y 10380 bp se corresponden a marcadores del kit *Agilent High Sensitivity DNA*.

### C2.5 - Marcaje de Aor1 con el epítipo 3xFLAG

Como se ha indicado en el apartado anterior, se decidió sobreexpresar y marcar el regulador Aor1 de cara a reintentar la identificación de sus secuencias dianas por ChIP-Seq. Para ello se diseñaron los casetes STAor1-CE y STAor1-NE (Figura C2.6.A). Se decidió utilizar el promotor fuerte constitutivo *ermE*\*p para controlar la expresión del gen *aor1*. Para marcar el regulador en ambos extremos (Ct y Nt) se seleccionó el epítipo 3xFLAG, ampliamente utilizado en *Streptomyces* para estudios de ChIP (Al-Bassam et al., 2014; Bush et al., 2017; Crack et al., 2015; Lewis et al., 2019; Liu, Zhang, et al., 2019; Munnoch et al., 2016; Pullan et al., 2011; Som et al., 2017; Zhu et al., 2021, 2022).



**Figura C2.6. Marcaje de Aor1 con el epítipo 3xFLAG.** [A] Esquema de los casetes de expresión de Aor1 generados. El casete STAor1-CE permite la expresión del regulador Aor1 marcado con el epítipo 3xFLAG en el extremo Ct; mientras que en el caso de STAor1-NE, el marcaje es en el extremo Nt. En ambos casos el gen *aor1* se encuentra bajo el control del promotor fuerte constitutivo *ermE*\*p. [B] Análisis fenotípico de la cepa *S. coelicolor* M145 (wt) transformada con el plásmido control pKC796H, y de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta aor1$  transformada con el plásmido control pKC796H y los plásmidos pKC-STAor1-CE y pKC-STAor1-NE (sobreexpresión de Aor1 marcado con 3xFLAG en los extremos Ct y Nt respectivamente). Se muestran fotografías de la parte superior e inferior de las placas con medio R2YE tras 5 días de incubación.

## CAPÍTULO 2: El Regulador de Respuesta huérfano Aor1

Los casetes STAor1-CE y STAor1-NE se introdujeron en los plásmidos integrativos pNG3 y pKC796H (contienen las integrasas de los fagos  $\phi$ BT1 y  $\phi$ C31 respectivamente), dando lugar a la batería de plásmidos pNG-STAor1-CE, pNG-STAor1-NE, pKC-STAor1-CE y pKC-STAor1-NE, tal y como se indica en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”.

No se consiguió la integración del regulador Aor1 marcado con 3xFLAG mediante el sistema del bacteriófago  $\phi$ BT1 (los plásmidos derivados de pNG3 no pudieron ser introducidos por transformación en *S. coelicolor* M145  $\Delta aor1$ ), aunque no se consiguieron determinar los motivos. En cambio, sí se logró mediante el sistema de integración del bacteriófago  $\phi$ C31 (plásmidos derivados de pKC796H) (Figura C2.6.B).

Sin embargo, esta estrategia no mostró resultados favorables. En el caso de pKC-STAor1-CE, el regulador Aor1-3xFLAG (marcaje Ct) no parecía ser funcional, ya que no complementó el fenotipo de la cepa mutante  $\Delta aor1$ . En el caso de pKC-STAor1-NE, se observó un efecto tóxico.

La toxicidad observada en *S. coelicolor* por la expresión de Aor1 marcado con 3xFLAG en el extremo Nt, así como la observada previamente en *E. coli* por la expresión de Aor1 marcado con 6xHis en el extremo Nt (apartado “C2.1 - Optimización de la expresión de Aor1 en *Escherichia coli*”), parecen indicar que la adición de etiquetas proteicas al extremo Nt del regulador Aor1 impiden su correcto plegamiento, dando lugar a la formación de agregados proteicos citotóxicos.

# CAPÍTULO 3

## La plataforma HKASP

Los TCS constituyen el sistema de transducción de señales predominante en los organismos procariotas. Dentro de la cascada de señalización, la etapa más problemática de cara a su análisis es precisamente la inicial, la activación de la HK. La identificación de los estímulos que activan a los TCS y modulan sus cascadas de señalización es uno de los mayores obstáculos en el estudio de estos sistemas de regulación, y el mejor ejemplo de ello se encuentra en *Streptomyces coelicolor*. Este organismo presenta 68 TCS completos, 41 oHK y 18 oRR, de los cuales se han descrito y analizado 25 TCS, 5 oHK y 10 oRR (lo que representa aproximadamente un tercio del total); sin embargo, solo se ha conseguido determinar de forma precisa la señal de activación de dos de ellos: VanS/R y GluK/R. En el caso VanS/R, la señal de activación es la molécula del antibiótico vancomicina unida al intermediario de la síntesis de la pared celular Lipid II (Koteva et al., 2010; Kwun et al., 2013; Lockey et al., 2020); mientras que en el caso de GluK/R, la señal de activación es la molécula de glutamato (Li et al., 2017). En otros TCS se intuye el estímulo percibido por la HK y se han podido obtener algunas evidencias de ello, por ejemplo, se ha propuesto que AbrA1/A2 responde a hierro (Rico, Yepes, et al., 2014), y en el caso de PhoR/P se ha determinado que se activa en situaciones limitantes de fosfato (Martín & Liras, 2021); sin embargo, en estos casos no se ha determinado la señal que interacciona directamente con el domino sensor de la HK. En el caso de PhoR/P se han propuesto mecanismos en otros organismos, sin embargo hay varios modelos y no se sabe cuál sigue *Streptomyces* (Martín & Liras, 2021).

La identificación del estímulo o señal que activa a una HK presenta múltiples dificultades. Por un lado, la cantidad y variedad de estímulos que pueden activar a las HK es extremadamente amplia (Krell et al., 2010; Lazar & Tabor, 2021), por lo tanto, incluso habiendo pistas de cual podría ser la señal de activación, en base a los procesos celulares en los que está involucrado el TCS y a los genes que regula, puede llegar a ser muy difícil establecer cuál es el estímulo exacto que percibe la HK, aún más si tenemos en cuenta que estos sistemas de regulación suelen ser pleiotrópicos. Por otro lado, existe la dificultad añadida de que las HK suelen ser proteínas de membrana, por lo que su purificación, manejo y estudio es muy complicado. Las HK deben ser purificadas asociadas a membranas lipídicas, en estructuras como proteoliposomas o nanodiscos (Hörnschemeyer et al., 2016; Hussain et al., 2016), para mantener su plegamiento y funcionalidad. Una vez obtenidas, algunas metodologías disponibles para analizar el proceso de

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

detección de la señal de activación son la Interferometría de Biocapa (BLI), la Espectroscopía de Dicroísmo Circular por Radiación de Sincrotrón (SRCD) y la Ultracentrifugación Analítica (AUC) (Hussain et al., 2016). Sin embargo, estas estrategias no son válidas para realizar estudios preliminares que permitan identificar, o al menos acotar, los estímulos percibidos por las HK si no se conocen de antemano, ya que requieren de equipamiento muy específico y son costosas, tanto en términos económicos como en el tiempo que requieren para su aplicación.

Teniendo todo esto en cuenta, durante el presente trabajo se realizó el diseño y construcción de una plataforma para el estudio sistemático *in vivo* de las señales y estímulos que activan a las HK de los TCS en *Streptomyces*. El objetivo no es diseñar una herramienta que permita la identificación y caracterización de la interacción biofísica entre un determinado ligando y el dominio sensor de la HK, sino una herramienta que permita los estudios preliminares necesarios previos a dicho análisis. El enfoque es que esta herramienta presente una elevada usabilidad, es decir, que pueda ser aplicada de la forma más rápida y sencilla posible por el usuario en el escrutinio de señales de activación de las HK en *Streptomyces*.

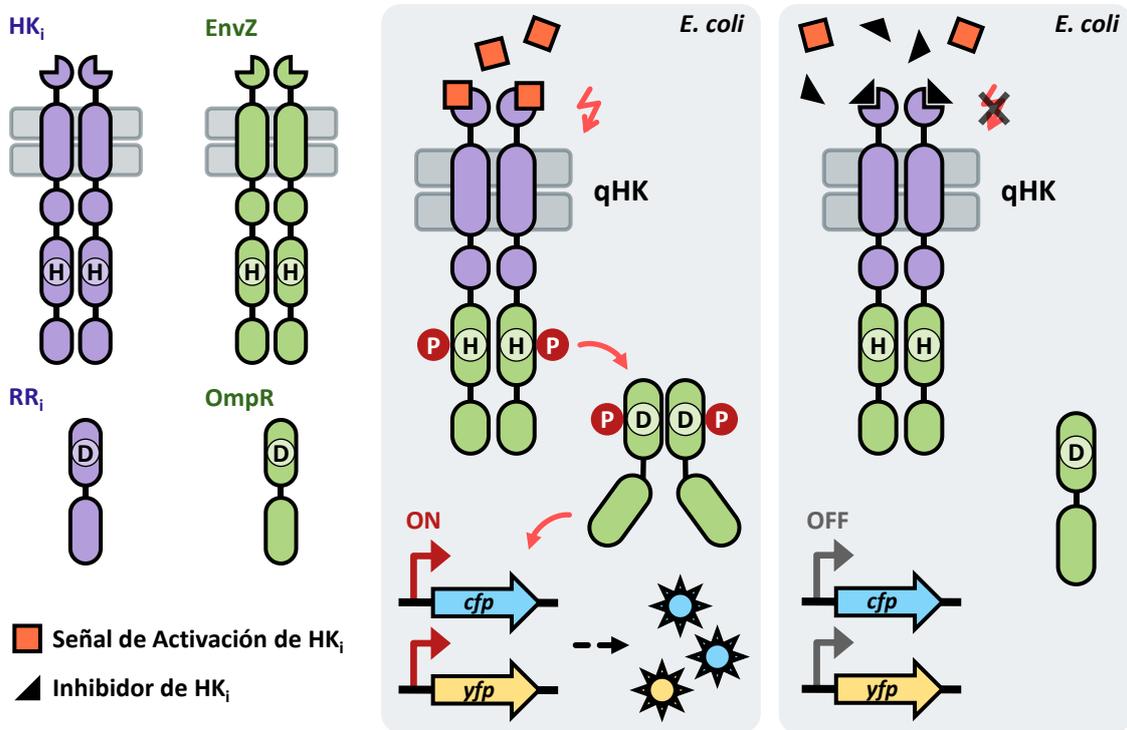
En este capítulo se desarrollará el *Objetivo 3*: “**Diseñar y construir una plataforma para la identificación de las señales de activación de las Histidina Quinasas en *Streptomyces*”.**

La denominación que se ha designado para esta herramienta es: ***Histidine Kinase Activating Signaling Platform (HKASP)***.

#### C3.1 - Diseño general de la plataforma HKASP

El diseño base de la plataforma HKASP es similar al propuesto por Christina E. Lehning y colaboradores (Lehning et al., 2017). Estos autores diseñaron una plataforma en *Escherichia coli* para el escrutinio sistemático *in vivo* de librerías de moléculas pequeñas que inhiban el proceso de activación de HK implicadas en procesos de virulencia en bacterias patógenas, para su aplicación como antibióticos. Esta plataforma se basa en HK quiméricas (qHK) en las que se fusiona los dominios sensor-transmisor de una HK de interés (contra la que se buscan inhibidores de su proceso de activación; para la validación de la plataforma los autores usaron la HK NarX, que actúa como sensor de nitratos y nitritos), con los dominios catalíticos citosólicos de la HK EnvZ, que ha sido extensamente caracterizada, y que regula la activación del RR OmpR. Adicionalmente, se utiliza un gen reportero controlado por OmpR que codifica un producto fluorescente que puede ser monitorizado mediante citometría de flujo. El funcionamiento de esta plataforma se basa en que la qHK detecta las señales de activación de la HK que se desea

estudiar, pero la transducción de señales se produce a través de la cascada EnvZ-OmpR (extensamente caracterizada), que activa un gen reportero que pone de manifiesto el estado de activación de la ruta de transducción (Figura C3.1).



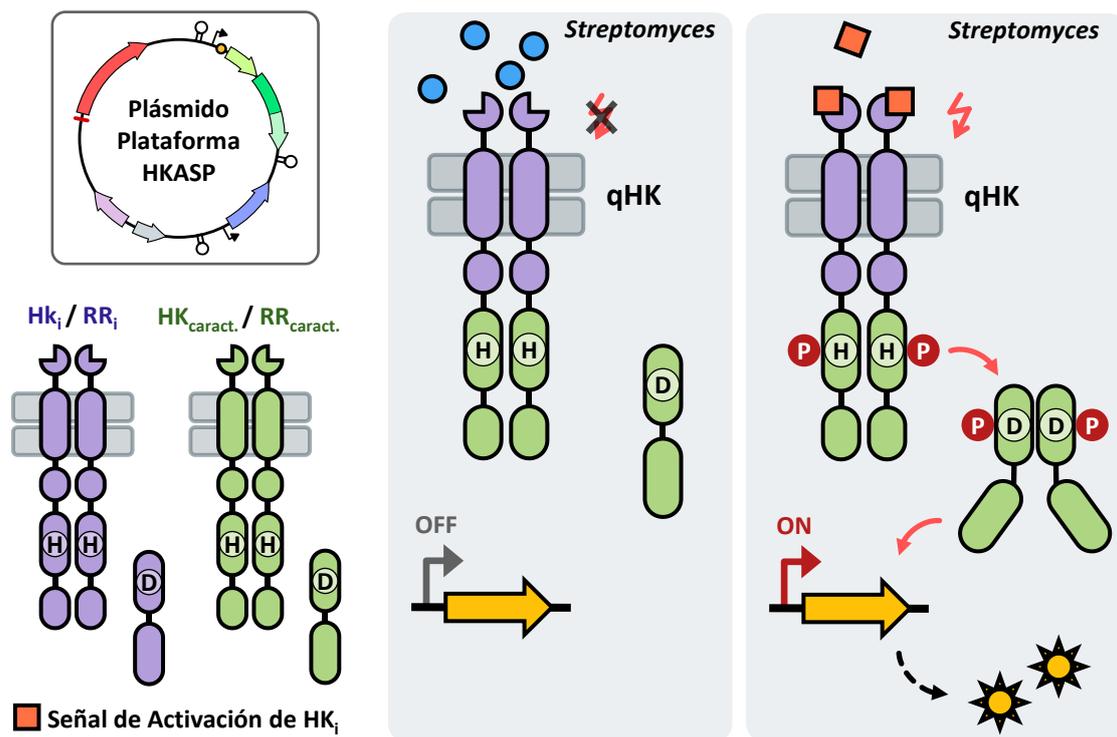
**Figura C3.1. Plataforma basada en Histidina Quinasas quiméricas (Lehning et al., 2017).** Plataforma en *E. coli* para el escrutinio sistemático *in vivo* de librerías de moléculas pequeñas que inhiban el proceso de activación de HK implicadas en procesos de virulencia en bacterias patógenas. Esta plataforma se basa en qHK formadas por la HK de interés que se desea estudiar ( $HK_i$ ) y EnvZ, que regula la activación del RR OmpR. Este regulador controla a su vez la expresión de los sistemas reporteros YFP y CFP (proteínas fluorescentes amarilla y cian).

La plataforma HKASP también se basa en qHK, en las que se fusionarán los dominios sensor-transmisor de una HK de interés cuya señal de activación se desee conocer, con los dominios citosólicos catalíticos de una HK previamente caracterizada en *S. coelicolor*. Junto con la qHK, la plataforma HKASP contendrá el RR regulado por la HK de la que se ha seleccionado el dominio catalítico, y un gen reportero que permitirá monitorizar la activación de este sistema de transducción quimérico (Figura C3.2). Además, la expresión del TCS quimérico será regulada por un *riboswitch*, lo que permitirá un control más preciso de esta herramienta.

Hasta ahora, todas las qHK construidas derivan de HK procedentes de bacterias de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Cyanobacteria*, por lo que las qHK generadas en la plataforma HKASP serían las primeras basadas en TCS de bacterias del filo *Actinobacteria*. Esto abriría las puertas al diseño de nuevas herramientas para el estudio de los TCS en este grupo bacteriano, que incluye desde los grandes productores de antibióticos del género *Streptomyces* hasta los patógenos del género *Mycobacterium*.

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

Otro de los aspectos clave en el diseño de la plataforma HKASP será la usabilidad. Esta construcción será incluida en un plásmido y presentará sitios específicos que faciliten su edición génica, tanto en la generación de las qHK como en la elección del gen reportero, de tal forma que su integración en el flujo de trabajo de un laboratorio en el que no se haya utilizado previamente sea lo más rápida y sencilla posible. Este aspecto es una de las principales diferencias con la plataforma propuesta por Christina E. Lehning y colaboradores (Lehning et al., 2017), y pretende ser uno de los pilares claves en la aplicación de esta herramienta.

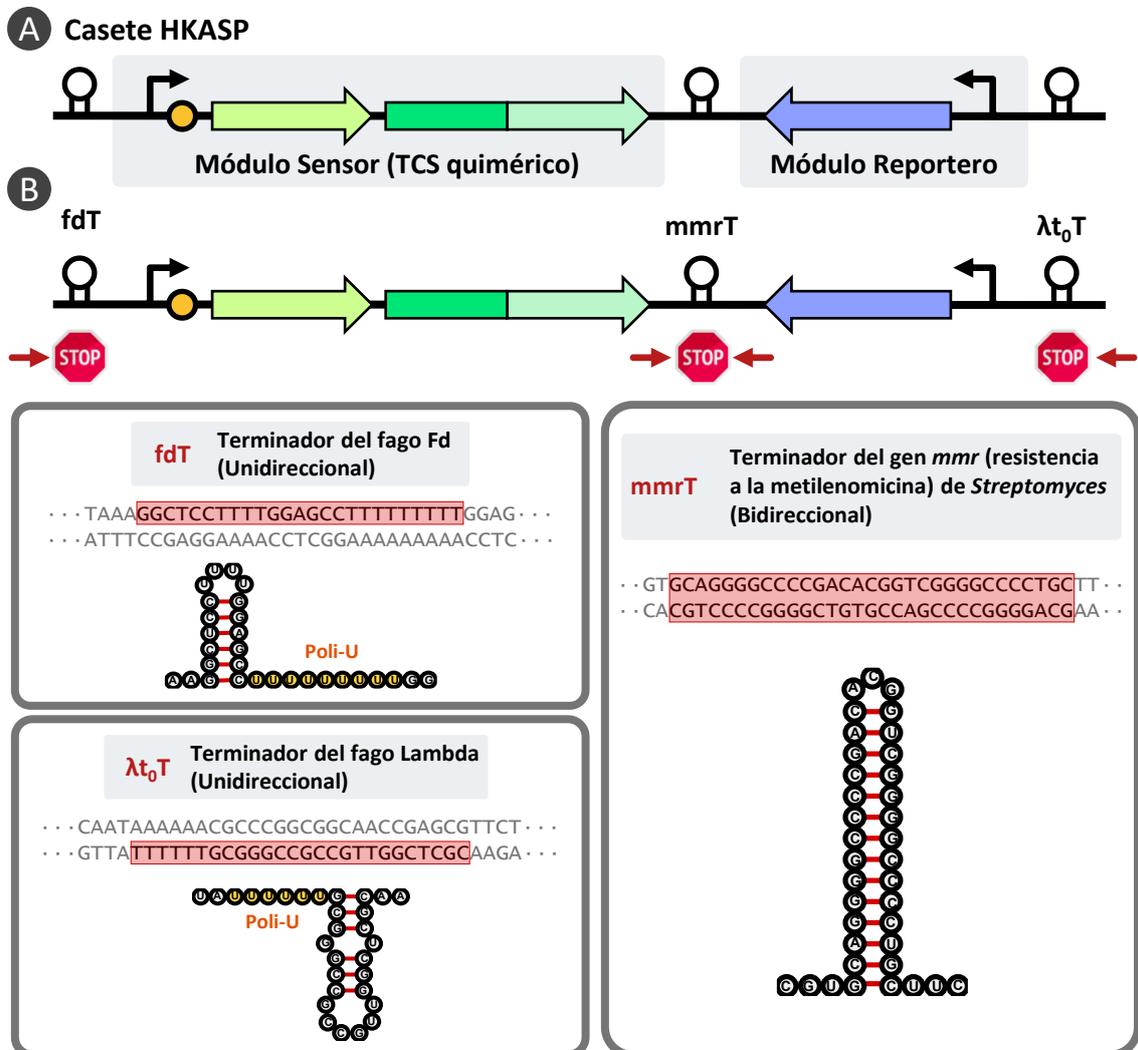


**Figura C3.2. Planteamiento de la plataforma HKASP.** La plataforma HKASP se basa en la generación de qHK, en las que se fusionarán los dominios sensor-transmisor de una HK de interés cuya señal de activación se desee conocer ( $HK_i$ ), con los dominios citosólicos catalíticos de una HK previamente caracterizada en *Streptomyces* ( $HK_{caract.}$ ). La plataforma HKASP también incluirá el  $RR_{caract.}$  y un gen reportero que permitirá monitorizar la activación del sistema de transducción quimérico. Además la plataforma HKASP será incluida en un plásmido, para facilitar su manipulación y posterior aplicación.

A continuación, se detalla el diseño del Casete HKASP, que será la construcción genética base sobre la que se apoyará esta herramienta, así como los plásmidos que portarán este casete genético y la cepa hospedadora en la que se podrá aplicar más eficientemente. El proceso de construcción se detalla en la sección de “Materiales y Métodos”, en los apartados “MM.6 - Diseño y construcción de vectores” y “MM.8 - Edición genómica mediante CRISPR-Cas9”. Cabe destacar que, debido a limitaciones de tiempo, aunque se han generado todas las construcciones genéticas, no se ha podido completar la validación de la plataforma HKASP durante la presente Tesis Doctoral, lo cual se comentará al final de este capítulo.

### C3.2 - Diseño y organización del Casete HKASP

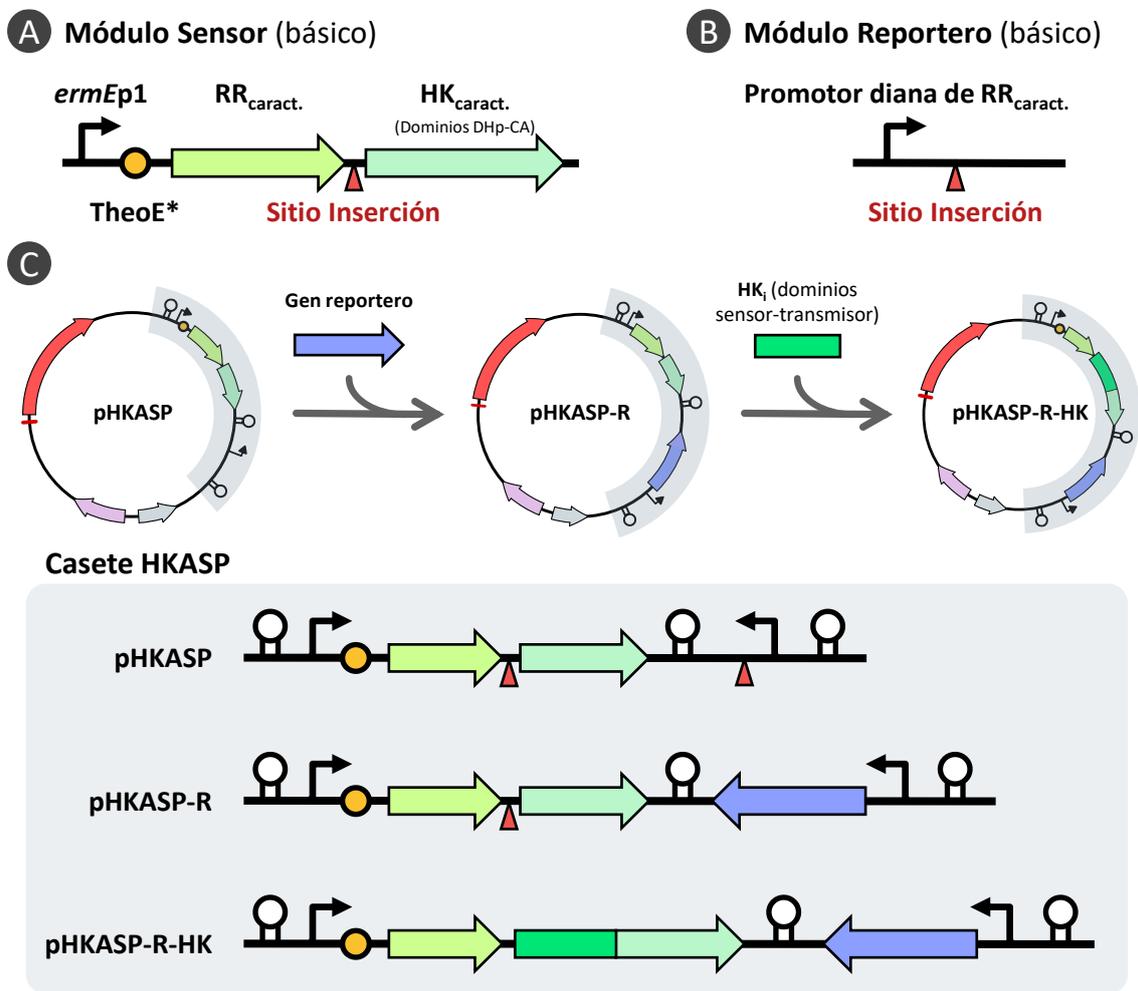
El Casete HKASP comprende dos módulos principales: el Módulo Sensor, que incluye el TCS quimérico; y el Módulo Reportero, que incluye el gen reportero. La orientación de las unidades transcripcionales presentes en ambos módulos es convergente (*Figura C3.3.A*). Los módulos del Casete HKASP se encuentran aislados a nivel transcripcional gracias a la inclusión de tres terminadores, dos de ellos situados en los extremos del casete (que lo aislarán de las regiones adyacentes), y el restante entre el Módulo Sensor y Módulo Reportero. En los extremos se situarán los terminadores unidireccionales del fago Fd y del fago Lambda ( $\lambda_{t_0}T$ , respectivamente), mientras que en la región central se situará el terminador bidireccional del gen *mmr* de resistencia a la metilenomicina (*mmrT*), procedente del plásmido SCP1 de *S. coelicolor* A3(2) (*Figura C3.3.B*).



**Figura C3.3. Diseño y organización del Casete HKASP (I).** [A] Diseño del Casete HKASP, que comprende el Módulo Sensor y Módulo Reportero. [B] Distribución de los terminadores en el Casete HKASP. Se muestra la secuencia y estructura secundaria que adquieren para finalizar la transcripción.

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

El Módulo Sensor, en su diseño básico, incluirá el promotor *ermEp1*, el *riboswitch* TheoE\*, el gen del RR, el sitio de inserción que permitirá introducir el fragmento del gen que codifica los dominios sensor-transmisor de la HK cuya señal de activación se desea identificar, y el fragmento del gen que codifica los dominios catalíticos (DHp y CA) de la HK asociada al RR (Figura C3.4.A). El Módulo Reportero, en su diseño básico, incluirá un promotor regulado por el RR del TCS quimérico, así como el sitio de inserción que permitirá introducir un gen reportero (Figura C3.4.B). Por lo tanto, el casete básico HKASP contiene todos los elementos requeridos para su funcionamiento, a excepción del dominio sensor de la HK que se desea estudiar y del gen reportero, aunque presenta los sitios de inserción para ambos. Este casete será introducido en un plásmido, que será denominado pHKASP, para facilitar su manipulación y posterior aplicación (Figura C3.4.C).



**Figura C3.4. Diseño y organización del Casete HKASP (II).** [A] Módulo Sensor del Casete HKASP en su diseño básico. [B] Módulo Reportero del Casete HKASP en su diseño básico. [C] Estrategia general de aplicación de la plataforma HKASP. El vector pHKASP contiene el casete básico. Al introducir el gen reportero se genera pHKASP-R. Finalmente, al introducir el fragmento del gen que codifica los dominios sensor-transmisor de la HK cuya señal de activación se desea identificar, se genera pHKASP-R-HK. La introducción de estos elementos se realizará en los sitios de inserción indicados.

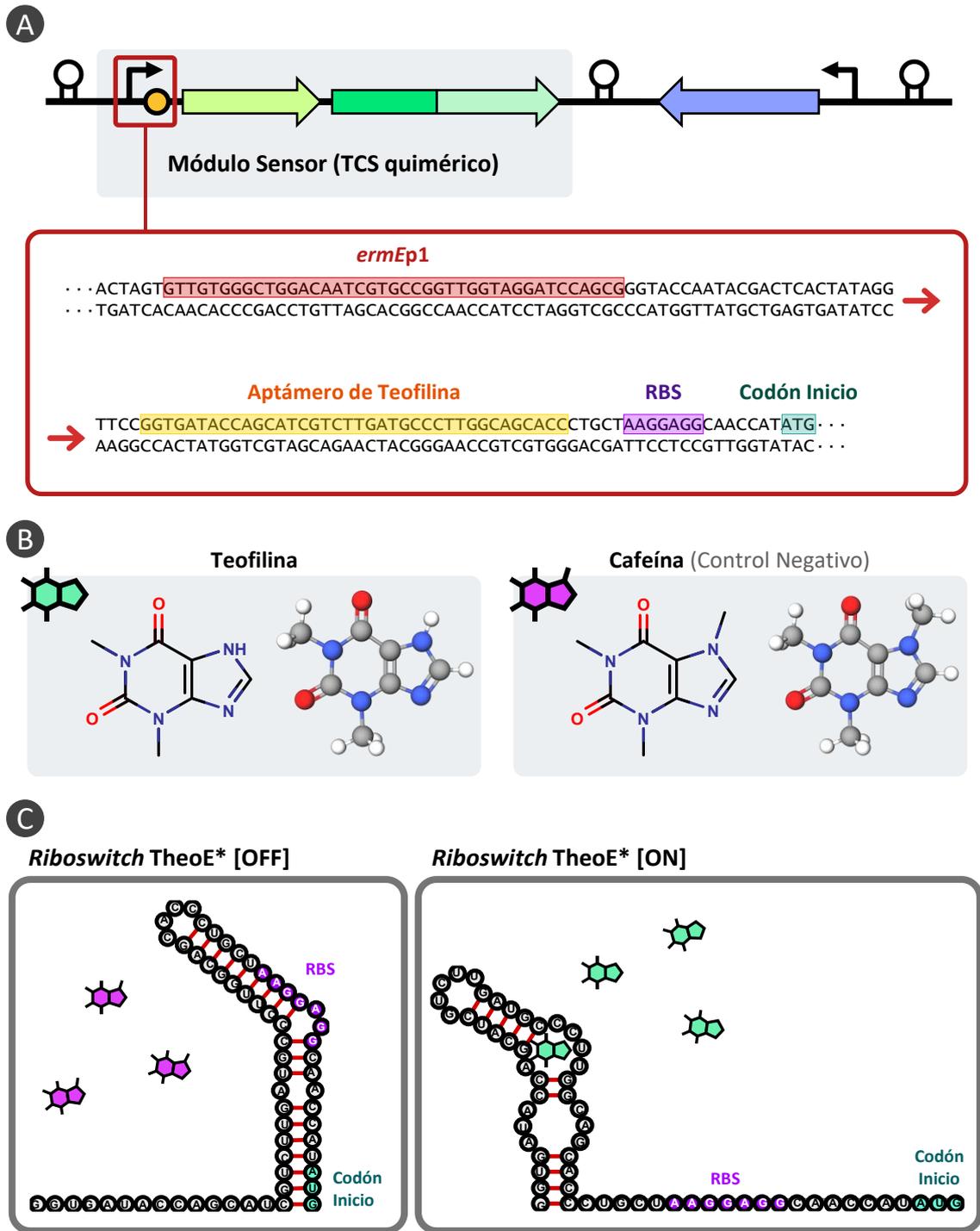
La estrategia general de cara a la aplicación de la plataforma HKASP empieza por generar un plásmido derivado del vector pHKASP, que contenga el gen reportero que se desee emplear, mediante su clonación en el sitio de inserción diseñado para ello, dando lugar al plásmido pHKASP-R (se asignará el nombre en función del gen seleccionado) (*Figura C3.4.C*). Durante el presente trabajo se generaron plásmidos de este tipo para ofrecer diferentes opciones de base.

Posteriormente, se generaría un plásmido derivado del vector pHKASP-R seleccionado, que contenga el fragmento del gen que codifica los dominios sensor-transmisor de la HK cuya señal de activación se desea identificar, fusionado al fragmento del gen que codifica los dominios catalíticos (DHP y CA) de la otra HK ya presente en el casete HKASP, dando lugar a un gen quimérico. Este fragmento de DNA será clonado en el sitio de inserción diseñado para ello, dando lugar al plásmido pHKASP-R-HK (se asignará el nombre en función de los genes seleccionados) (*Figura C3.4.C*). Este plásmido es el que será utilizado para la identificación de la señal de activación de la HK de interés.

### C3.3 - Módulo Sensor: Sistema de Dos Componentes quimérico

El TCS quimérico presente en el Módulo Sensor del Casete HKASP se encuentra bajo el control del promotor *ermEp1* (promotor constitutivo de potencia media, obtenido originalmente del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*) (Bibb et al., 1985) y el *riboswitch* TheoE\* (contiene un aptámero sintético de unión a teofilina que actúa como “interruptor” del proceso de traducción) (Jenison et al., 1994; Lynch et al., 2007), que constituyen un circuito genético que permite el control condicional de la expresión génica en *S. coelicolor* (Rudolph et al., 2013, 2015) (*Figura C3.5.A*).

En ausencia de teofilina (se puede utilizar cafeína como control, ya que es estructuralmente muy similar a la teofilina, pero no activa el *riboswitch* TheoE\*), tiene lugar la transcripción de los genes del TCS quimérico por el promotor *ermEp1*; sin embargo, no se produce la traducción de los RNA mensajeros debido al bloqueo de la secuencia Shine-Dalgarno de unión del ribosoma (RBS) y del codón de iniciación por el aptámero de teofilina. Al añadir teofilina al medio, se une al aptámero y produce un cambio conformacional que permite la traducción del TCS quimérico (*Figura C3.5.B-C*).

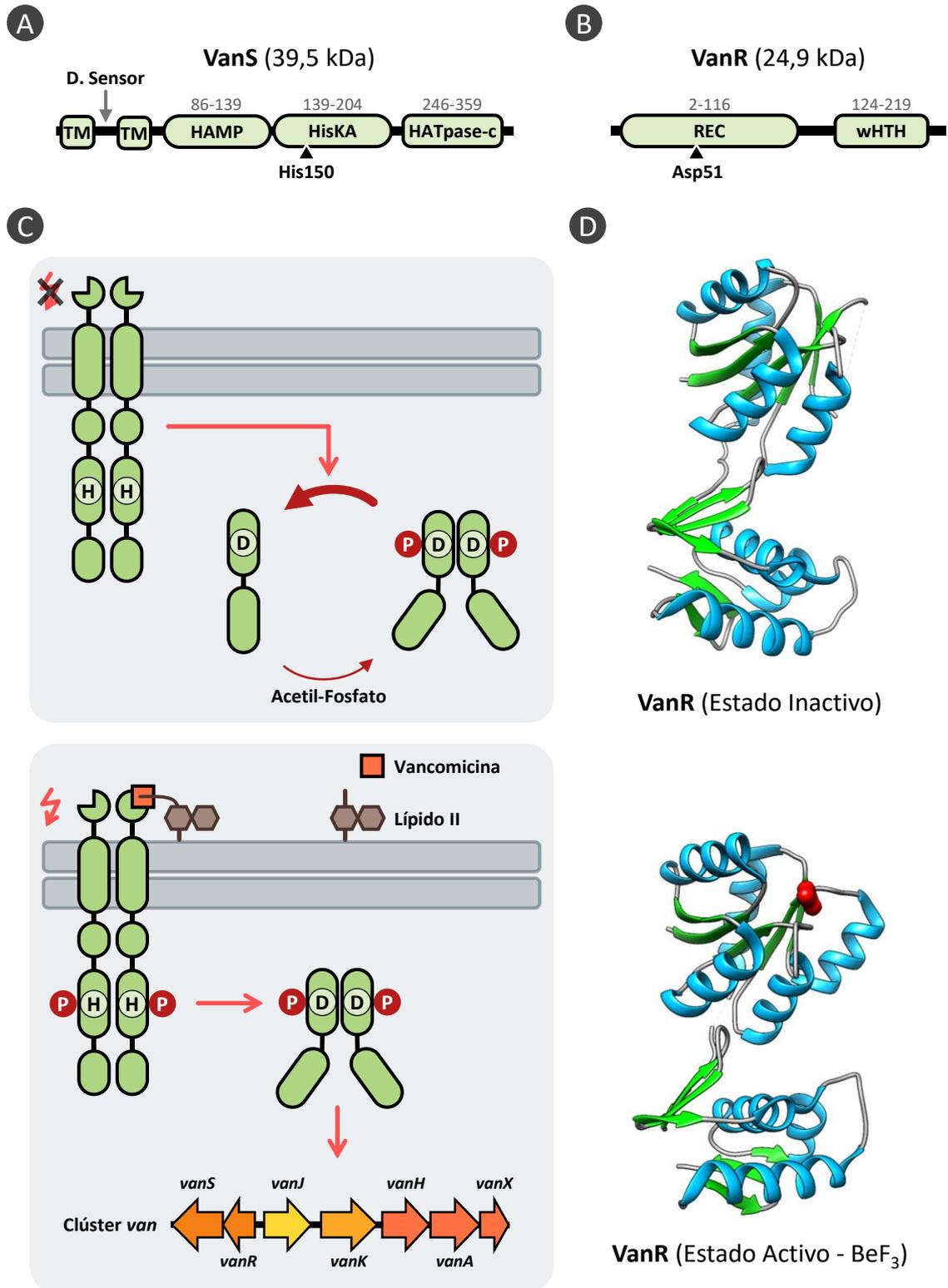


**Figura C3.5. Diseño del Módulo Sensor.** [A] Región promotora del TCS quimérico en el Módulo Sensor. [B] Estructura química de la teofilina y la cafeína. [C] Funcionamiento del *riboswitch* TheoE\*. Se muestran las estructuras secundarias de este motivo regulador en su estado apagado (izquierda) y encendido (derecha). En ausencia de teofilina (se emplea cafeína como análogo no inductor), el *riboswitch* se encuentra apagado, por lo que el RBS y el codón de inicio quedan inaccesibles. En presencia de teofilina, el *riboswitch* se encuentra encendido, dejando accesibles el RBS y el codón de iniciación, posibilitando el proceso de traducción.

El TCS previamente caracterizado en *S. coelicolor* que se ha seleccionado como base para la construcción del TCS quimérico, y que constituirá la ruta de transducción de la plataforma HKASP, es el sistema VanS/R (*SCO3589/90*). Este TCS es uno de los más extensamente caracterizados en *S. coelicolor*, y presenta una serie de características muy beneficiosas e interesantes de cara a la aplicación que se le pretende dar (*Figura C3.6*):

- Las proteínas VanS y VanR presentan una arquitectura canónica. La HK VanS presenta un tamaño de 364 aa (39,5 kDa) y una estructura clásica: dos regiones transmembrana (aa 12-37, 66-85), un dominio extracelular de recepción de la señal (aa 38-65) entre ambas regiones transmembrana, un dominio transmisor HAMP (aa 86-139), un dominio de dimerización-fosforilación HisKA (aa 139-204) que contiene el sitio de fosforilación (His150), y un dominio HATPase-c (aa 246-359) (*Figura C3.6.A*). El RR VanR presenta un tamaño de 231 aa (24,9 kDa) y pertenece a la familia OmpR; presenta un dominio receptor REC (aa 2-116) que contiene el sitio de fosforilación (Asp51) y un dominio de unión a DNA wHTH-OmpR/PhoB (aa 124-219) (*Figura C3.6.B*). A nivel genómico, en el operón de este sistema se encuentra primero el gen *vanR* y luego *vanS*, mismo orden que el establecido en el Módulo Sensor de la plataforma HKASP.
- La ruta de transducción de señales del TCS VanS/R se encuentra muy bien caracterizada (*Figura C3.6.C*). Se ha identificado la señal de activación de la HK VanS, y se ha caracterizado su interacción a nivel molecular con el dominio sensor (Koteva et al., 2010; Kwun et al., 2013; Lockey et al., 2020); se ha caracterizado la interacción entre VanS y VanR, con especial énfasis en el proceso de fosforilación / desfosforilación del RR VanR (Hutchings, Hong, & Buttner, 2006; Novotna et al., 2016); se ha determinado la estructura de VanR en su forma activa e inactiva (Maclunas et al., 2021) (*Figura C3.6.D*); y se han identificado las dianas de VanR, así como su función y papel fisiológicos (Hong et al., 2004, 2005; Hutchings, Hong, & Buttner, 2006).
- La función fosfatasa de la HK VanS juega un papel fundamental en esta cascada de señalización, impidiendo una activación indebida de la misma (debido por ejemplo a la fosforilación del RR VanR por fosfodonadores de bajo peso molecular como el acetil fosfato) (*Figura C3.6.C*). Este aspecto es crítico de cara a la plataforma HKASP, ya que constituye un mecanismo de control para bloquear la activación del sistema en ausencia de la señal.

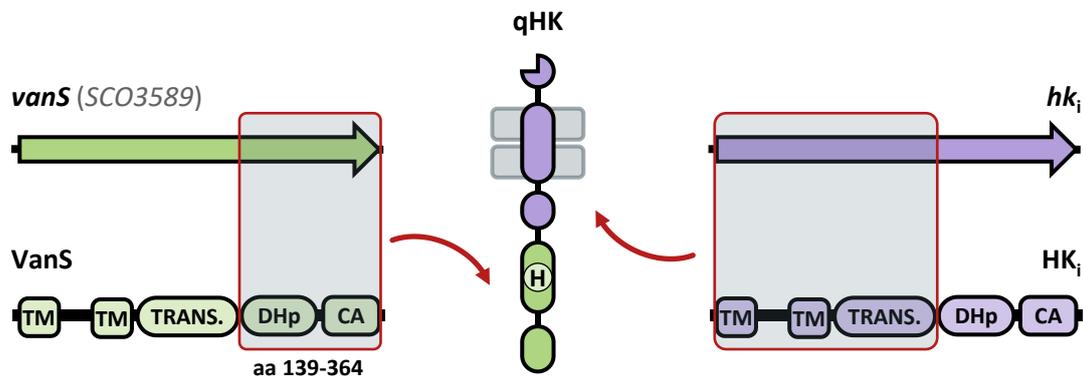
CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP



**Figura C3.6. Sistema de Dos Componentes VanS/R.** [A] Arquitectura de la HK VanS. [B] Arquitectura del RR VanR. [C] Ruta de transducción de señales del TCS VanS/R. Se muestra tanto en ausencia como en presencia de su señal de activación: vancomicina unida al intermediario Lípido II. [D] Estructura del RR VanR en su estado inactivo (PDB ID: 7LZ9) y en su estado activo (PDB ID: 7LZA). Se indica la estructura secundaria: láminas- $\beta$  en verde, y hélices- $\alpha$  en azul; en rojo se muestra la molécula de BeF<sub>3</sub>.

- El TCS VanS/R participa únicamente en la resistencia a vancomicina y en la respuesta al daño de pared celular, un proceso celular muy específico y no esencial en condiciones normales. El regulón de este sistema es muy reducido, solo comprende a los genes *vanSRJKHAX* (*SCO3589/90*; *SCO3592-96*) que forman el clúster *van* al que pertenece el propio TCS. Esto supone una ventaja de cara a identificar el motivo reconocido por VanR y seleccionar un promotor para su uso en el Módulo Reportero de la plataforma HKASP. También facilita el diseño de un hospedador óptimo que no interfiera en el funcionamiento de la plataforma HKASP.

La región seleccionada de la HK VanS para generar la qHK es la comprendida entre los aminoácidos 139-364, que incluye el dominio HisKA (DHp) y HTPase-c (CA), y va justo desde el comienzo del dominio DHp hasta el final de la proteína. Por lo tanto, la región que se deberá seleccionar en la HK cuya señal de activación se desee identificar (HK<sub>i</sub>) irá desde el inicio de la proteína hasta el comienzo del dominio DHp (*Figura C3.7*). Como se ha explicado anteriormente, este diseño de fusión para generar las qHK es el que mejor resultados ha mostrado en términos de funcionalidad de la proteína quimérica.



**Figura C3.7. Histidina Quinasa quimérica en la plataforma HKASP.** Estrategia de fusión para generar la qHK en la que se basa la plataforma HKASP, a partir de la HK VanS, y una HK cuya señal de activación se desee identificar (HK<sub>i</sub>).

El último punto clave que hay que tratar dentro del Módulo Sensor es el diseño del sitio de inserción que se utilizará para introducir los dominios sensor-transmisor de la HK de interés. Se ha decidido que este sitio de inserción no se encuentre al inicio del operón del TCS quimérico para evitar solapamientos con el sitio de inserción del gen reportero (que sí debe situarse obligatoriamente tras el promotor incluido en el Módulo Reportero) en la selección de sitios de restricción y en la estrategia de clonación. Por ello, el operón comienza con el gen *vanR* y el sitio de inserción se encuentra entre este gen y el fragmento del gen *vanS* (nt 415-1095).

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

Se ha descartado utilizar un sitio de clonación múltiple (MCS) para no separar demasiado los genes del operón, por si afecta a la transcripción del mismo. Se pretende que el sitio de inserción sea pequeño y comprenda pocos sitios de restricción, pero que estos presenten una elevada usabilidad. El que solo se vayan a clonar secuencias codificantes en este sitio de inserción facilita la búsqueda de enzimas óptimas para el mismo. Se ha realizado una búsqueda de enzimas de restricción que reconozcan secuencias cuya tasa de aparición en secuencias codificantes del genoma de *S. coelicolor* sea muy baja, y que presenten varios isocaudómeros (enzimas de restricción que reconocen secuencias distintas, pero generan extremos cohesivos compatibles). Para esta búsqueda se ha aprovechado el hecho de que los sitios de restricción habituales son secuencias de 6 bp, que pueden ser divididos en dos grupos de 3 bp, mismo tamaño que presentan los codones, por lo que al analizarlos en función de la frecuencia encontrada para dichos codones en *S. coelicolor* gracias a la base de datos CUTG (Nakamura et al., 2000) (Figura C3.8), se puede hacer una estimación de la incidencia de los sitios de restricción en regiones codificantes. Esta metodología de búsqueda ha ofrecido muy buenos resultados, tal y como se muestra en Figura C3.9.

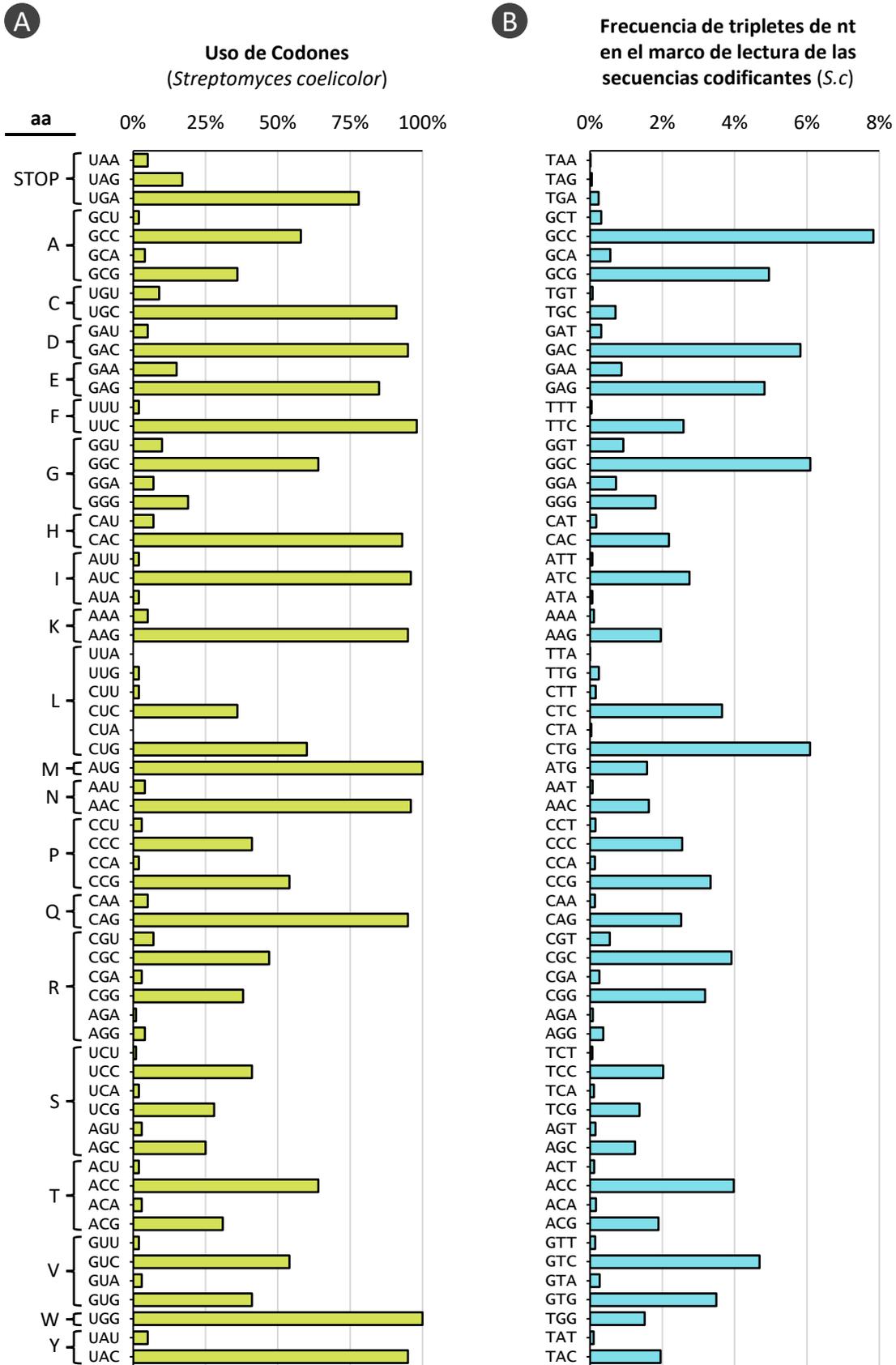
Se decidió que el sitio de inserción esté formado por los sitios de restricción AvrII (C↓CTAG↑G) y EcoRV (GAT↓↑ATC) (Figura C3.10). La clonación en este sitio de inserción es de orientación dirigida, ya que AvrII genera extremos cohesivos.

En el caso de AvrII, el sitio de restricción presenta una incidencia muy baja en regiones codificantes, ya que los tripletes de nucleótidos que lo forman presentan una baja frecuencia de aparición; además, presenta 3 isocaudómeros que también presenta una tasa de aparición muy reducida en regiones codificantes: SpeI (A↓CTAG↑T; a veces bloqueado por metilación EcoKI), NheI (G↓CTAG↑C), y XbaI (T↓CTAG↑A; a veces bloqueado por metilación Dam) (Tabla C3.1). Esto es especialmente importante de cara a la estrategia de clonación, ya que el fragmento que sea introducido en el sitio de inserción debe presentar un extremo cohesivo compatible.

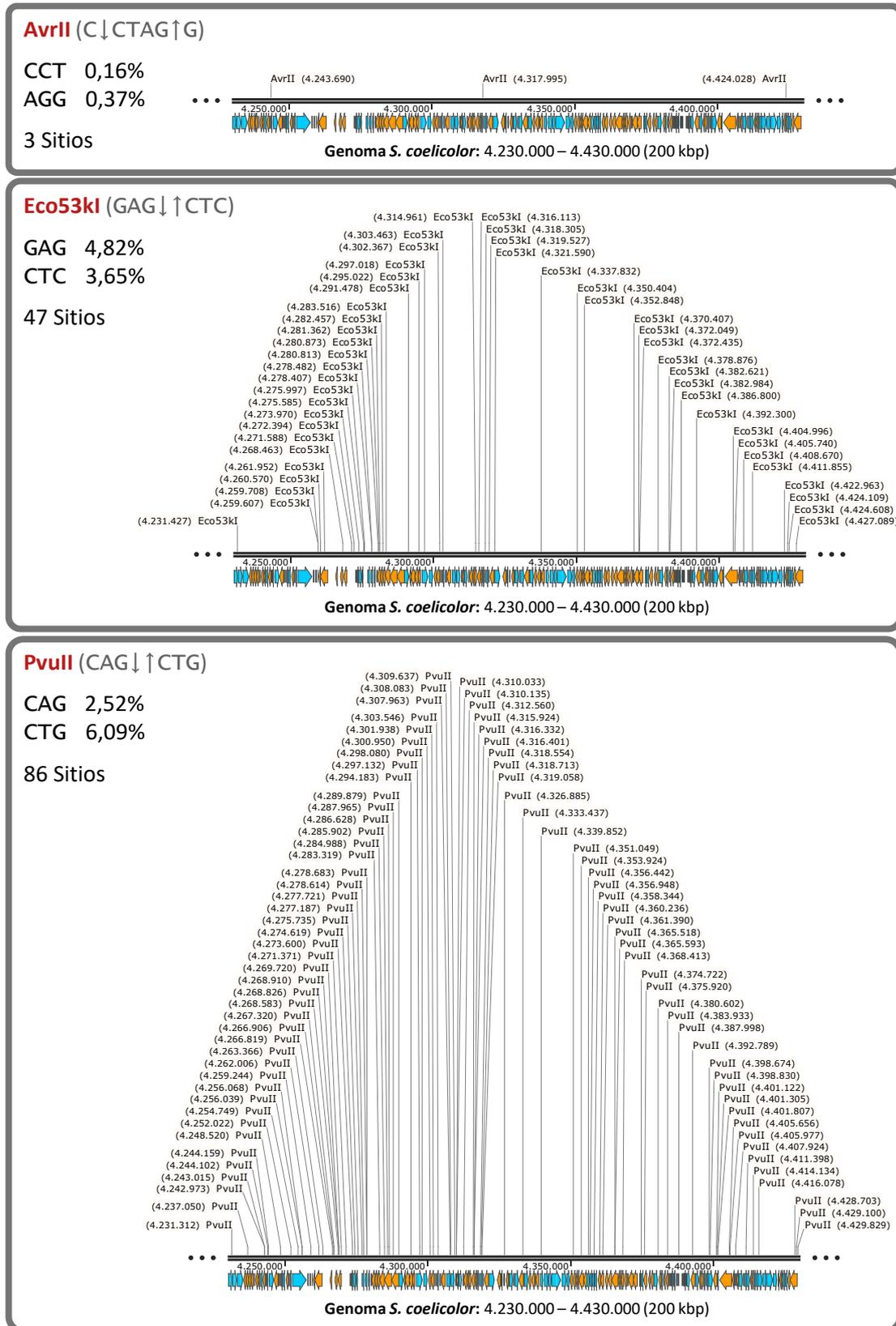
**Tabla C3.1. Sitio de inserción del Módulo Sensor (I).** Se muestran enzimas compatibles con el extremo cohesivo del sitio de inserción del Módulo Sensor. Se indica la frecuencia de los tripletes de nucleótidos que forman los sitios de restricción en el marco de lectura de secuencias codificantes.

Enzima	Sitio de Restricción	Frecuencia de Tripletes		Isoesquizómeros	Bloqueo
AvrII	C↓CTAG↑G	CCT 0,16%	AGG 0,37%	XmaJI, BlnI, AspA21	-
SpeI	A↓CTAG↑T	ACT 0,12%	AGT 0,15%	AhII, BcuI	Metilación EcoKI
NheI	G↓CTAG↑C	GCT 0,31%	AGC 1,25%	AsuNHI	-
XbaI	T↓CTAG↑A	TCT 0,06%	AGA 0,08%	-	Metilación Dam

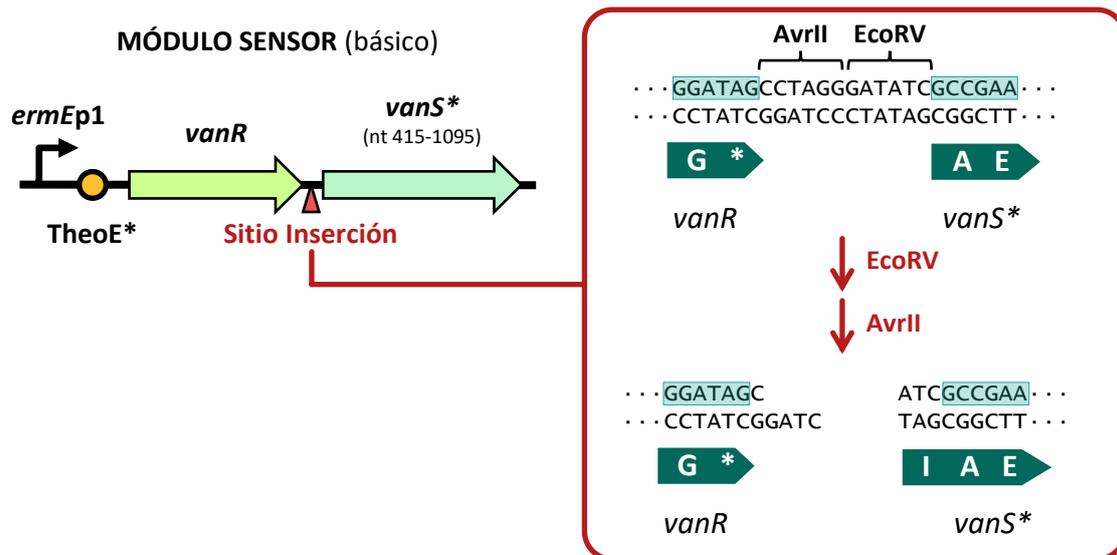
\*Los isoesquizómeros indicados, además de reconocer la misma secuencia, también realizan el mismo corte.



**Figura C3.8. Frecuencia de tripletes de nucleótidos en secuencias codificantes. [A]** Uso de codones en *S. coelicolor*. A la izquierda se indican los aminoácidos correspondientes a los distintos codones. **[B]** Frecuencia global de tripletes de nucleótidos en el marco de lectura de las secuencias codificantes de *S. coelicolor*. Datos obtenidos de la base de datos *CUTG*.



**Figura C3.9. Estrategia de búsqueda de sitios de restricción óptimos.** Se ha realizado una búsqueda de enzimas de restricción que reconozcan secuencias cuya tasa de aparición en secuencias codificantes del genoma de *S. coelicolor* sea muy baja. La incidencia se ha estimado en base a la frecuencia de los dos tripletes de nucleótidos que forman el sitio de restricción en el marco de lectura de las secuencias codificantes. Se muestran como ejemplo AvrII, Eco53kI y PvuII, cuyos sitios de restricción se muestran en una región de 200 kbp del genoma de *S. coelicolor*.



**Figura C3.10. Sitio de inserción del Módulo Sensor.** Se muestran la secuencia del sitio de inserción del Módulo Sensor, formada por los sitios de restricción *AvrII* y *EcoRV*. *AvrII* genera un extremo cohesivo que permite la clonación con orientación dirigida. *EcoRV* genera un extremo romo para facilitar la clonación del fragmento de gen de la HK de interés y construir el gen quimérico; tras el corte con esta enzima queda como remanente el triplete ATC, que codifica para el aminoácido Ile (el uso de este codón es del 96%) y constituirá el punto de fusión de los fragmentos de las HK. La digestión con estas enzimas debe ser secuencial: primero con *EcoRV* y luego con *AvrII* (si se realizara al contrario y se iniciara el proceso con *AvrII*, no quedaría el número de nucleótidos necesarios en el borde para permitir el corte de *EcoRV*).

En el caso de *EcoRV*, el sitio de restricción se encuentra justo en el punto de fusión del gen quimérico. Por ello, se ha tenido en cuenta que el triplete de nucleótidos remanente tras el corte (ATC) presente una frecuencia elevada en el uso de codones de este organismo (*Figura C3.8*), y que codifique un aminoácido con unas propiedades fisicoquímicas adecuadas para el sitio en el que se encuentra. Este sitio no es especialmente importante de cara a la estrategia de clonación, ya que se genera un extremo romo que ofrece muchas posibilidades, para facilitar la construcción del gen quimérico.

Un aspecto importante de cara al proceso de clonación es que la digestión del sitio de inserción debe ser secuencial: primero con *EcoRV* y luego con *AvrII*. Si se realizara al contrario y se iniciara el proceso con *AvrII*, no quedaría el número de nucleótidos necesarios en el borde para permitir el corte de *EcoRV*.

Teniendo todo esto en cuenta, a la hora de obtener el fragmento génico de la HK de interés que va a ser introducido en el Módulo Sensor, se debe incluir el sitio de restricción *AvrII* justo antes del codón de iniciación (o alguna de las alternativas indicadas). En el otro extremo del fragmento existen varias posibilidades al ser una clonación en romo: se puede optar por no utilizar sitios de restricción (la PCR debe realizarse con una polimerasa que no deje nucleótidos A o G salientes

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

en 3') o cualquier sitio de restricción como en el que el triplete de nucleótidos remanentes en la secuencia codificante tras el corte presente una frecuencia elevada en el uso de codones de este organismo (*Tabla C3.2*).

**Tabla C3.2. Sitio de inserción del Módulo Sensor (II).** Se muestran enzimas compatibles con el extremo como del sitio de inserción del Módulo Sensor (su uso es opcional). Se indica el codón remanente en la secuencia codificante en el fragmento génico de la HK de interés tras la digestión (se incluye el uso de dichos codones en *S. coelicolor*).

Enzima	Codón remanente			
MscI*	TGG↓CCA	TGG	Trp	100%
SnaBI	TAC↓GTA	TAC	Tyr	95%
FspI	TGC↓GCA	TGC	Cys	91%
NruI*	TCG↓CGA	TCG	Ser	28%
AfeI	AGC↓GCT	AGC	Ser	25%
PvuII	CAG↓CTG	CAG	Gln	95%
ZraI	GAC↓GTC	GAC	Asp	95%

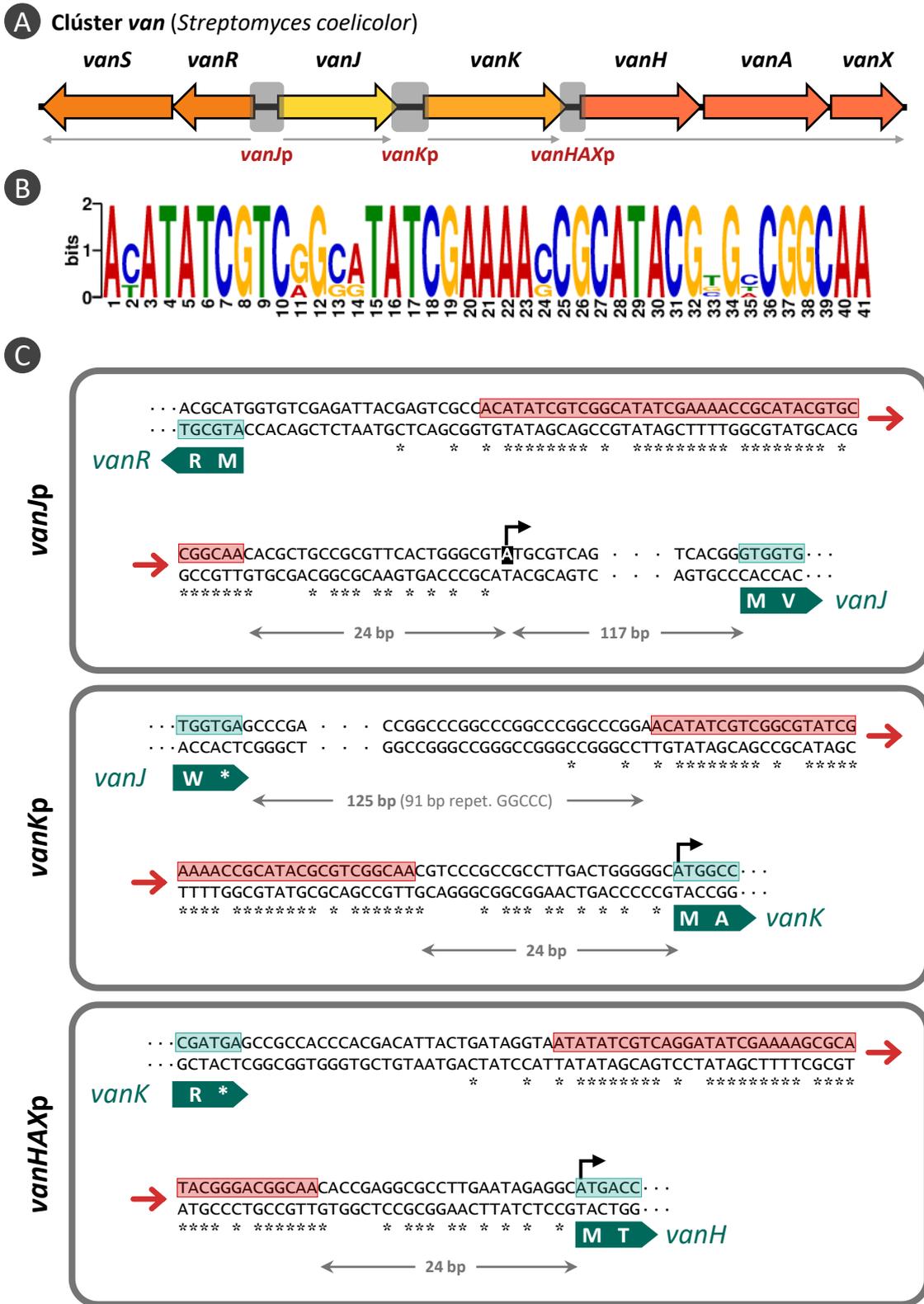
Enzima	Codón remanente			
BmgBI*	CAC↓GTC	CAC	His	93%
PmlI*	CAC↓GTG	CAC	His	93%
Eco53kI	GAG↓CTC	GAG	Glu	85%
SfoI*	GGC↓GCC	GGC	Gly	64%
BsrBI	CCG↓CTC	CCG	Pro	54%
SmaI	CCC↓GGG	CCC	Pro	41%

\*MscI a veces bloqueado por metilación Dcm. NruI y SfoI a veces bloqueados por metilación Dam. BmgBI y PmlI a veces bloqueados por metilación EcoKI.

### C3.4 - Módulo Reportero

El Módulo Reportero, en su versión final, contiene un gen reportero bajo el control de un promotor regulado por el RR VanR, que permite monitorizar la activación del TCS quimérico. Para el diseño del promotor se analizaron los tres promotores diana de VanR: *vanJp*, *vanKp* y *vanHAXp* (*Figura C3.11.A*); y se realizó una búsqueda de motivos conservados en dichos promotores (no se ha descrito ningún motivo de unión de VanR en *S. coelicolor*) mediante la herramienta MEME (Bailey & Elkan, 1994). Se identificó un motivo bastante largo (41 bp) muy conservado en los tres promotores, que seguramente esté implicado en la regulación por VanR (*Figura C3.11.B-C*); este motivo solo está presente en el clúster *van* y no es similar a otros motivos presentes en las bases de datos, lo cual se determinó mediante las herramientas FIMO (Grant et al., 2011) y TOMTOM (Gupta et al., 2007) respectivamente.

Se seleccionó el promotor *vanHAXp* para su utilización en la plataforma HKASP, ya que *vanJp* se encuentra solapado con *vanSRp*, y *vanKp* presenta una región con un gran número de repeticiones de GGCC justo antes del motivo consenso (lo que dificulta su manipulación genética). El promotor *vanHAXp* presenta un sitio de restricción EcoRV en el motivo consenso, que interfiere con la estrategia de clonación del del sitio de inserción del Módulo Sensor. Para solucionar este problema se decidió sustituir el nucleótido de guanina de la posición 13 del motivo consenso por una citosina; esta modificación elimina el sitio EcoRV y no debería afectar a la funcionalidad del promotor, ya que en los otros dos promotores hay una citosina en dicha posición (*Figura C3.12*). El nuevo promotor modificado se ha denominado *vanH\*p*.



**Figura C3.11. Análisis de promotores del clúster *van*.** [A] Clúster *van*, formado por cuatro unidades transcripcionales *vanSR*, *vanJ*, *vanK* y *vanHAX*. [B] Potencial motivo implicado en la regulación por VanR; identificado mediante la herramienta MEME. [C] Localización del motivo (marcado en rojo) en los promotores *vanJp*, *vanKp* y *vanHAXp*. En las secuencias también se indican los nucleótidos conservados en los tres promotores (marcados con asterisco), las secuencias codificantes de los genes (marcados en verde; también se muestran los aminoácidos) y el punto de inicio de la transcripción (marcado con una flecha negra en la parte superior de las secuencias).

**A** *vanHAXp*



**B**



**Figura C3.12. Modificación del promotor *vanHAXp*.** [A] Secuencia del promotor *vanHAXp*. Se indica el motivo regulador del clúster *van* (rojo), así como el inicio de la secuencia codificante de *vanH* (verde). En el motivo regulador se muestra el sitio de restricción reconocido por EcoRV, así como el residuo G que se ha decidido mutar. [B] Motivo regulador del clúster *van*. Se indica el nucleótido que va a ser modificado para eliminar el sitio de restricción de EcoRV. El nuevo promotor modificado se ha denominado *vanH\*p*.

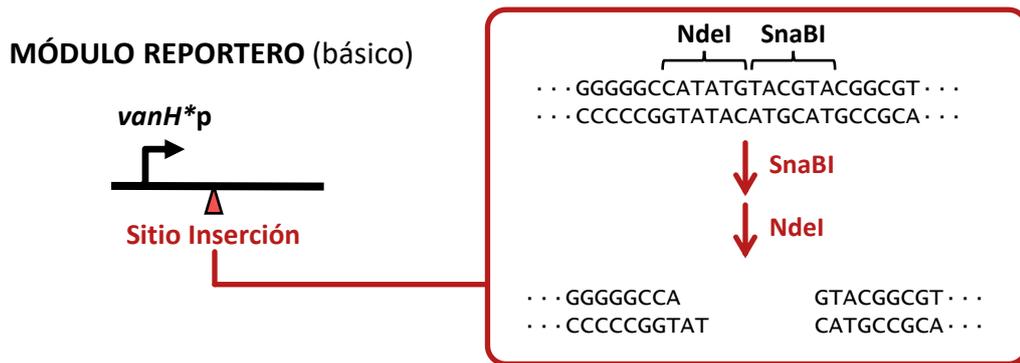
El último aspecto clave que hay que tratar dentro del Módulo Reportero es el diseño del sitio de inserción que se utilizará para introducir el gen reportero. Se decidió que esté formado por los sitios de restricción NdeI (CA↓TA↑TG) y SnaBI (TAC↓↑GTA) (Figura C3.13). La clonación en este sitio de inserción es de orientación dirigida, ya que NdeI genera extremos cohesivos.

Se ha seleccionado NdeI ya que incluye el codón de iniciación en el sitio de restricción, por lo que no supone una gran alteración del promotor ni de su proximidad al gen al cual va a controlar. Sin embargo, debido precisamente a esto, su incidencia en las regiones codificantes no es tan baja. Como alternativa para la estrategia de clonación, se puede utilizar el isocaudómero AseI (AT↓TA↑AT) en el extremo del gen que se va a introducir en este sitio de inserción. AseI genera un extremo cohesivo compatibles con NdeI, además su tasa de aparición en secuencias codificantes es muy baja por lo que presenta una mayor usabilidad; sin embargo, el sitio de restricción no incluye el codón de iniciación, por lo que hay que tenerlo en cuenta en el diseño e incluirlo tras el sitio de restricción (Tabla C3.3).

**Tabla C3.3. Sitio de inserción del Módulo Reportero.** Se muestran enzimas compatibles con el extremo cohesivo del sitio de inserción del Módulo Reportero. Se indica la frecuencia de los tripletes de nucleótidos que forman los sitios de restricción en el marco de lectura de secuencias codificantes.

Enzima	Sitio de Restricción	Frecuencia de tripletes		Isoesquizómeros	Notas
NdeI	CA↓TA↑TG	CAT 0,17%	ATG 1,58%	FauNDI	Incluye el codón de iniciación
AseI	AT↓TA↑AT	ATT 0,06%	AAT 0,07%	PshBI, VspI	No incluye el codón de iniciación

\*Los isoesquizómeros indicados, además de reconocer la misma secuencia, también realizan el mismo corte.



**Figura C3.13. Sitio de inserción del Módulo Reportero.** Se muestran la secuencia del sitio de inserción del Módulo Reportero, formada por los sitios de restricción NdeI y SnaBI. NdeI genera un extremo cohesivo que permite la clonación con orientación dirigida. SnaBI genera un extremo romo. La digestión con estas enzimas debe ser secuencial: primero con SnaBI y luego con NdeI (si se realizara al contrario y se iniciara el proceso con NdeI, no quedaría el número de nucleótidos necesarios en el borde para permitir el corte de SnaBI).

En el caso de SnaBI, se genera un extremo romo, por lo que este sitio no es especialmente importante de cara a la estrategia de clonación, ya que ofrece muchas posibilidades.

Un aspecto importante de cara al proceso de clonación es que la digestión del sitio de inserción debe ser secuencial: primero con SnaBI y luego con NdeI. Si se realizara al contrario y se iniciara el proceso con NdeI, no quedaría el número de nucleótidos necesarios en el borde para permitir el corte de SnaBI.

Teniendo todo esto en cuenta, a la hora de obtener el gen reportero que va a ser introducido aquí, se debe incluir el sitio de restricción NdeI justo al inicio (o AseI como alternativa). En el otro extremo del fragmento existen varias posibilidades al ser una clonación en romo: se puede optar por no utilizar sitios de restricción (la PCR debe realizarse con una polimerasa que no deje nucleótidos A o G salientes en 3') o cualquier sitio de restricción romo que no esté presente en el gen reportero.

### C3.5 - Plásmido pHKASP y derivados

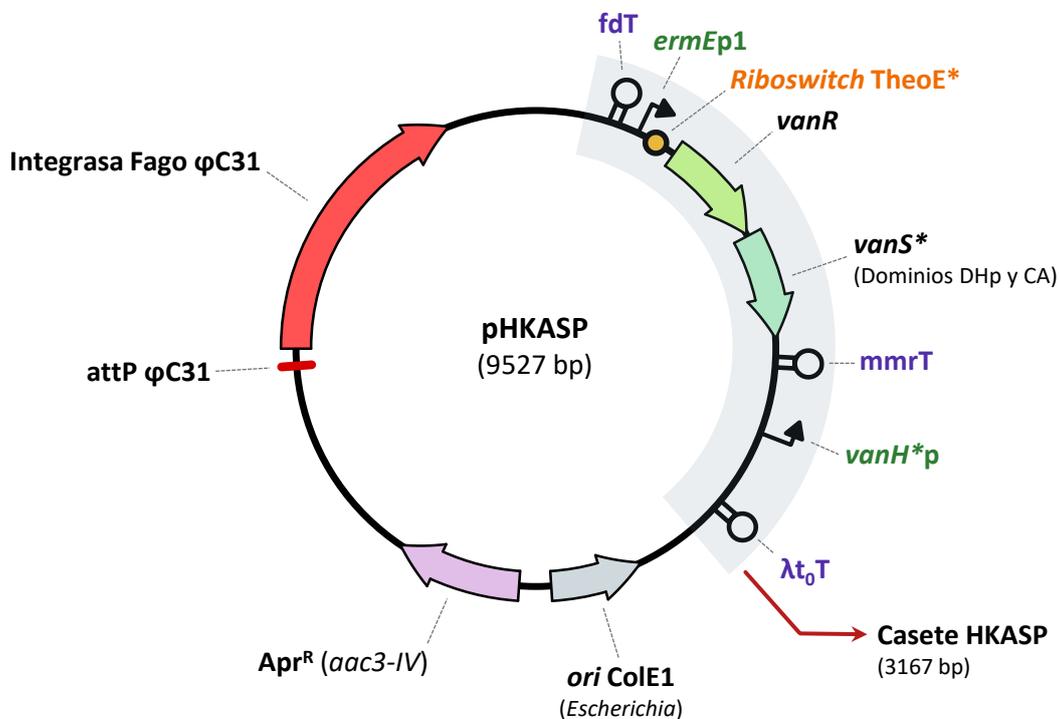
Como se ha comentado anteriormente, el casete básico HKASP (que no contiene el dominio sensor de la HK que se desea estudiar ni el gen reportero) se debe introducir en un plásmido para facilitar su manipulación y posterior aplicación. El casete HKASP se encuentra flanqueado por los sitios de restricción BglII (A↓GATC↑T) y DraI (TTT↓↑AAA), que serán utilizados para su clonación en el plásmido base.

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

Como plásmido base se decidió utilizar pKC796A, que es un vector bifuncional *Escherichia-Streptomyces*, y que presenta el sistema de integración del fago  $\phi$ C31 (Kuhstoss et al., 1991). El Casete HKASP puede ser clonado fácilmente en este vector en los sitios BglIII-DraI, y al ser un plásmido integrativo permite la incorporación genómica de la plataforma HKASP para su aplicación. El sistema de integración del fago  $\phi$ C31 presenta un sitio *attB* principal (constituye el punto de integración) en el gen *SCO3798*, así como varios sitios pseudo-*attB* que permiten integraciones adicionales, aunque no es demasiado habitual ya que la inserción en el sitio principal es 300 veces más eficiente que en los sitios secundarios (Combes et al., 2002).

El plásmido generado por la clonación del Casete HKASP básico en el plásmido pKC796A se ha denominado pHKASP, y ha sido construido con éxito (Figura C3.14). El proceso (que incluye la generación del Casete HKASP) se detalla en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”.

Aunque se ha planteado esta estrategia, el Casete HKASP puede ser clonado en otros plásmidos si fuera necesario, por ejemplo, en el plásmido multicopia pN702GEM3 (en este caso la clonación se realizaría en los sitios BglIII-Eco53kl del vector).



**Figura C3.14.** Esquema del vector pHKASP. Solo se muestran los promotores y terminadores relevantes para la aplicación del vector.

Una vez construido el plásmido pHKASP se decidió introducir diferentes genes reporteros, para generar plásmidos derivados que puedan ser utilizados como base en la aplicación de la plataforma HKASP. Se escogieron la xilanasa Xys1 (codificada por el gen *xysA* de *Streptomyces halstedii*) y la glucuronidasa GusA (codificado por el gen *gusA* de *E. coli*, optimizado para *Streptomyces*), enzimas que ya han sido utilizadas como sistemas reporteros en *Streptomyces* (Horbal et al., 2018; Myronovskyi et al., 2011; Rico, Yepes, et al., 2014; Rudolph et al., 2013; Sevillano et al., 2016). Los plásmidos generados por la clonación de *xysA* y *gusA* en el plásmido pHKASP se han denominado pHKASP-X y pHKASP-G, respectivamente, y han sido construidos con éxito. El proceso se detalla en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”.

Aunque se han seleccionado estos sistemas reporteros, se pueden introducir otros para su aplicación si es necesario, como *xylE* (González-Cerón et al., 2001; Ingram et al., 1989; Wang et al., 2015), *cat* (Hodge et al., 1995), *neo* (Wang et al., 2013, 2015; Xiang et al., 2009), *luxAB* (Craney et al., 2007; Wang et al., 2015; Weiser et al., 2006), *gfp* (Bai et al., 2015; Hamed et al., 2018; Santos-Beneit & Errington, 2017; Sun et al., 1999) o *rfp* (Nguyen et al., 2007).

### C3.6 - Cepa hospedadora de la plataforma HKASP

El TCS quimérico presente en la plataforma HKASP está basado en el TCS VanS/R. Por lo tanto, aunque esta herramienta puede ser aplicada en la cepa de uso habitual *S. coelicolor* M145 (siempre que no se evalúen situaciones que produzcan daños en la pared celular), lo ideal es generar una cepa carente del clúster *van* para que no exista ninguna interferencia con la plataforma HKASP y pueda ser utilizada de la forma más óptima posible.

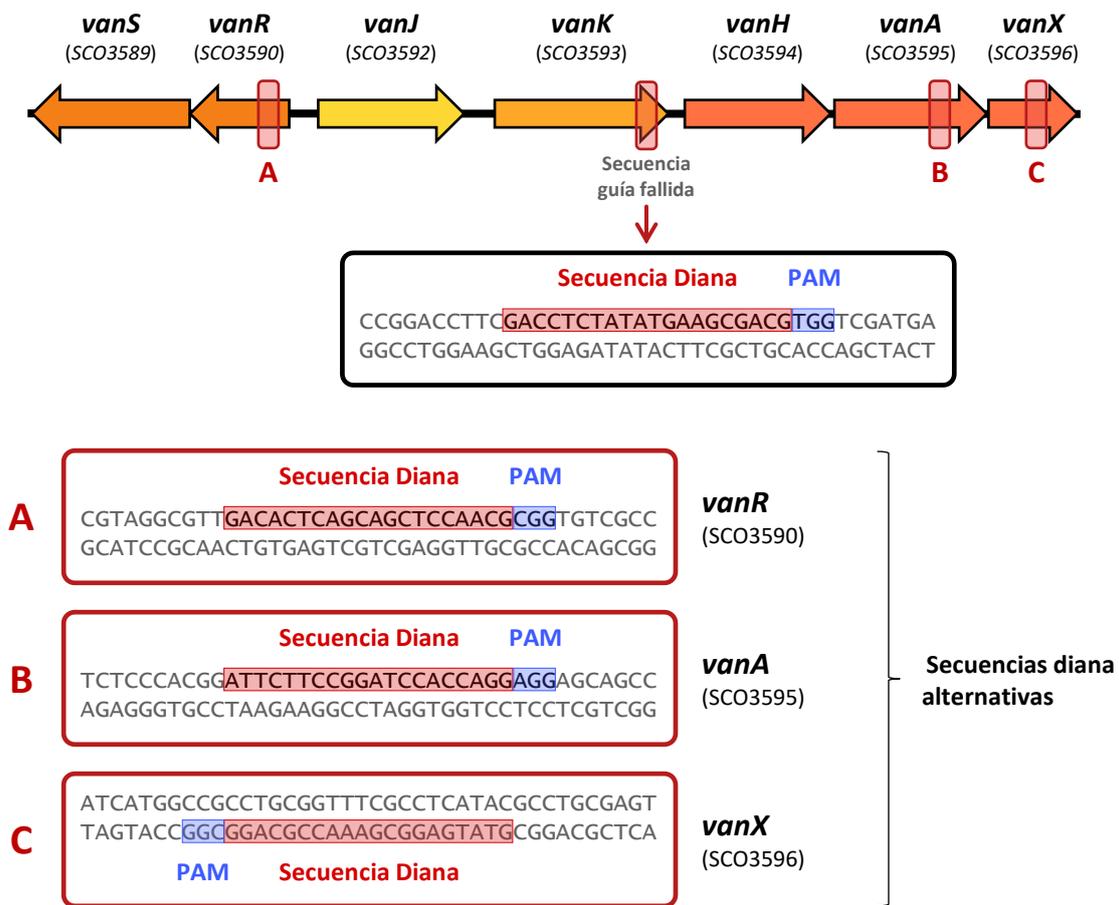
El clúster *van* no es esencial, y en condiciones normales no interfiere con ningún otro proceso celular, por lo que su eliminación completa no debería afectar al comportamiento normal de *S. coelicolor*, con la salvedad de que la cepa generada sería sensible a vancomicina y antibióticos relacionados (y resistente a apramicina cuando se introduzca un plásmido derivado de pHKASP y se integre a nivel genómico). El clúster *van* presenta un tamaño de 7,2 kbp, por lo que su delección mediante la tecnología CRISPR-Cas9 no debería suponer ningún problema, ya que se ha demostrado su capacidad de deleccionar regiones de hasta 82,8 kbp de forma muy eficiente en *Streptomyces* (Huang et al., 2015).

Para la delección del clúster *van* se diseñó un sgRNA para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra el gen *vanK* (se encuentra en medio del clúster *van*) (Figura C3.15); y se construyeron los plásmidos pCRISPR-Cas9-sgVK, que contiene la enzima Cas9 y la secuencia codificante para el

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

sgRNA diseñado contra *vanK*, y el plásmido pCRISPR-Cas9-Van, que además de lo anterior también incluye un molde para la recombinación homóloga con las regiones adyacentes al clúster *van* (los detalles se indican en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”).

Sin embargo, cuando estos plásmidos se introdujeron, junto a pCRISPR-Cas9, en *S. coelicolor* M145 mediante conjugación interespecífica, se comprobó que el sistema no funcionaba correctamente, ya que se obtuvieron colonias en el control de corte (pCRISPR-Cas9-sgVK). Esto quiere decir que el sgRNA diseñado no está dirigiendo de forma eficiente el corte de la enzima Cas9. Se han diseñado sgRNA alternativos que dirigen el corte contra otras regiones del clúster *van* (Figura C3.15), sin embargo, debido a limitaciones de tiempo no se han podido utilizar durante la realización de la presente Tesis Doctoral.

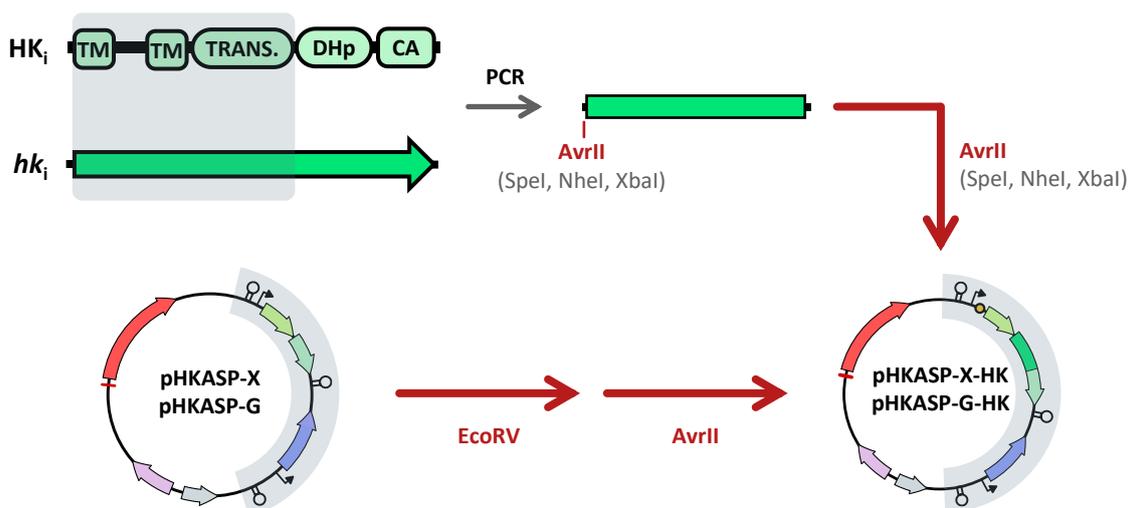


**Figura C3.15. Diseño de guías contra el clúster *van* (CRISPR-Cas9).** Secuencia diana seleccionada para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra el gen *vanK* mediante un sgRNA (guía fallida), así como secuencias diana alternativas, dirigidas contra los genes *vanR*, *vanA* y *vanX*.

### C3.7 - Aplicación de la plataforma HKASP y diseño experimental

De cara al usuario final que desee aplicar la plataforma HKASP para identificar la señal de activación de una HK de interés existen dos posibles flujos de trabajo.

La forma más sencilla de utilizar esta herramienta es partir de los plásmidos pHKASP-X y pHKASP-G, que ya han sido generados y contienen sistemas reporteros integrados. El usuario únicamente debe seleccionar la HK que desee estudiar, identificar su arquitectura proteica, y amplificar el fragmento del gen que va desde el inicio del mismo hasta el comienzo del dominio DHp. Este fragmento deberá incluir en el extremo, justo antes del codón de iniciación, el sitio de restricción *AvrII* (o el de alguno de sus isocaudómeros si *AvrII* no es posible); en el otro extremo también se puede incluir un sitio de restricción como adecuado, aunque no es necesario. Una vez obtenido este fragmento genético, se clonará en el plásmido dando lugar a pHKASP-R-HK, que será introducido *Streptomyces* para su aplicación inmediata (Figura C3.16).

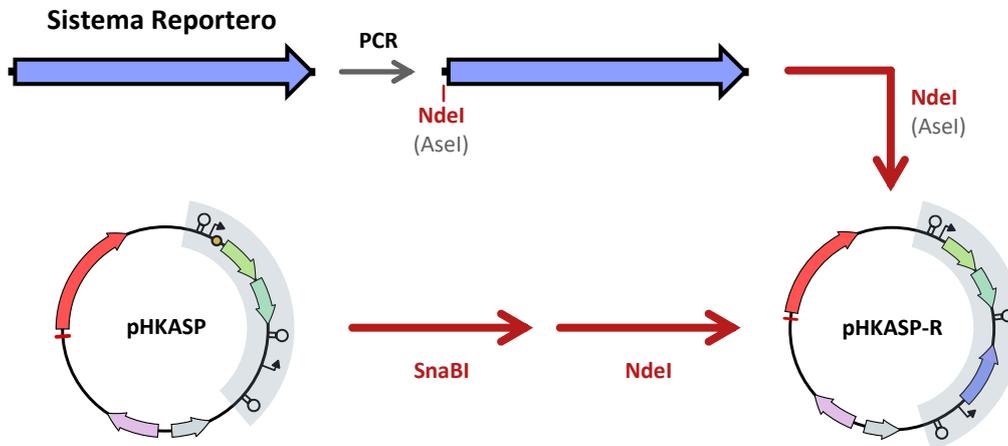


**Figura C3.16. Flujo de trabajo del usuario final en la plataforma HKASP (I).** El flujo de trabajo más sencillo consiste en partir de un plásmido pHKASP-R previamente generado que contenga un sistema reportero ya integrado (pHKASP-X y pHKASP-G). El usuario debe obtener un fragmento del gen que codifica la HK de interés, al que se añaden determinados sitios de restricción (en el borde derecho no hace falta, aunque se puede incluir un sitio de restricción como). El fragmento obtenido se clonará en el plásmido pHKASP-R para generar pHKASP-R-HK.

Si se desea utilizar un sistema reportero distinto a *XysA* y *GusA*, el flujo de trabajo alternativo consistiría en partir del plásmido base pHKASP. El usuario debe seleccionar el gen reportero que desee utilizar y amplificarlo, teniendo en cuenta que en el extremo correspondiente al inicio del gen deberá incluir el sitio de restricción *NdeI* (o *Asel* si *NdeI* no es posible; en este caso se debe incluir también el codón de iniciación); en el otro extremo también se puede incluir un sitio de

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

restricción romo, aunque no es necesario. Una vez obtenido el gen, se clonará en el plásmido dando lugar a pHKASP-R, sobre el cuál se podrá clonar el fragmento del gen de la HK que se desee estudiar, siguiendo los pasos indicados en el párrafo anterior (*Figura C3.17*).



**Figura C3.17. Flujo de trabajo del usuario final en la plataforma HKASP (II).** El flujo de trabajo alternativo consiste en construir un plásmido pHKASP-R con un sistema reportero de interés. El usuario debe obtener el gen reportero, al que se añaden determinados sitios de restricción (en el borde derecho no hace falta, aunque se puede incluir un sitio de restricción romo). Finalmente el gen obtenido se clonará en el plásmido pHKASP para generar pHKASP-R.

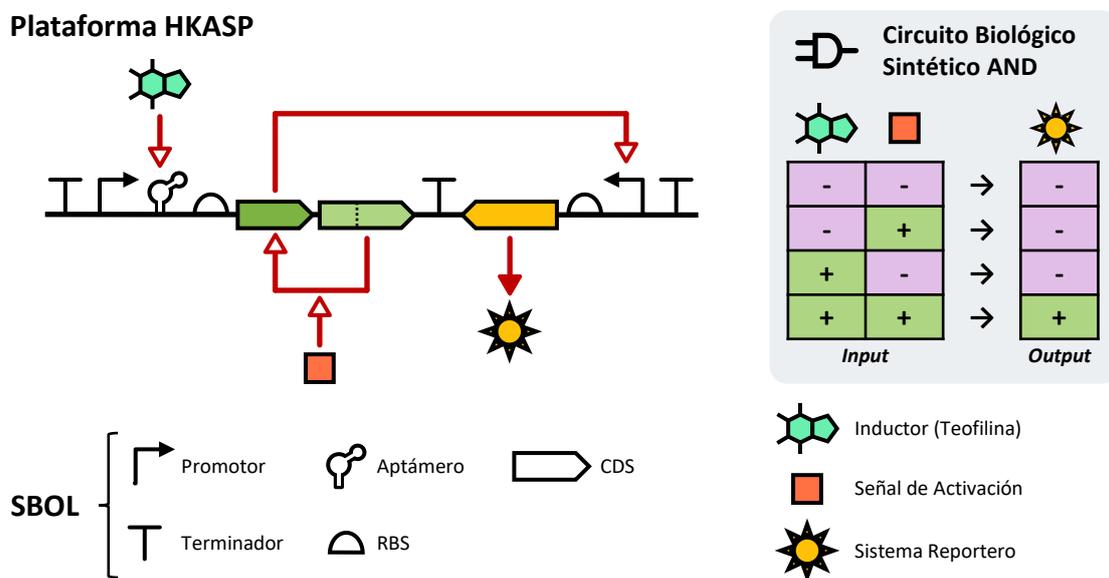
El objetivo es que el usuario final tenga que realizar el menor número de operaciones posibles para poder empezar a utilizar la plataforma HKASP y estudiar las señales de activación de una HK de interés de la forma más rápida y sencilla posible, es decir, que esta herramienta presente una elevada usabilidad.

Una vez que el plásmido final pHKASP-R-HK ha sido introducido en *Streptomyces*, se puede comenzar a utilizar la plataforma HKASP; a continuación, se propone un diseño experimental modelo para su aplicación, aunque las diferentes condiciones pueden variarse en función de las necesidades específicas de cada caso.

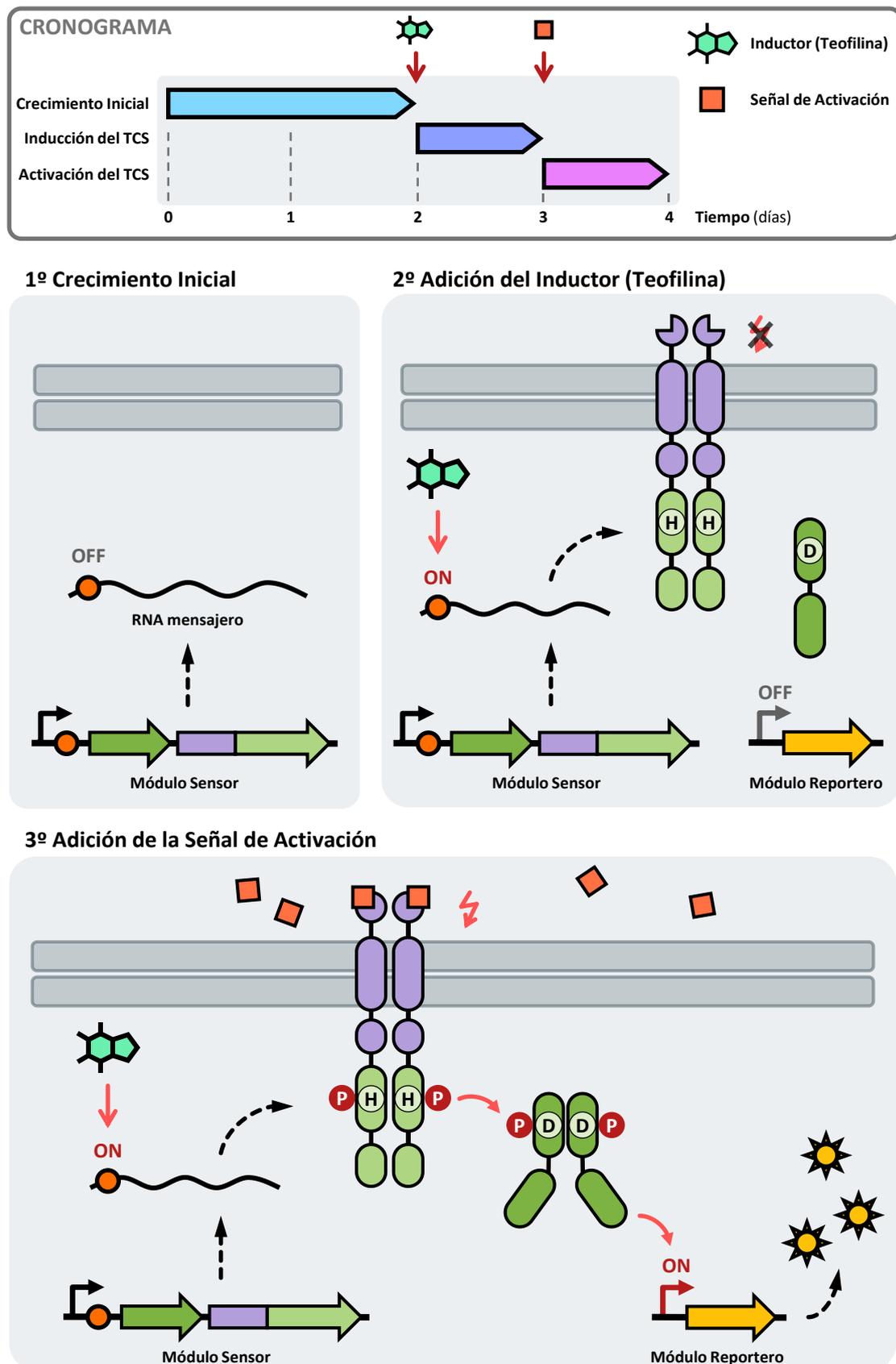
Tal y como está planteado el diseño de la plataforma HKASP existen dos puntos de control: la adición de teofilina (inductor), que permite completar la expresión de las proteínas del TCS quimérico (qHK-VanR); y la adición de la señal de activación de la HK bajo estudio, que activará la cascada de transducción del TCS quimérico y la expresión del gen reportero (*Figura C3.18*, *Figura C3.19*). Teniendo esto en cuenta, se pueden establecer tres controles negativos: sin inductor y sin señal de activación (o añadiendo análogos estructurales, como la cafeína en el caso del inductor); sin inductor, pero con señal de activación; y con inductor, pero sin señal de activación; estos controles permitirán determinar si el funcionamiento de la plataforma es

correcto, así como actuar como blanco en la monitorización del sistema reportero (Figura C3.18). En este sentido, el control de la expresión del TCS quimérico mediante el *riboswitch* de teofilina es esencial. Al no conocerse la señal de activación de la HK bajo estudio podría darse el caso de que estuviera presente en el medio de cultivo utilizado (podría tratarse de un determinado nutriente, por ejemplo); esto daría lugar a diferencias entre los controles negativos sin inductor y el control negativo con inductor, lo que permitiría redefinir las condiciones de trabajo.

El ensayo propuesto se realizaría en medio líquido (aunque se podría adaptar a medio sólido). Inicialmente se dejaría crecer a la cepa de *Streptomyces* durante 48 horas, tras lo cual se añadiría teofilina como inductor. Tras 24 horas para permitir la expresión del TCS se añadiría la potencial señal de activación de la HK de interés, y se incubaría otras 24 horas para permitir la expresión del sistema reportero si corresponde, antes de recoger los cultivos (Figura C3.19). Por tanto, este ensayo podría ser realizado en una semana.

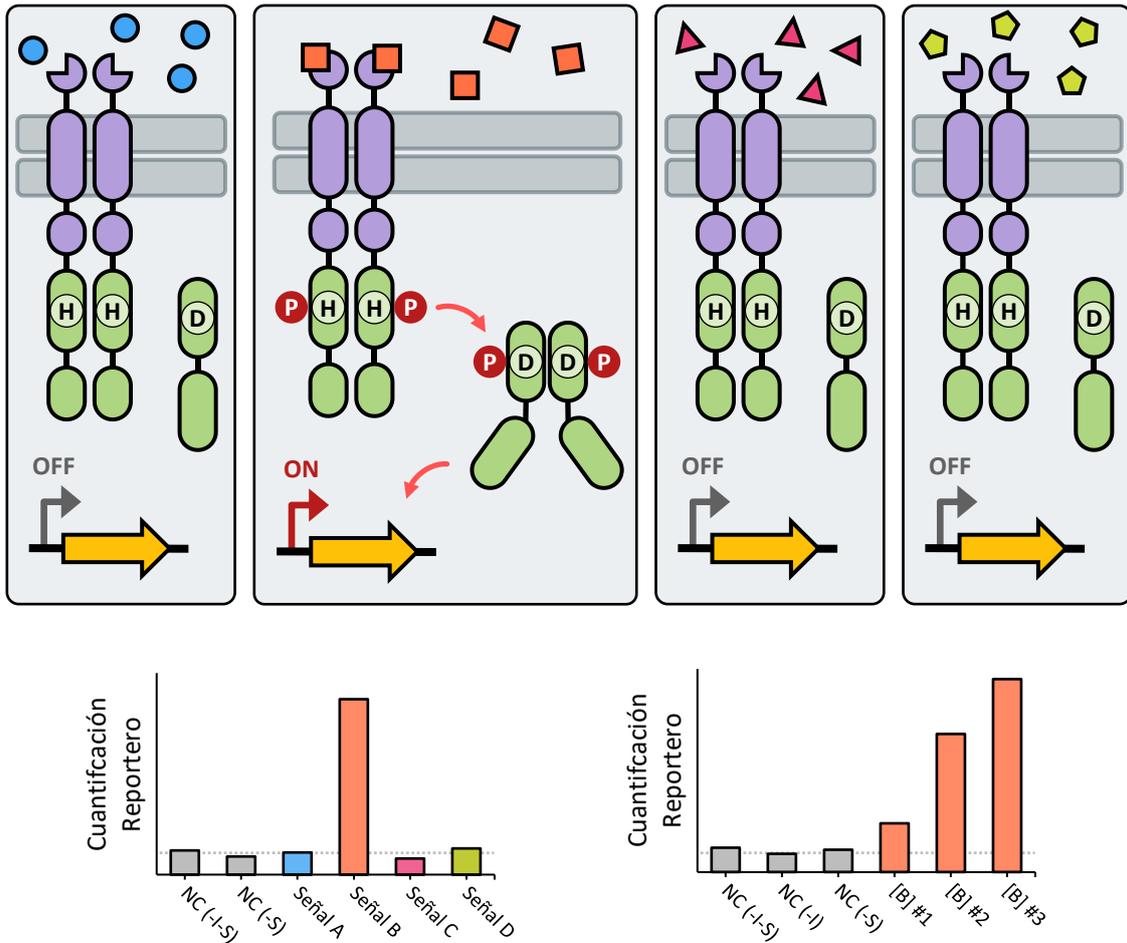


**Figura C3.18. Circuito biológico sintético de la plataforma HKASP.** Se muestra el circuito genético que constituye la base de la plataforma HKASP; el esquema se ha realizado en base a SBOL (*Synthetic Biology Open Language*). El circuito es de tipo AND: requiere de todos los *inputs* (inductor y señal de activación) para generar el *output* (sistema reportero).



**Figura C3.19. Diseño experimental de la plataforma HKASP.** Para aplicar la plataforma HKASP inicialmente se deja crecer la cepa, tras lo cual se añade teofilina como inductor. Tras la expresión del TCS quimérico se añade la potencial señal de activación de la HK bajo estudio, lo que daría lugar a la activación del sistema reportero si corresponde. Se incluye un cronograma en la parte superior.

La plataforma HKASP permite analizar múltiples condiciones para determinar la potencial señal de activación de la HK que estamos estudiando. Una vez identificada, entre otras cosas, se pueden ensayar varias concentraciones para caracterizar el proceso de activación (Figura C3.20). Además, este ensayo podría realizarse en placas multipocillo para facilitar el análisis simultáneo de múltiples y diversas condiciones, sobre todo en aquellos casos en los que no se haya podido definir una potencial señal de activación para la HK de interés.



**Figura C3.20. Aplicación de la plataforma HKASP.** La plataforma HKASP permite analizar múltiples condiciones para determinar la potencial señal de activación de la HK que estamos estudiando. Una vez identificada, entre otras cosas, se pueden ensayar varias concentraciones para caracterizar el proceso de activación.

### C3.8 - Validación de la plataforma HKASP

La validación de la plataforma HKASP se llevará a cabo con la HK GluK (SCO5779) que ya ha sido caracterizada. De hecho se ha conseguido determinar mediante Interferometría de Biocapa (BLI) que su señal de activación es la molécula de glutamato, y que no responde a compuestos estructuralmente similares como la glutamina (Li et al., 2017).

### CAPÍTULO 3: La plataforma HKASP

Se ha seguido el flujo de trabajo indicado en el apartado anterior para generar los plásmidos pHKASP-X-GluK y pHKASP-G-GluK (los detalles se indican en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”). Sin embargo, debido a los problemas encontrados durante la generación de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *vanSRJKHAX* (apartado “C3.6 - Cepa hospedadora de la plataforma HKASP”), no se ha podido realizar la validación de la plataforma HKASP durante la realización de la presente Tesis Doctoral.



# CONCLUSIONES



A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han seguido diferentes aproximaciones para estudiar TCS de *S. coelicolor* implicados en la producción de antibióticos de cara a su aplicación biotecnológica. Resulta esencial tanto terminar de esclarecer las cascadas de señalización de sistemas ya descritos, como identificar y caracterizar sistemas que no hayan sido estudiados previamente, de cara a completar el complejo entramado regulatorio que presenta este organismo. Así mismo, el desarrollo de nuevas herramientas metodológicas para el estudio de estos sistemas es fundamental para facilitar y ampliar las futuras investigaciones.

Las **conclusiones** del presente trabajo son:

### **CAPÍTULO 1. El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2**

- El Sistema de Dos Componentes AbrB1/B2, constituido por los genes *SCO2165/66* de *Streptomyces coelicolor*, se encuentra muy conservado en las bacterias del género *Streptomyces*.
- El sistema AbrB1/B2 es un regulador negativo de la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina, y no está implicado en la regulación del crecimiento ni el desarrollo morfológico. Este sistema parece actuar a través de la represión de los reguladores positivos de la producción de antibióticos EcrA1/A2 y ScbR2.
- El sistema AbrB1/B2 es un regulador positivo de la resistencia a vancomicina, lo que da lugar a alteraciones en diversos procesos metabólicos y de respuesta a estrés; además, es homólogo de VraR/S (*Staphylococcus aureus*) y LiaR/S (*Enterococcus faecium*), implicados en la respuesta a daño en la pared celular.
- La cepa de *Streptomyces coelicolor* en la que se ha delecionado AbrB1/B2 presenta ventajas sobre la cepa silvestre para la expresión de rutas heterólogas de antibióticos y antitumorales como lo demuestra el hecho de la mayor expresión de las rutas de oviedomicina y mitramicina en la cepa mutante.
- La obtención de un mutante de *Streptomyces coelicolor* en los dos Sistemas de Dos Componentes AbrA1/A2 y AbrB1/B2 demuestra que, a nivel fenotípico, la mutación AbrB1/B2 predomina sobre la de AbrA1/A2.

## CONCLUSIONES

### CAPÍTULO 2. El Regulador de Respuesta huérfano Aor1

- El Regulador de Respuesta huérfano Aor1 se produce en *Streptomyces coelicolor* principalmente al final de la fase exponencial de crecimiento (36 horas) y su sobreexpresión con distintas etiquetas en el extremo amino-terminal resulta tóxica.
- Aun disponiendo de anticuerpos específicos frente a Aor1, no se ha podido completar la identificación de las secuencias diana de Aor1 por CHIP-Seq debido a problemas en el proceso de inmunoprecipitación.

### CAPÍTULO 3. Plataforma HKASP

- Se ha completado el diseño y construcción de una plataforma para la identificación de las señales de activación de las distintas Histidina Quinasas en *Streptomyces*. Sin embargo, no se ha podido completar su validación durante la realización de este trabajo.



**MATERIALES  
Y MÉTODOS**



## MM.1 - Microorganismos empleados

Los microorganismos utilizados durante la presente tesis doctoral se detallan en la *Tabla MM.1*. Las bacterias utilizadas para la realización de los ensayos de antibiosis proceden de las colecciones de cultivos tipo ATCC (*American Type Culture Collection*) y CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Los hongos fitopatógenos utilizados para la realización de los ensayos de antibiosis fueron cedidos por el Centro Regional de Diagnóstico Aldearrubia (Junta de Castilla y León).

**Tabla MM.1.** Microorganismos empleados.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F-, $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYAargF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-. mk+), <i>supE44</i> , $\lambda$ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	(MacNeil et al., 1992)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ DE3	Ref.:69450; Sigma-Aldrich
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>aphC</i> , <i>trxB</i> , $\lambda$ DE3, <i>gor522::Tn10</i> , pRARE2	Ref.:71136; Sigma-Aldrich
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	(Hopwood et al., 1985)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 $\Delta$ <i>abrB1/B2</i>	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> $\Delta$ SCO2165/66	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 $\Delta$ <i>abrA1/A2</i>	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> $\Delta$ SCO1744/45	(Antoraz, 2018)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 $\Delta$ <i>abrA1/A2</i> $\Delta$ <i>abrB1/B2</i>	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> $\Delta$ SCO1744/45 $\Delta$ SCO2165/66	Este trabajo
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 $\Delta$ <i>aor1</i>	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> $\Delta$ SCO2281:: <i>aac3-IV</i>	(Antoraz et al., 2017)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	Cepa silvestre	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 47077	Cepa silvestre	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 4522	Cepa silvestre	CECT
<i>Micrococcus luteus</i> CECT 245	Cepa silvestre	CECT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	Cepa silvestre	ATCC
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	Cepa silvestre	ATCC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 51697	Cepa silvestre	ATCC
<i>Acinetobacter baylyi</i> ATCC 33305	Cepa silvestre	ATCC
<i>Phytophthora cactorum</i> CRD Col12	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)
<i>Phoma exigua</i> CRD Col15	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)
<i>Sclerotium cepivorum</i> CRD 99/125	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)
<i>Fusarium solani</i> CRD Col13	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CRD 345/202	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)
<i>Rhizoctonia solani</i> CRD 99/207	Cepa silvestre	CRDA (JCYL)

\*El artículo con referencia (Sánchez de la Nieta et al., 2020) fue realizado durante la presente tesis doctoral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*E. coli* DH5 $\alpha$  se ha empleado de forma rutinaria para la construcción y aislamiento de vectores. *E. coli* ET12567 se ha utilizado para la demetilación de vectores, proceso requerido para su introducción en *S. coelicolor*. *E. coli* ET12567 / pUZ8002 se ha empleado en la transferencia de plásmidos a *S. coelicolor* por conjugación interespecífica. *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) se han empleado para la expresión de proteínas.

La manipulación de microorganismos se realizó en una cabina de seguridad biológica de Clase II Tipo A *BIO-II-A/M (Telstar)*. La observación de los microorganismos a nivel microscópico se realizó en un microscopio *Axiophot (Zeiss)*. Las microfotografías fueron capturadas con una cámara acoplada al microscopio *SPOT RT Monochrome (Diagnostic Instrument)*.

### MM.1.1 - Conservación de microorganismos

Las cepas de *S. coelicolor* se conservaron en forma de suspensiones de esporas en glicerol 20% a una temperatura de -20°C. El resto de bacterias utilizadas se conservaron como suspensiones celulares en glicerol 20% a una temperatura de -80°C. Los hongos se conservaron en forma de micelio en glicerol 20% a una temperatura de -80°C.

La obtención de esporas de *S. coelicolor* se realizó siguiendo el método descrito por David A. Hopwood y colaboradores (Hopwood et al., 1985), utilizando una solución de Tween-80 0,1%.

### MM.2 - Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados a lo largo de la tesis doctoral se detallan a continuación. Todos los medios fueron esterilizados por calor húmedo mediante autoclave antes de su uso (121°C a una presión de 1 atm durante 20 min); los compuestos añadidos posteriormente se esterilizaron también por calor húmedo, o por filtración (filtros de 0,22  $\mu$ m) en el caso de compuestos termolábiles (p. ej. antibióticos). Los medios de cultivo se utilizaron en forma líquida (composición indicada más adelante), en forma sólida (añadiendo agar 2% a la composición indicada para el medio líquido correspondiente), o en forma de agar-blando (añadiendo agar 0,5% a la composición indicada para el medio líquido correspondiente).

- **2XYT**: Utilizado durante el proceso de conjugación interespecífica para el cultivo de esporas de *S. coelicolor*. Composición: Extracto de levadura 10,0 g/L; Triptona 16,0 g/L; NaCl 5,0 g/L. {pH 7,0}

- **BHI:** Utilizado en los ensayos de antibiosis para el cultivo de las bacterias *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. putida*, *E. aerogenes* y *A. baylyi*. Composición: Peptona de gelatina 10,0 g/L; Infusión de corazón de cerdo 10,0 g/L; Infusión de cerebro de cerdo 7,5 g/L; Dextrosa 2,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L. {pH 7,4}
- **LB:** Utilizado para el cultivo de *E. coli* (medio de uso rutinario) y *S. coelicolor*. Composición: Extracto de levadura 5,0 g/L; Triptona 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L. {pH 7,5}
- **NB:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*. Composición: Extracto de carne 3,0 g/L; Peptona de gelatina 5,0 g/L. {pH 6,8}
- **NMMP:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*. Composición: Casaminoácidos 5,0 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,6 g/L; Elementos traza 1,0 mL/L (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,0 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,0 g/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,0 g/L; CaCl<sub>2</sub> 1,0 g/L). Tras esterilizar mediante autoclave se añaden: Dextrosa 0,5%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,5 mM. {pH 7,2}
- **PDB:** Utilizado en los ensayos de antibiosis para el cultivo de los hongos *P. cactorum*, *P. exigua*, *S. cepivorum*, *F. solani*, *S. sclerotiorum* y *R. solani*. Composición: Almidón de patata 4,0 g/L; Dextrosa 20,0 g/L. {pH 5,6}
- **PGB:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*. Composición: Peptona 5,0 g/L. Tras esterilizar mediante autoclave se añade: Glicerol 1,0%. {pH 7,0}
- **R2YE:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*. Composición: Extracto de levadura 5,0 g/L; Casaminoácidos 0,1 g/L; Dextrosa 10,0 g/L; Sacarosa 103,0 g/L; TES 5,73 g/L; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g/L; Cl<sub>2</sub>Mg·6H<sub>2</sub>O 10,12 g/L; Elementos traza 2,0 mL/L (ZnCl<sub>2</sub> 40,0 mg/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 200,0 mg/L; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L). Tras esterilizar mediante autoclave se añaden: L-Prolina 0,3%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,005%; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,3%. {pH 7,2}
- **RSA:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*. Composición: Extracto de levadura 5,0 g/L; Casaminoácidos 0,1 g/L; Dextrosa 10,0 g/L; Sacarosa 103,0 g/L; MOPS 21,0 g/L; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g/L; Cl<sub>2</sub>Mg·6H<sub>2</sub>O 10,12 g/L; Elementos traza 2,0 mL/L (ZnCl<sub>2</sub> 40,0 mg/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 200,0 mg/L; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 10,0 mg/L). {pH 6,8}

## MATERIALES Y MÉTODOS

- **SFM:** Utilizado para la obtención de esporas de *S. coelicolor* y durante el proceso de conjugación interespecífica. Composición: Harina de soja 20,0 g/L; Manitol 20,0 g/L (se emplea agua del grifo para su preparación). {pH 6,7}
- **TSB:** Utilizado durante el proceso de aislamiento de DNA genómico de *S. coelicolor*. Composición: Peptona de caseína 17,0 g/L; Peptona de soja 3,0 g/L; Dextrosa 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g/L. {pH 7,3}
- **YEG+MgCl<sub>2</sub>:** Utilizado durante el proceso de obtención de protoplastos de *S. coelicolor*. Composición: Extracto de levadura 10,0 g/L; Dextrosa 10,0 g/L; Sacarosa 103,0 g/L; Glicina 0,5%; MgCl<sub>2</sub> 5,0 mM. {pH 6,0}
- **YEPD:** Utilizado para el cultivo de *S. coelicolor*; y en los ensayos de antibiosis para el cultivo de las bacterias *B. subtilis*, *M. luteus* y *S. epidermidis*. Composición: Extracto de levadura 10,0 g/L; Peptona 20,0 g/L; Dextrosa 10,0 g/L. {pH 6,5}

### MM.2.1 - Antibióticos empleados

Los antibióticos empleados durante la presente tesis doctoral se detallan en la [Tabla MM.2](#). De forma general los antibióticos se utilizaron como marcadores de selección, a una concentración que inhibe el crecimiento de la bacteria en cuestión en ausencia del gen de resistencia. En el caso de la penicilina G y la vancomicina, se utilizaron varias concentraciones (rango indicado en la [Tabla MM.2](#)) para evaluar el efecto del sistema de regulación AbrB1/B2 sobre la resistencia a estos antibióticos.

**Tabla MM.2. Antibióticos empleados.**

ANTIBIÓTICO	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN EMPLEADA	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Ácido nalidíxico	N4382 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	25 µg/mL	-
Ampicilina	BP1760 ( <i>Fisher Scientific</i> )	100 µg/mL	-
Apramicina	A2024 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	50 µg/mL	10 µg/mL
Cloranfenicol	190321 ( <i>MP Biomedicals</i> )	25 µg/mL *( <i>Ec-RgB</i> : 34 µg/mL)	-
Higromicina	HYG5000 ( <i>Formedium</i> )	50 µg/mL	100 µg/mL
Kanamicina	BP906 ( <i>Fisher Scientific</i> )	50 µg/mL *( <i>Ec-RgB</i> : 15 µg/mL)	-
Neomicina	N1876 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	-	50 µg/mL
Penicilina G	P3032 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	-	1 - 500 µg/mL
Tetraciclina	T7660 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	* <i>Ec-RgB</i> : 12,5 µg/mL	-
Tioestreptona	598226 ( <i>Calbiochem</i> )	-	10 µg/mL
Vancomicina	BP2958 ( <i>Fisher Scientific</i> )	-	0,1 - 500 µg/mL

\**Ec-RgB*: *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3)

### MM.3 - Condiciones de cultivo

De forma general, las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB (tanto en forma líquida como sólida) a una temperatura de 37°C durante 12 h (excepto *E. coli* Rosetta-gami B (DE3), que se cultivó durante 36 h). Los cultivos en medio sólido se incubaron en una estufa de cultivo universal *INE-800* (Memmert). Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un volumen de 10 mL en matraces de 50 mL (1/5 del volumen total del matraz) y se incubaron en un agitador orbital termostatzado *ISF-1-W* (Kühner) con una agitación de 200 rpm.

Las cepas de *S. coelicolor* se cultivaron en los medios sólidos NMMP, YEPD, NB, R2YE, R5A, LB, PGB y SFM a una temperatura de 30°C en una estufa de cultivo universal *INB-400* (Memmert). Por otro lado, los cultivos en los medios líquidos NMMP, LB, 2XYT, TSB y YEG+MgCl<sub>2</sub> se llevaron a cabo en un volumen de 10 mL en matraces indentados de 50 mL (1/5 del volumen total del matraz) y se incubaron a 28°C en agitadores orbitales termostatzados *ISF-1-W* (Kühner) y *MaxQ™ 4000* (Thermo Scientific) con una agitación de 200 rpm.

Para los análisis fenotípicos de las cepas de *S. coelicolor* realizados en medio sólido se sembraron gotas de 5 µL con una concentración de 5·10<sup>5</sup> esporas/mL. Para los análisis fenotípicos, transcripcionales y transcriptómicos de las cepas de *S. coelicolor* realizados en medio líquido se partió de un inóculo inicial de 4·10<sup>6</sup> esporas/mL. En todos los análisis fenotípicos y transcripcionales se llevaron a cabo cuatro réplicas, mientras que en los análisis transcriptómicos (RNAseq) se llevaron a cabo tres réplicas.

En los ensayos fenotípicos las fotografías se obtuvieron con una cámara *OLYMPUS E-620* (*OLYMPUS*) y se procesaron con *Adobe Photoshop Lightroom* (*Adobe*).

#### MM.3.1 - Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrB1/B2* se realizaron en medio líquido NMMP siguiendo las condiciones de cultivo generales indicadas previamente (se realizaron cuatro réplicas). Se tomaron muestras a las 5 h, 8 h, 10 h, 12 h y posteriormente cada 8 h hasta las 68 h. En cada tiempo se cuantificó la biomasa de los cultivos mediante la determinación del peso seco; para ello 10 mL de cultivo se filtraron a través de filtros previamente pesados *Glass Microfibre Filters GF/B* (*Whatman*).

La monitorización de la producción de los antibióticos RED y ACT se realizó según se describe en el apartado “MM.10 - Análisis de la producción de antibióticos”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MM.3.2 - Ensayos de antibiosis contra bacterias

En los análisis fenotípicos realizados para evaluar la producción de compuestos endógenos con actividad antibiótica, las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrB1/B2* se sembraron en césped en placas Petri con medio NMMP y se incubaron a 30°C durante 10 días. Posteriormente se extrajeron tacos de medio con micelio con un sacabocados (0,7 cm de diámetro).

Los microorganismos testigos (*S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. putida*, *E. aerogenes* y *A. baylyi*) se sembraron en 10 mL de agar-blando inoculados con 400  $\mu$ L de una suspensión con una densidad óptica de 0,2 sobre placas Petri cuadradas de 120 mm con medio BHI. Tras la siembra de los microorganismos testigos, se pusieron los tacos con micelio de *S. coelicolor*. Las placas se incubaron durante 5 h a una temperatura de 4°C para permitir la difusión de los compuestos producidos por *S. coelicolor*. Posteriormente las placas se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48 h para el crecimiento de los microorganismos testigos. Para estos ensayos se llevaron a cabo cuatro réplicas. Las fotografías del ensayo de antibiosis se obtuvieron con una cámara OLYMPUS E-620 (OLYMPUS) y se procesaron con Adobe Photoshop Lightroom (Adobe). El análisis de las imágenes se realizó en ImageJ (Schneider et al., 2012).

### MM.3.3 - Ensayos de antibiosis contra hongos

En los análisis fenotípicos realizados para evaluar la producción de compuestos endógenos con actividad antifúngica, las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrB1/B2* se sembraron en césped en placas Petri con medio NMMP y se incubaron a 30°C durante 10 días. Posteriormente se extrajeron tacos de medio con un sacabocados (0,7 cm de diámetro). Los microorganismos testigos (*P. cactorum*, *P. exigua*, *S. cepivorum*, *F. solani*, *S. sclerotiorum* y *R. solani*) se sembraron en césped en placas Petri con medio PDA y se incubaron a 25°C durante 10 días. Posteriormente se extrajeron tacos de medio con micelio con un sacabocados (0,7 cm de diámetro).

En placas Petri con medio PDA se dispusieron los tacos de los hongos usados como microorganismos testigos y los tacos de las cepas de *S. coelicolor* a una distancia de 3,5 cm, y se incubaron a 25°C durante 10 días. Para estos ensayos se llevaron a cabo cuatro réplicas. Las fotografías del ensayo de antibiosis se obtuvieron con una cámara OLYMPUS E-620 (OLYMPUS) y se procesaron con Adobe Photoshop Lightroom (Adobe).

### MM.3.4 - Ensayos de antibiosis (producción heteróloga)

En los ensayos de antibiosis realizados para evaluar la producción heteróloga de compuestos con actividad antibiótica (oviedomicina y mitramicina), las cepas de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  transformadas con los vectores pKC505 (control), CosAB4 (producción de oviedomicina), pCLY10 (control) y pMTMF (producción mitramicina) se cultivaron en 10 mL de medio líquido NMMP (en matraces indentados) y se incubaron a 28°C durante 4 días con una agitación de 200 rpm. Tras la incubación, se realizó una extracción de compuestos de las muestras (micelio y sobrenadante) mediante tratamiento con acetato de etilo acidificado (ácido fórmico 1,0%); la fase orgánica se recogió y desecó, y los compuestos extraídos se resuspendieron en DMSO.

Los microorganismos testigos (*B. subtilis*, *M. luteus* y *S. epidermidis*) se sembraron en 10 mL de agar-blando inoculados con 400  $\mu$ L de una suspensión con una densidad óptica de 0,2 sobre placas Petri cuadradas de 120 mm con medio YEPD. Tras la siembra de los microorganismos testigos se realizaron pocillos en las placas con un sacabocados (0,7 cm de diámetro), en los que se inocularon los extractos en DMSO obtenidos. Las placas se incubaron durante 5 h a una temperatura de 4°C para permitir la difusión de los compuestos presentes en los extractos. Posteriormente las placas se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48 h para el crecimiento de los microorganismos testigos. Para estos ensayos se llevaron a cabo tres réplicas. Las fotografías del ensayo de antibiosis se obtuvieron con una cámara *OLYMPUS E-620* (*OLYMPUS*) y se procesaron con *Adobe Photoshop Lightroom* (*Adobe*). El análisis de las imágenes se realizó en *ImageJ* (Schneider et al., 2012).

### MM.3.5 - Ensayos de resistencia a antibióticos

Los ensayos de resistencia a vancomicina y penicilina G en los que se evaluó la ratio de supervivencia de esporas de cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  se realizaron en placas Petri con medio NMMP. Se sembraron  $2 \cdot 10^5$  esporas (y diluciones decimales seriadas) de las distintas cepas en placas con concentraciones crecientes de vancomicina o penicilina G (1, 10, 50, 100 y 500  $\mu$ g/mL). Las placas se incubaron a 30°C en una estufa de cultivo universal *INB-400* (*Memmert*) durante 4 días. Para estos ensayos se llevaron a cabo cuatro réplicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de resistencia a vancomicina en medio líquido se realizaron en placas multipocillo *Falcon*® 24-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Ref.: 353047; Corning). En cada pocillo se cultivaron 1,5 mL de medio NMMP inoculados con  $4 \cdot 10^6$  esporas/mL de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$ ; y se añadieron concentraciones crecientes de vancomicina (1-500  $\mu\text{g/mL}$ ). Las placas se incubaron a 28°C en un agitador orbital termostatzado *MaxQ*™ 4000 (*Thermo Scientific*) con una agitación de 200 rpm durante 7 días.

Las fotografías del ensayo de resistencia se obtuvieron con una cámara *OLYMPUS E-620* (*OLYMPUS*) y se procesaron con *Adobe Photoshop Lightroom* (*Adobe*).

### MM.4 - Manipulación y detección de ácidos nucleicos

#### MM.4.1 - Extracción de vectores en *Escherichia coli*

La extracción de plásmidos (*minipreps*) presentes en *E. coli* se realizó mediante el kit *NucleoSpin*® *Plasmid* (Ref.: 740588; *Macherey-Nagel*) siguiendo el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante.

La extracción de cósmidos se llevó a cabo siguiendo el método de extracción alcalina modificado descrito por H.C. Birnboim (Birnboim & Doly, 1979). Se cultivó *E. coli* con el cósmido de interés a 37°C durante 12 h. Tras la incubación se recogieron las células y se trataron con la Solución P1 (Tris-HCl 50,0 mM; EDTA 10,0 mM; RNasa 40,0 mg/L) y la Solución P2 (NaOH 0,2 M; SDS 1,0%). Se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 5 min, tras lo que se añadió la Solución P3 (Acetato de potasio 2,55 M; pH 4,8) y se llevó a cabo un paso de fenolización, en el que se trató con una mezcla Fenol : Cloroformo : Alcohol Isoamílico (25:24:1) equilibrado con Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0), y se recuperó la fase acuosa. Las muestras se trataron con isopropanol para precipitar el DNA. Finalmente, el pellet obtenido se lavó con etanol 70,0% y se resuspendió en solución TE (Tris-HCl 10,0 mM; EDTA 1,0 mM; pH 8,0).

La concentración y calidad de los vectores aislados se determinó en un espectrofotómetro *NanoPhotometer*® N60 (*IMPLEN*).

#### MM.4.2 - Extracción de DNA genómico en *Streptomyces coelicolor*

La extracción de DNA genómico procedente de cepas de *S. coelicolor* se realizó mediante un método de lisis neutra modificado del descrito por David A. Hopwood y colaboradores (Hopwood et al., 1985).

La cepa de interés se cultivó en medio líquido TSB durante 36 h. Posteriormente el micelio se recogió, se lavó con una solución de sacarosa 10,3% y se resuspendió en Solución de Lisis (Tris-HCl 25,0 mM; Sacarosa 0,3 M; EDTA 25,0 mM; Lisozima 2,0 g/L; RNasa 50,0 mg/L; pH 8,0). Tras una incubación a 37°C durante 30 min, se añadió SDS 2,0%. Posteriormente se añadió una mezcla Fenol : Cloroformo : Alcohol Isoamílico (25:24:1) equilibrado con Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0), y se recuperó la fase acuosa. Este paso se repitió en tubos *Phase Lock Gel Heavy* (Ref.: 2302810; *5 Prime*). A la fase acuosa recuperada se añadió acetato de sodio 3,0 M (pH 4,8) e isopropanol para precipitar el DNA genómico. Tras la eliminación del sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol 70,0%. Tras eliminar todo el etanol, el precipitado se resuspendió en solución TE (Tris-HCl 10,0 mM; EDTA 1,0 mM; pH 8,0).

La concentración y calidad del DNA genómico aislado se determinó en un espectrofotómetro *NanoPhotometer® N60* (IMPLEN).

### MM.4.3 - Extracción de RNA en *Streptomyces coelicolor*

La cepa de *S. coelicolor* de interés se cultivó en las condiciones establecidas. Una vez completado el cultivo, se recogió el micelio y se trató con *RNAprotect® Bacteria Reagent* (Ref.: 1018380; *QIAGEN*). Para la extracción del RNA se utilizó el kit *RNeasy® Mini Kit* (Ref.: 74104; *QIAGEN*) junto al *RNase-Free DNase Set* (Ref.: 79254; *Qiagen*). El RNA extraído se trató con *RNase-free DNase I* (Ref.: EN0521; *Thermo Scientific*) para eliminar cualquier resto de DNA que pudiera quedar. Para todo el proceso se siguió el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante.

Para prevenir la contaminación por RNasas que afecten a la integridad del RNA extraído, el material utilizado se limpió con Solución de Eliminación de Nucleasas (NaClO 0,75%; NaOH 1,0%; SDS 0,95%; NaHCO<sub>3</sub> 90,0 mM).

La concentración y calidad del RNA extraído se determinó en un sistema *2100 Bioanalyzer* (*Agilent*) por el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación del Cáncer (Universidad de Salamanca / Consejo Superior de Investigaciones Científicas). La ausencia de DNA se chequeó por PCR, mediante amplificación del gen *rpsL* (*SCO4659*) con los cebadores RCD-009 y RCD-011 (“Anexo II - Oligonucleótidos empleados”).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MM.4.4 - Electroforesis en gel de agarosa

La separación de moléculas de DNA según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%, o a una concentración de 1,2% en el caso de fragmentos de DNA de pequeño tamaño. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 120 V en la solución tampón TAE (Tris-Acetato 40,0 mM; EDTA 2,0 mM). Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó como marcador fluorescente bromuro de etidio (0,5 mg/L en el gel de agarosa). Las bandas se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV acoplado al sistema fotográfico digital *GelDoc 2000* (Bio-Rad). Para la visualización y procesamiento de las imágenes obtenidas de los geles se utilizó el programa *Quantity One* (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular para ácidos nucleicos se utilizó *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Ref.: SM0333; *Thermo Scientific*).

### MM.4.5 - Técnicas básicas de ingeniería genética

Durante la construcción de plásmidos realizada en la presente tesis doctoral (“**MM.6 - Diseño y construcción de vectores**”) se llevaron a cabo digestiones con enzimas de restricción, ligaciones y desfosforilaciones. Las enzimas de restricción utilizadas se indican en la *Tabla MM.3*. La ligación de vectores e insertos, así como de fragmentos de DNA, se realizaron con la enzima *T4 DNA Ligase* (Ref.: EL0011; *Thermo Scientific*). Los vectores linealizados con extremos romos durante los procesos de clonación fueron tratados con la fosfatasa *FastAP<sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Ref.: EF0654; *Thermo Scientific*) para desfosforilar los extremos y prevenir los eventos de religación. En todos los casos se siguió el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante.

La purificación de los fragmentos de DNA tanto en solución como en geles de agarosa se realizó mediante el kit comercial *NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-Up* (Ref.: 740609; *Macherey-Nagel*).

La concentración y calidad de los ácidos nucleicos en los diferentes procesos se determinó en un espectrofotómetro *NanoPhotometer<sup>®</sup> N60* (IMPLEN).

**Tabla MM.3.** Enzimas de restricción empleadas.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	SITIO DE RESTRICCIÓN	REFERENCIA
AvrII	C↓CTAG↑G	R0174 ( <i>New England BioLabs</i> )
BamHI	G↓GATC↑C	ER0051 ( <i>Thermo Scientific</i> )
BglII	A↓GATC↑T	ER0081 ( <i>Thermo Scientific</i> )
DraI	TTT↓↑AAA	R0129 ( <i>New England BioLabs</i> )
EcoRI	G↓AATT↑C	ER0271 ( <i>Thermo Scientific</i> )
EcoRV	GAT↓↑ATC	R3195 ( <i>New England BioLabs</i> )
HindIII	A↓AGCT↑T	ER0501 ( <i>Thermo Scientific</i> )

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	SITIO DE RESTRICCIÓN	REFERENCIA
NdeI	CA↓TA↑TG	ER0581 ( <i>Thermo Scientific</i> )
NheI	G↓CTAG↑C	R3131 ( <i>New England BioLabs</i> )
NcoI	C↓CATG↑G	ER0571 ( <i>Thermo Scientific</i> )
SnaBI	TAC↓↑GTA	R1030 ( <i>New England BioLabs</i> )
SpeI	A↓CTAG↑T	R0133 ( <i>New England BioLabs</i> )
XbaI	T↓CTAG↑A	R0145 ( <i>New England BioLabs</i> )

#### MM.4.6 - PCR convencional

Los cebadores empleados en las PCRs convencionales se diseñaron mediante el programa *SnapGene* (*Insightful Science*) y la herramienta *OligoAnalyzer* (*Integrated DNA Technologies*); y fueron sintetizados por *Invitrogen* (*Thermo Fisher Scientific*). El listado de cebadores se incluye en el apartado “Anexo II - Oligonucleótidos empleados”.

Las PCRs realizadas en procesos de chequeo (p.ej. en la comprobación de la delección de genes durante la edición genómica con el sistema CRISPR-Cas9) se realizaron con el kit *Biotoools DNA Polymerase* (Ref.: 10002-4100; *Biotoools B&M Labs*) siguiendo el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante. Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycler* (*Bio-Rad*); el programa empleado se detalla en [Tabla MM.4](#).

**Tabla MM.4.** Programa empleado en el termociclador para el kit *Biotoools DNA Polymerase*.

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	x1	94°C	Si el molde es un plásmido: 3 min Si el molde es DNA genómico: 10 min
Desnaturalización	x35	94°C	1 min
Anillamiento de cebadores		T <sub>m</sub> - 5°C	1 min
Extensión		72°C	1 min / kbp
Extensión final	x1	72°C	10 min
Enfriamiento	x1	4°C	∞

\*Nota: T<sub>m</sub> hace referencia a la temperatura de fusión de los cebadores.

Las PCRs de alta fidelidad realizadas para amplificar fragmentos utilizados en la construcción de plásmidos se realizaron con el kit *Phusion Hot Start II DNA Polymerase* (Ref.: F549; *Thermo Scientific*), siguiendo el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante. Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycler* (*Bio-Rad*); el programa empleado se detalla en [Tabla MM.5](#).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla MM.5.** Programa empleado en el termociclador para el kit *Phusion Hot Start II DNA Polymerase*.

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	x1	98°C	Si el molde es un plásmido: 30 s Si el molde es DNA genómico: 3 min
Desnaturalización	x35	98°C	10 s
Anillamiento de cebadores		T <sub>m</sub>	30 s
Extensión		72°C	30 s / kbp
Extensión final	x1	72°C	5 min
Enfriamiento	x1	4°C	∞

\*Nota: T<sub>m</sub> hace referencia a la temperatura de fusión de los cebadores.

### MM.4.7 - RT-qPCR (PCR cuantitativa de transcripción reversa)

Los cebadores empleados en las RT-qPCRs se diseñaron mediante la herramienta *PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies)*; y fueron sintetizados por *Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)*. El listado de cebadores se incluye en el apartado “Anexo II - Oligonucleótidos empleados”.

El RNA de las muestras fue extraído tal y como se indica en el apartado “MM.4.3 - Extracción de RNA en *Streptomyces coelicolor*”. A partir de este RNA se sintetizó cDNA utilizando el kit *iScript Reverse Transcription Supermix (Ref.:170-8841; Bio-Rad)*. La PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR) se realizó mediante el kit *TB Green® Premix Ex Taq™ (Ref.: RR420A; Takara)* en un termociclador *CFX96 Touch Real Time PCR Detection System (Bio-Rad)* siguiendo el programa detallado en *Tabla MM.6*. Se siguieron los protocolos y condiciones recomendadas por el fabricante en todos los pasos indicados. Se realizaron triplicados técnicos, así como un control sin cDNA (NTC) para comprobar la ausencia de contaminación ambiental. Como gen control se utilizó *rpsL (SCO4659)*. Para la cuantificación absoluta de la expresión de los genes de interés se utilizó como estándar de referencia diluciones seriadas de DNA genómico de *S. coelicolor* (número de copias conocido). El procesamiento y análisis de datos se realizó en el programa *CFX Manager™ (Bio-Rad)*.

**Tabla MM.6.** Programa empleado en el termociclador para las RT-qPCRs.

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	x1	95°C	30 s
Desnaturalización	x40	95°C	5 s
Anillamiento y extensión		60°C	30 s
Lectura		Lectura de fluorescencia	
Curva de fusión	x1	Rampa de temperatura: De 65°C a 95°C (aumento de 0,5°C cada 5 s) *Lectura de fluorescencia tras cada aumento de temperatura	

#### MM.4.8 - Análisis transcriptómico por RNAseq

La secuenciación de los transcriptomas (RNAseq) de las diferentes muestras analizadas fue realizada por la empresa *Macrogen*. El RNA de las muestras fue extraído tal y como se indica en el apartado “MM.4.3 - Extracción de RNA en *Streptomyces coelicolor*”. El rRNA de las muestras fue eliminado mediante *Ribo-Zero rRNA Removal Kit Bacteria (Illumina)*, y se obtuvo una librería de cada muestra mediante *TruSeq Stranded Total RNA (Illumina)*. Las moléculas de las librerías generada se secuenciaron por ambos extremos (*paired-end reads*) con una longitud de 150 bases en un equipo *NovaSeq6000 (Illumina)*. Los datos de secuenciación obtenidos se convirtieron a formato FASTQ mediante el paquete *bcl2fastq*, y se depositaron en la base de datos NCBI SRA (*BioProject\_ID*: PRJNA637401<sup>5</sup>; *BioSample\_Accesions*: SAMN15105054, SAMN15105055, SAMN15105056, SAMN15105057).

El procesamiento de los datos se realizó en colaboración con el Dr. Juan F. Alzate (Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Universidad de Antioquía, Colombia). Se utilizó el software *RaNA-Seq* (Prieto & Barrios, 2020) para el preprocesamiento por *fastp 0.19.4* (Chen et al., 2018) y la cuantificación por *salmon 0.9.1* (Patro et al., 2017). Se obtuvieron entre 36 y 52 millones de lecturas totales de cada librería durante el proceso de secuenciación, de las cuales aproximadamente el 99% pasaron los filtros de calidad (secuencias muy cortas, con demasiadas Ns, etc.). Tras este filtrado, los valores de calidad de Q30 se encontraron en torno al 96%. Entre el 89% y el 94% de las secuencias filtradas fueron mapeadas correctamente en el genoma de referencia (*Streptomyces coelicolor* A3(2); GenBank NC\_003888). El análisis de la expresión diferencial génica se realizó con *DEseq2* (se aplicó un test de Wald y un ajuste paramétrico).

Los alineamientos de las lecturas obtenidas con el genoma de referencia se visualizaron con *Integrative Genomics Viewer* (Robinson et al., 2011).

#### MM.4.9 - Identificación de secuencias diana por ChIP-Seq

Para la identificación de secuencias diana del regulador huérfano Aor1 se utilizó el método de ChIP-SICAP-Seq modificado del descrito por Mahmoud-Reza Rafiee y colaboradores (Rafiee et al., 2016). Este método también permite identificar las proteínas que interactúan con el regulador de interés cuando se encuentra unido a sus secuencias diana.

---

<sup>5</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA637401>

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las muestras y *cross-linking*

*S. coelicolor* M145 se cultivó en medio líquido LB a 28°C durante 36 h en agitación a 200 rpm. El cultivo se realizó en matraces indentados con un inóculo inicial de 10<sup>6</sup> esporas/mL por triplicado. Tras la incubación, los cultivos se trataron con formaldehído 1,0% y se incubaron a 30°C durante 20 min con agitación a 200 rpm (proceso de *cross-linking*). La reacción se paró mediante la adición de glicina 0,5 M e incubación a 25°C durante 5 min con agitación a 200 rpm. El micelio de las muestras se recogió y se lavó con PBS (NaCl 8,0 g/L; KCl 2,0 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g/L; pH 7,4).

### Rotura celular

El micelio recogido de las muestras se congeló a -80°C y posteriormente se llevó a cabo el proceso de rotura celular en un molino criogénico 6770 Freezer/Mill® (*Spex SamplePrep*). Se llevaron a cabo 4 ciclos de rotura de 1 min con una intensidad de 15 CPS (30 impactos por segundo); entre ciclos se dejó un reposo de 1 min. El lisado celular se resuspendió en Buffer de Lisis (HEPES-KOH 50,0 mM; Deoxicolato sódico 0,1%; SDS 0,1%, Triton X-100 1,0%; EDTA 1,0 mM; NaCl 150,0 mM; *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* Ref.:11873580001 Roche; pH 7,5) y se incubó a 37°C durante 30 min.

### Fragmentación DNA

Para la fragmentación del DNA por ultrasonidos, el lisado celular obtenido fue procesado en un equipo *Bioruptor® UCD-300 Plus (Diagenode)*. Para obtener una fragmentación con un rango de tamaños de 100-600 bp se aplicaron 15 pulsos de 30 s con intensidad alta (30 s de reposo entre pulsos); durante el proceso se mantuvo una temperatura de 4°C. La fragmentación del DNA se chequeó por electroforesis en gel de agarosa 1,2%.

### Inmunoprecipitación

Parte del volumen de las muestras se separó para su utilización como controles *Mock* (control sin paso de incubación con anticuerpos durante la etapa de inmunoprecipitación) e *Input* (control sin etapa de inmunoprecipitación). A las muestras se les añadió 20 µg de anticuerpos α-Aor1, y se incubaron a 4°C durante 12 horas y agitación a 800 rpm. Tras la incubación con anticuerpos, a las muestras (y a los controles *Mock*) se les añadió Buffer IP (HEPES-KOH 50,0 mM; Deoxicolato sódico 0,1%; SDS 0,1%, Triton X-100 1,0%; EDTA 1,0 mM; NaCl 150,0 mM; Lisozima 4,0 g/L; RNasa 50,0 mg/L; *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*

Ref.:11873580001 Roche; pH 7,5) y *Dynabeads® Protein A* (Ref.: 100001D; *Invitrogen*), y se incubaron a 4°C durante 4 h y agitación a 20 rpm. Tras la incubación, los posteriores lavados con Buffer IP (6 veces) se realizaron en un soporte magnético *DynaMag™-2 Magnet* (*Invitrogen*). Tras los lavados, las esferas se resuspendieron en Buffer de Elución (SDS 1,5%; DTT 0,2 M) y se incubaron a 37°C durante 15 min en agitación a 750 rpm, tras lo que se recogieron los sobrenadantes (los controles *Input* también se pasaron a Buffer de Elución).

### ***De-cross-linking* y digestión proteica**

Las muestras (y todos los controles) se trataron con Ácido Indolacético 20,0 mM y Ditiotreitolo 9,0 mM; y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Posteriormente se añadió la endoproteinasa LysC (Ref.: P8109; *New England BioLabs*) a una concentración final de 1,2 ng/μL, y las muestras se incubaron a 37°C durante 12 h.

### **Purificación ácidos nucleicos**

Finalmente, el DNA de las muestras y controles se purificó mediante *AMPure XP Magnetic Beads* (Ref.:NC9959336; *Beckman Coulter*) siguiendo el protocolo y recomendaciones del fabricante. La concentración y calidad del DNA obtenido se determinó en un equipo *2100 Bioanalyzer* (*Agilent*) por el Servicio de Secuenciación, Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca.

Aunque la metodología de ChIP-Seq para la identificación de las secuencias dianas de Aor1 no termina aquí, no se pudo continuar ya que no se consiguió inmunoprecipitar DNA para llevar a cabo el proceso. Los controles y chequeos realizados se detallan en el apartado “[C2.4 - Identificación de las secuencias diana de Aor1 por ChIP-Seq](#)”.

## **MM.5 - Vectores empleados**

Los vectores utilizados a lo largo del presente trabajo se detallan en la [Tabla MM.8](#). El diseño y construcción de los plásmidos generados durante la tesis doctoral se detalla en el apartado “[MM.6 - Diseño y construcción de vectores](#)”.

Los vectores pKC505 y CosAB4 fueron cedidos por los Dres. José Antonio Salas y Carmen Méndez (Universidad de Oviedo). Los vectores pCLY10 y pMTMF fueron cedidos por el Dr. Jesús Cortés (*EntreChem*). El plásmido pNG3 fue cedido por el Dr. Ángel Manteca (Universidad de Oviedo). El plásmido pCRISPR-Theo fue cedido por el Dr. Jesús Aparicio (Universidad de León).

Tabla MM.8. Vectores empleados.

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pUZ8002	Vector para transferencias por conjugación (operón <i>tra</i> ). <i>Resistencias</i> : Kanamicina ( <i>aph3'-Ia</i> )	(Paget, Chamberlin, et al., 1999)
pCRISPR-Cas9	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Incluye el gen <i>cas9</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> bajo el promotor <i>tipAp</i> , y el casete sgRNA bajo el promotor <i>ermEp</i> . Termosensible. <i>Resistencias</i> : Apramicina ( <i>aac3-IV</i> ), Tioestreptona ( <i>trs</i> )	(Tong et al., 2015)
pCRISPR-Cas9-sgB	Derivado de pCRISPR-Cas9. Contiene un sgRNA dirigido contra el sistema <i>abrB1/B2</i> de <i>S. coelicolor</i> .	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
pCRISPR-Cas9-AbrB	Derivado de pCRISPR-Cas9-sgB. Contiene el molde para la recombinación homóloga con las secuencias adyacentes a los genes <i>abrB1/B2</i> de <i>S. coelicolor</i> .	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
pXHis1	Vector de <i>E. coli</i> . Incluye el gen <i>xysA</i> de <i>Streptomyces halstedii</i> (marcado con 6xHis en Ct) bajo su propio promotor. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> )	(Adham et al., 2001)
pXAbrB	Derivado de pXHis1. Incluye el operón <i>abrB1/B2</i> de <i>S. coelicolor</i> bajo su propio promotor.	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
pKC796A	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Integrativo, contiene la integrasa del fago $\phi$ C31. <i>Resistencias</i> : Apramicina ( <i>aac3-IV</i> )	(Kuhstoss et al., 1991)
pKCAbrB	Derivado de pKC796A. Incluye el operón <i>abrB1/B2</i> de <i>S. coelicolor</i> bajo su propio promotor.	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
pN702GEM3	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Alto número de copias. <i>Resistencias</i> : Kanamicina ( <i>aph3'-II</i> ), Neomicina ( <i>aph3'-II</i> )	(Fernández-Abalos et al., 2003)
pNBABrB	Derivado de pN702GEM3. Incluye el operón <i>abrB1/B2</i> de <i>S. coelicolor</i> bajo su propio promotor.	(Sánchez de la Nieta et al., 2020)*
pKC505	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Bajo número de copias. <i>Resistencias</i> : Apramicina ( <i>aac3-IV</i> )	(Richardson et al., 1987)
CosAB4	Derivado de pKC505. Contiene el clúster <i>ovm</i> (ruta de biosíntesis de la ovidomicina) de <i>Streptomyces antibioticus</i> .	(Méndez et al., 2002)
pCLY10	Vector trifuncional <i>Saccharomyces – Escherichia – Streptomyces</i> . Integrativo, contiene la integrasa del fago VWB. <i>Resistencias</i> : Apramicina ( <i>aac3-IV</i> )	(Bilyk et al., 2016)
pMTMF	Derivado de pCLY10. Contiene el clúster <i>mtm</i> (ruta de biosíntesis de la mitramicina) de <i>Streptomyces argillaceus</i> .	(Novakova et al., 2018)
pET22b[+]	Vector de <i>E. coli</i> . Contiene el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> , la secuencia señal <i>pelB</i> y una secuencia 6xHis. Bajo número de copias. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> )	Ref.: 69744; Novagen
pET-Aor1	Derivado de pET22b[+]. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 6xHis en Ct) bajo el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> . Se ha eliminado la secuencia señal <i>pelB</i> presente en pET22b[+].	(Yepes, 2010)
pQE-30	Vector de <i>E. coli</i> . Contiene el promotor T5 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> , y una secuencia 6xHis. Bajo número de copias. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> ), Cloranfenicol ( <i>cat</i> )	Ref.: 32915; QIAGEN

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pQE-Aor1	Derivado de pQE-30. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 6xHis en Nt) bajo el promotor T5 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> .	Este trabajo
pNX-Aor1	Derivado de pN702GEM3. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> bajo el promotor <i>xysAp</i> .	(Antoraz et al., 2017)
pNErmX	Derivado de pN702GEM3. Incluye el gen <i>xysA</i> de <i>Streptomyces halstedii</i> bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	(Sevillano et al., 2016)
pBluescript II SK(+)	Vector de <i>E. coli</i> . Alto número de copias. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> )	Ref.: 212207; <i>Stratagene</i>
pBS-STAor1-C2	Derivado de pBluescript II SK(+). Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Ct).	Este trabajo
pBS-STAor1-CE	Derivado de pBS-STAor1-C2. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Ct) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pBS-STAor1-N2	Derivado de pBluescript II SK(+). Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Nt).	Este trabajo
pBS-STAor1-NE	Derivado de pBS-STAor1-N2. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Nt) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pKC796H	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Integrativo, contiene la integrasa del fago $\phi$ C31. <i>Resistencias</i> : Higromicina ( <i>hyg</i> )	(Fernández-Abalos et al., 2003)
pKC-STAor1-CE	Derivado de pKC796H. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Ct) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pKC-STAor1-NE	Derivado de pKC796H. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Nt) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pNG3	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Integrativo, contiene la integrasa del fago $\phi$ BT1. Incluye el gen <i>SCO4849</i> bajo su propio promotor. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> ), Higromicina ( <i>hyg</i> )	(González-Quíñonez et al., 2016)
pNG-STAor1-CE	Derivado de pNG3. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Ct) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pNG-STAor1-NE	Derivado de pNG3. Incluye el gen <i>aor1</i> de <i>S. coelicolor</i> (marcado con 3xFLAG en Nt) bajo el promotor <i>ermE*</i> p.	Este trabajo
pIJ2587	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Incluye el gen <i>redD</i> de <i>S. coelicolor</i> sin promotor. <i>Resistencias</i> : Ampicilina ( <i>bla</i> ), Tioestreptona ( <i>tsr</i> )	(van Wezel et al., 2000)
pCRISPR-Theo	Derivado de pCRISPR-Cas9. Contiene el promotor <i>ermEp1</i> y el <i>riboswitch</i> TheoE*.	No publicado
pSETGUS	Vector bifuncional <i>Escherichia – Streptomyces</i> . Integrativo, contiene la integrasa del fago $\phi$ C31. Incluye el gen <i>gusA</i> de <i>E. coli</i> (optimizado para <i>S. coelicolor</i> ) bajo el promotor <i>tipAp</i> . <i>Resistencias</i> : Apramicina ( <i>aac3-IV</i> )	(Myronovskiy et al., 2011)
pHKASP	Derivado de pKC796A. Contiene el Casete HKASP.	Este trabajo
pHKASP-X	Derivado de pHKASP. Incluye el gen <i>xysA</i> de <i>Streptomyces halstedii</i> (marcado con 6xHis en Ct) bajo el promotor <i>vanH*</i> p.	Este trabajo
pHKASP-G	Derivado de pHKASP. Incluye el gen <i>gusA</i> de <i>E. coli</i> (optimizado para <i>S. coelicolor</i> ) bajo el promotor <i>vanH*</i> p.	Este trabajo
pHKASP-X-GluK	Derivado de pHKASP-X. Incluye el gen quimérico <i>gluK-vanS</i> (secuencias de <i>S. coelicolor</i> ) bajo el promotor <i>ermEp1</i> y el <i>riboswitch</i> TheoE*.	Este trabajo

## MATERIALES Y MÉTODOS

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pHKASP-G-GluK	Derivado de pHKASP-G. Incluye el gen quimérico <i>gluK-vanS</i> (secuencias de <i>S. coelicolor</i> ) bajo el promotor <i>ermEp1</i> y el <i>riboswitch</i> TheoE*.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-sgVK	Derivado de pCRISPR-Cas9. Contiene un sgRNA dirigido contra el gen <i>vanK</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-Van	Derivado de pCRISPR-Cas9-VK. Contiene el molde para la recombinación homóloga con las secuencias adyacentes clúster <i>van</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo

\*El artículo con referencia (Sánchez de la Nieta et al., 2020) fue realizado durante la presente tesis doctoral.

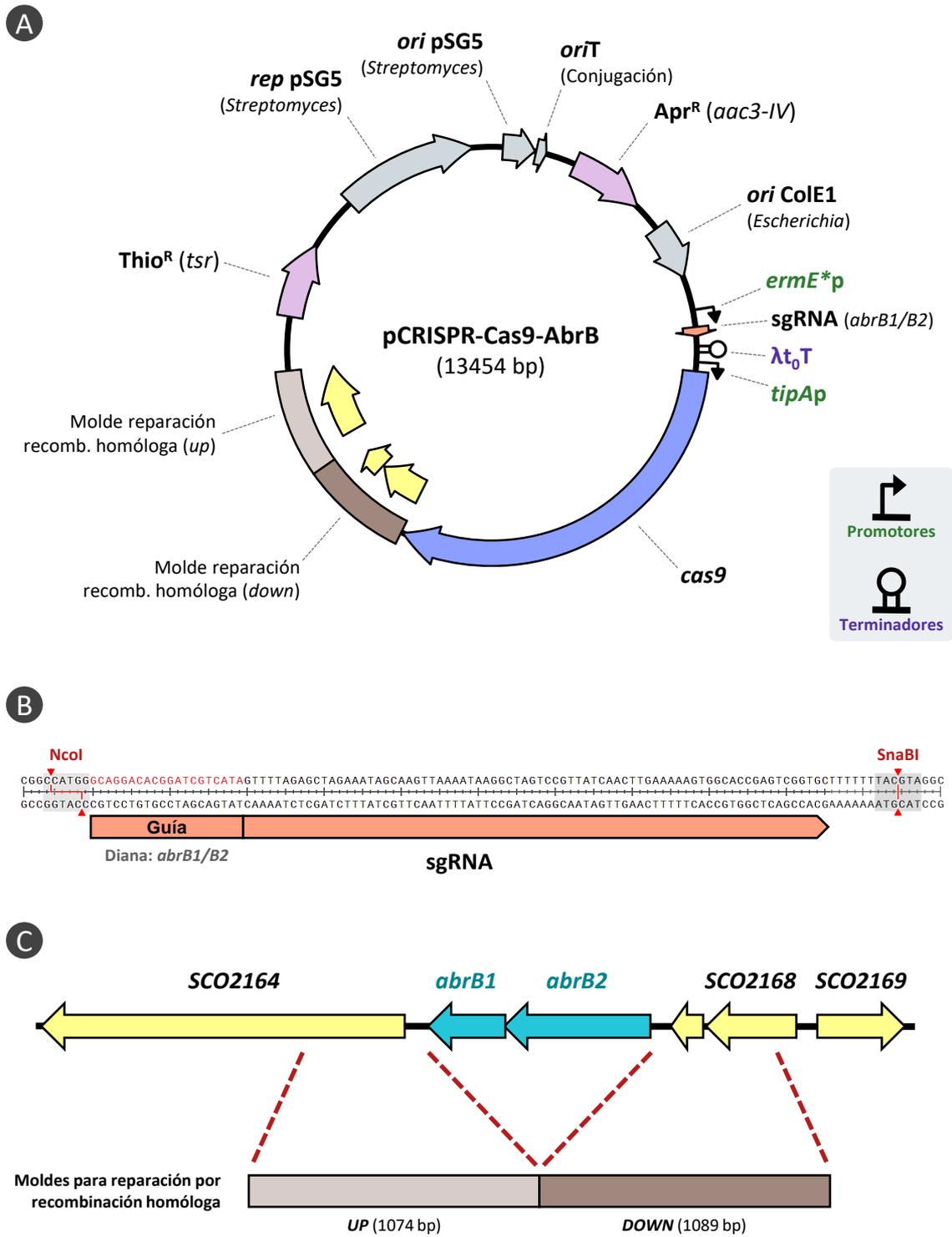
### MM.6 - Diseño y construcción de vectores

A continuación, se detalla el proceso de construcción de los plásmidos generados durante el presente trabajo. El diseño de estos vectores se realizó en el programa *SnapGene (Insightful Science)*. Las enzimas empleadas, así como las técnicas de biología molecular realizadas durante el proceso de construcción de los vectores se detallan en el apartado “MM.4 - Manipulación y detección de ácidos nucleicos”. Los cebadores utilizados se detallan en el apartado “Anexo II - Oligonucleótidos empleados”.

En todos los casos, los plásmidos obtenidos fueron verificados por secuenciación mediante el método Sanger en un secuenciador automático capilar *3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* por el Servicio de Secuenciación, Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca.

#### pCRISPR-Cas9-sgB

El sgRNA para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra los genes *abrB1/B2* de *S. coelicolor* se diseñó mediante la herramienta *CRISPy* (Ronda et al., 2014); la búsqueda de potenciales sitios de corte inespecíficos (*off-targets*) se realizó con la herramienta *Cas-OFFinder* (Bae et al., 2014). La secuencia guía seleccionada fue GCAGGACACGGATCGTCATA, que hibrida en la región solapante de los genes *abrB1* y *abrB2*. La secuencia codificante para el sgRNA se amplificó por PCR mediante los cebadores SAM-051 y SAM-067 utilizando el plásmido pCRISPR-Cas9 como molde. El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción NcoI y SnaBI, y se clonó en el plásmido pCRISPR-Cas9 digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pCRISPR-Cas9-sgB.



**Figura MM.1. Vector pCRISPR-Cas9-AbrB.** [A] Esquema del vector pCRISPR-Cas9-AbrB, utilizado para la edición genómica de *S. coelicolor* mediante CRISPR-Cas9. Solo se muestran los promotores y terminadores relevantes para la aplicación del vector. [B] Esquema de la región del vector correspondiente al sgRNA. Se indica la guía, que tiene como secuencia diana los genes *abrB1/B2*; así como los sitios de restricción NcoI y SnaBI empleados en la construcción del vector. [C] Esquema de los moldes para la reparación por recombinación homóloga

## MATERIALES Y MÉTODOS

### pCRISPR-Cas9-AbrB

Las regiones adyacentes a los genes *abrB1/B2* se amplificaron por PCR. La región a 5' de los genes (1074 bp) se amplificó con los cebadores SAM-069 y SAM-070, mientras que la región a 3' (1089 bp) se amplificó con los cebadores SAM-071 y SAM-072; en ambos casos se utilizó DNA genómico de *S. coelicolor* M145 como molde. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR solapante a partir de los dos fragmentos obtenidos, y usando como cebadores SAM-069 y SAM-072. El fragmento obtenido (2163 bp) contiene las regiones que flanquean a los genes *abrB1/B2*, por lo que permitirá la delección limpia del sistema cuando se repare el corte generado por la enzima Cas9 por recombinación homóloga. Este fragmento se digirió con la enzima de restricción XbaI y se clonó en el plásmido pCRISPR-Cas9-sgB digerido con la misma enzima, dando lugar al plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB (*Figura MM.1*).

### pKCAbrB

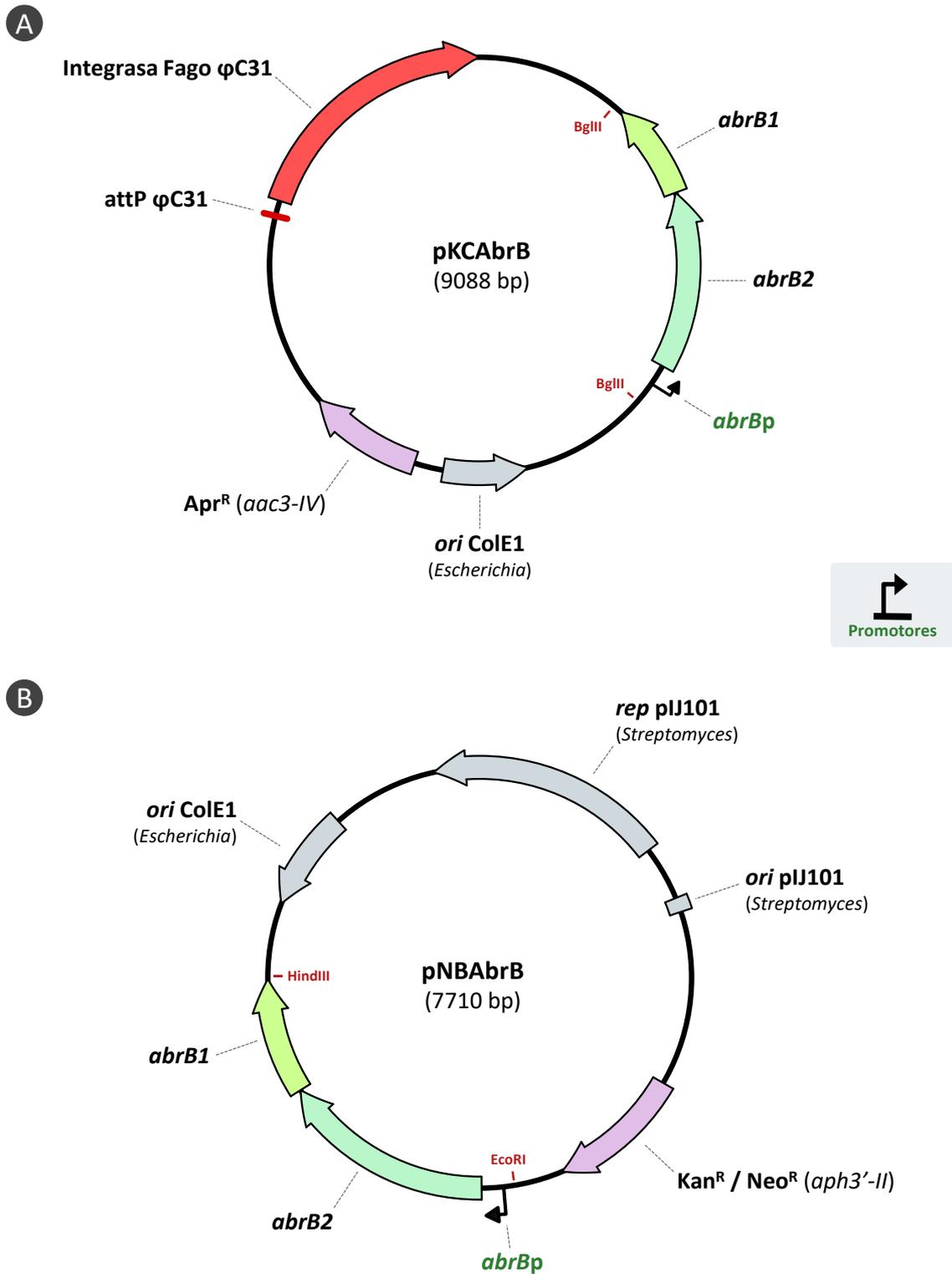
Un fragmento de DNA que incluía los genes *abrB1/B2* de (1931 bp) y su promotor (164 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores DSM-002 y DSM-004 utilizando como molde DNA genómico de *S. coelicolor* M145. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pXHis1 mediante las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, dando lugar al plásmido pXAbrB. Posteriormente, este plásmido se digirió con la enzima de restricción BglII, y el fragmento que contenía los genes *abrB1/B2* y su promotor (2237 bp) se clonó en el plásmido pKC796A digerido con la misma enzima, dando lugar al plásmido pKCAbrB (*Figura MM.2.A*).

### pNBAbrB

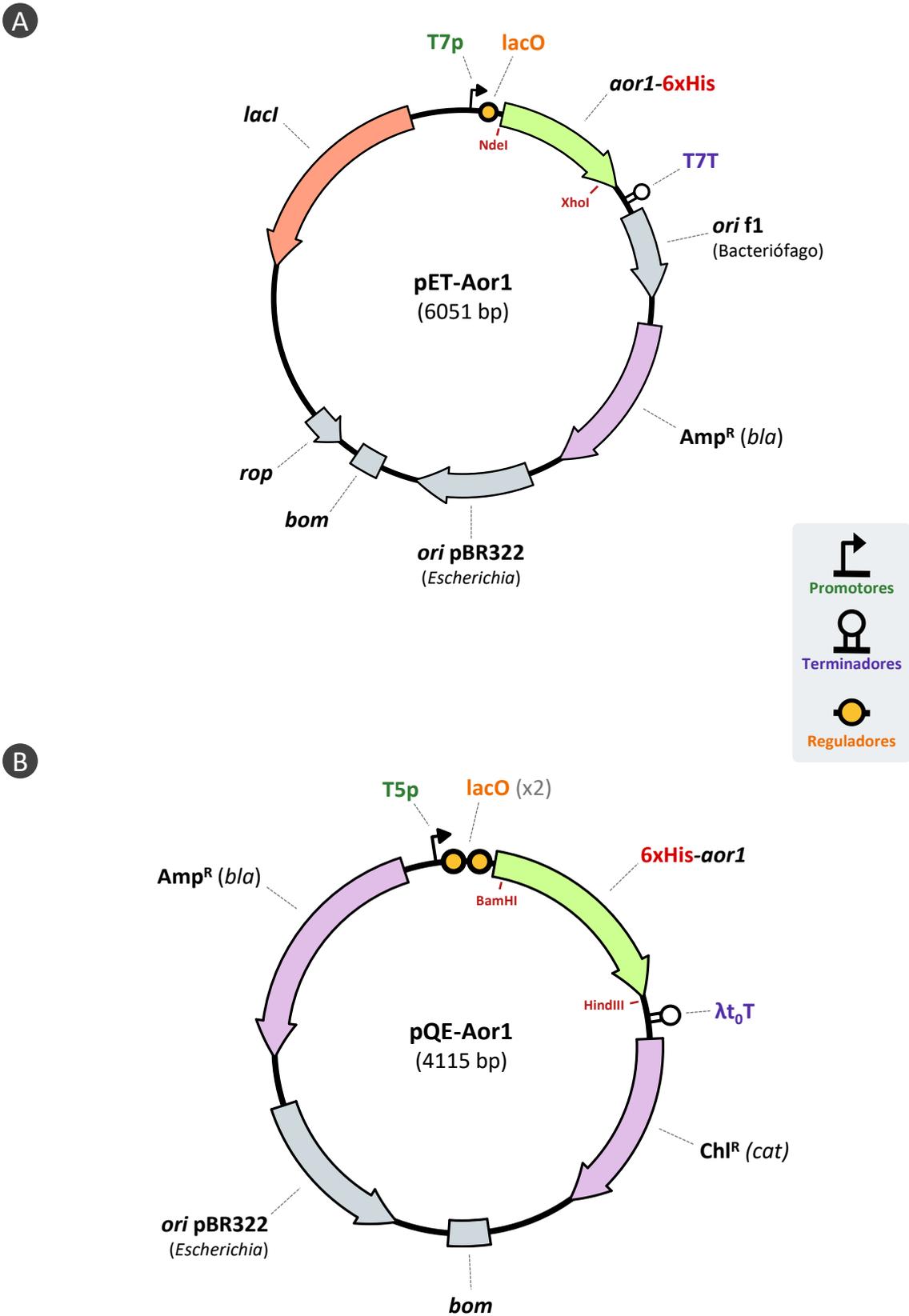
Un fragmento de DNA que incluía los genes *abrB1/B2* (1931 bp) y su promotor (164 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores DSM-002 y DSM-004 utilizando como molde DNA genómico de *S. coelicolor* M145. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pN702GEM3 mediante las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, dando lugar al plásmido pNBAbrB (*Figura MM.2.B*).

### pQE-Aor1

El gen *aor1* de *S. coelicolor* se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-F-BH2281 y RCD-R-2281HI utilizando como molde el plásmido pET-Aor1. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pQE30 mediante las enzimas de restricción BamHI y HindIII, dando lugar al plásmido pQE-Aor1 (*Figura MM.3.B*).



**Figura MM.2. Vectores pKCAbrB y pNBAbBrB.** [A] Esquema del vector pKCAbrB, utilizado para el ensayo de complementación del sistema AbrB1/B2. [B] Esquema del vector pNBAbBrB, utilizado para el ensayo de sobreexpresión del sistema AbrB1/B2. En ambos esquemas solo se muestran los promotores relevantes para la aplicación de los vectores; así como los sitios de restricción empleados en su construcción.



**Figura MM.3. Vectores pET-Aor1 y pQE-Aor1.** [A] Esquema del vector pET-Aor1, utilizado para la expresión de Aor1 en *E. coli*. [B] Esquema del vector pQE-Aor1, utilizado para la expresión de Aor1 en *E. coli*. En ambos esquemas solo se muestran los promotores y terminadores relevantes para la aplicación de los vectores; así como los sitios de restricción empleados en su construcción.

**pKC-STAor1-CE y pKC-STAor1-NE**

Los plásmidos pBS-STAor1-C2 y pBS-STAor1-N2 fueron generados por la empresa *GeneCust*. Estos plásmidos, derivados de pBluescript II SK(+), contienen casetes sintéticos que presentan el terminador *fdT*, los sitios de restricción *NheI* y *NdeI*, el gen *aor1* marcado con 3xFLAG (en el extremo Ct y Nt respectivamente) y el terminador *mmrT*.

El promotor *ermE*\*p se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-059 y RCD-060 utilizando como molde el plásmido pNErmX. El fragmento amplificado se clonó en los plásmidos pBS-STAor1-C2 y pBS-STAor1-N2 mediante las enzimas de restricción *NheI* y *NdeI*, dando lugar a los plásmidos pBS-STAor1-CE y pBS-STAor1-NE, respectivamente.

Los fragmentos STAor1-CE y STAor1-NE, que contienen el gen *aor1* (marcado con 3xFLAG en Ct y Nt respectivamente) bajo el control del promotor *ermE*\*p, y flanqueado por los terminadores *fdT* y *mmrT*, se obtuvieron por digestión con *SpeI* de los plásmidos pBS-STAor1-CE y pBS-STAor1-NE. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pKC796H linealizado por digestión con *XbaI* (los extremos cohesivos generados por *SpeI* y *XbaI* son compatibles), dando lugar a los plásmidos pKC-STAor1-CE y pKC-STAor1-NE, respectivamente (*Figura MM.4.A*).

**pNG-STAor1-CE y pNG-STAor1-NE**

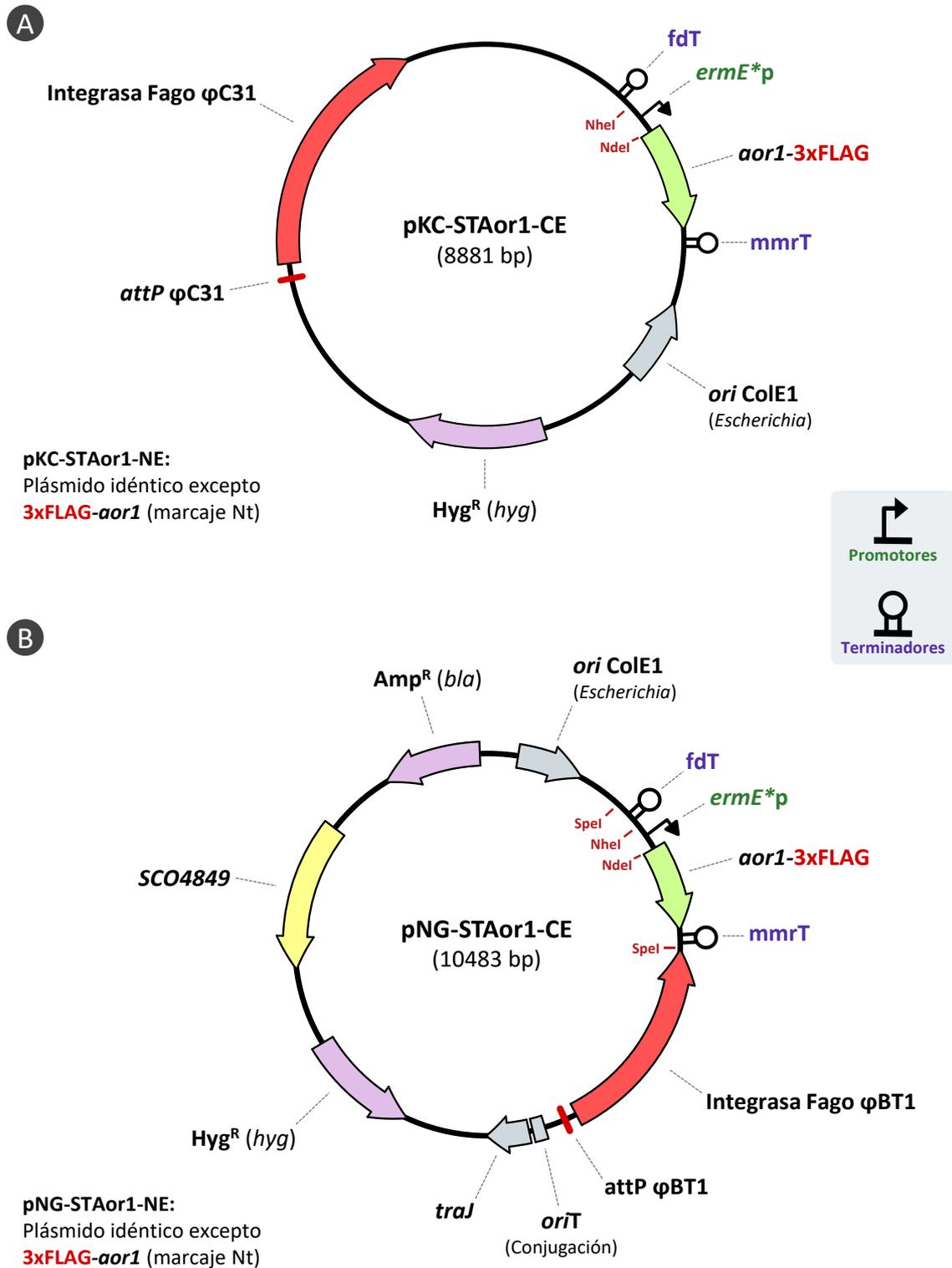
De forma similar a los anteriores plásmidos, los fragmentos STAor1-CE y STAor1-NE, que contienen el gen *aor1* (marcado con 3xFLAG en Ct y Nt respectivamente) bajo el control del promotor *ermE*\*p, y flanqueado por los terminadores *fdT* y *mmrT*, se obtuvieron por digestión con *SpeI* de los plásmidos pBS-STAor1-CE y pBS-STAor1-NE. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pNG3 linealizado por digestión con *SpeI*, dando lugar a los plásmidos pNG-STAor1-CE y pNG-STAor1-NE, respectivamente (*Figura MM.4.B*).

**pHKASP**

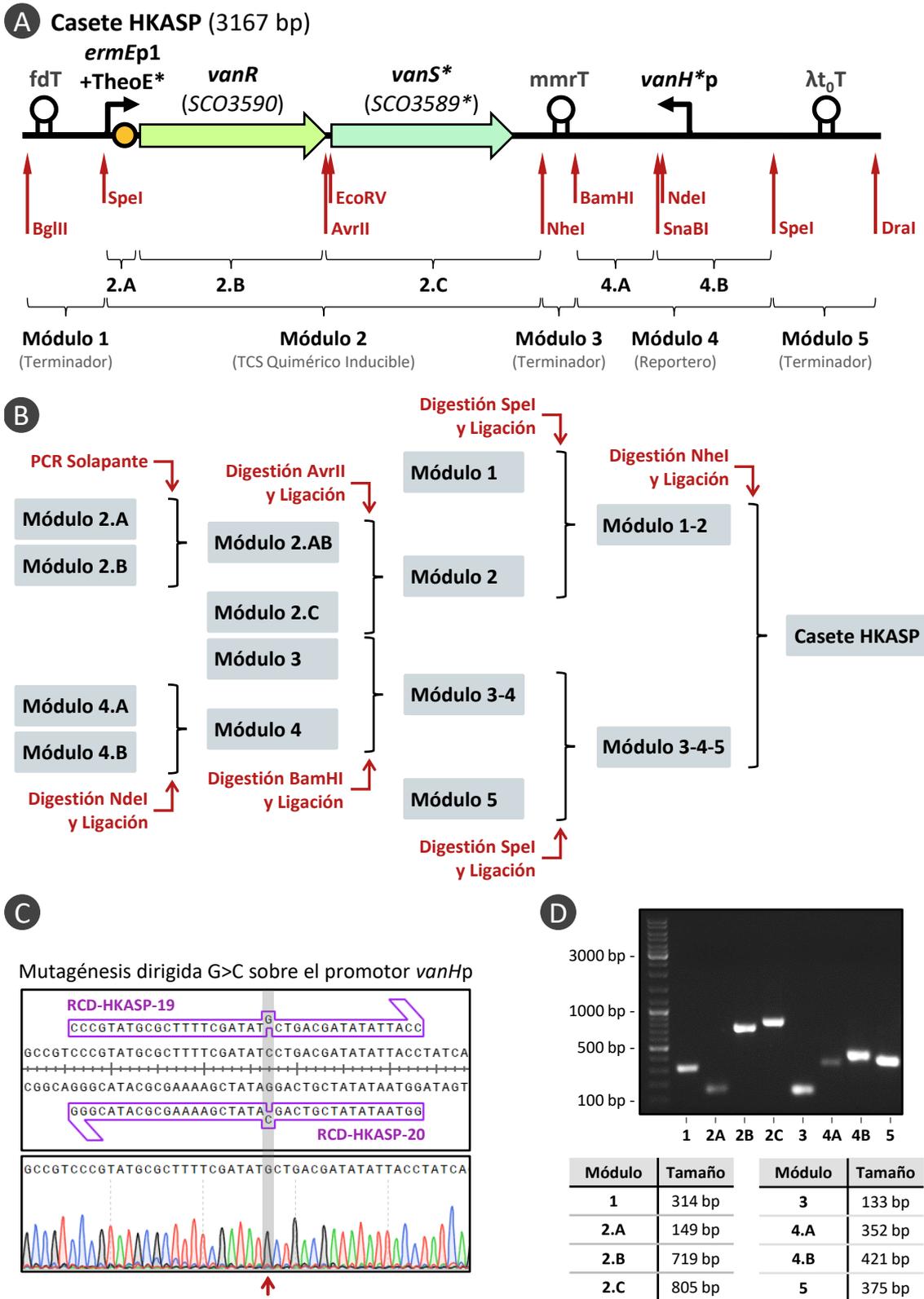
El Casete HKASP se dividió en 5 módulos para su construcción, tal y como se indica en la *Figura MM.5.A*. A continuación, se describe la obtención de cada módulo, posteriormente se indicará el ensamblaje del Casete HKASP, y finalmente la clonación para obtener el plásmido pHKASP.

El Módulo 1 (314 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-01 y RCD-HKASP-02 utilizando como molde el plásmido pCRISPR-Cas9. Este módulo presenta los sitios de restricción *BglII* y *SpeI* en los extremos 5' y 3' respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura MM.4. Vectores pKC-STAor1-CE/NE y pNG-STAor1-CE/NE.** [A] Esquema del vector pKC-STAor1-CE, utilizado para la expresión de Aor1 marcado con 3xFLAG (en el extremo Ct) en *S. coelicolor*. El vector pKC-STAor1-NE es idéntico, salvo que Aor1 se encuentra marcado en el extremo Nt. [B] Esquema del vector pNG-STAor1-CE, utilizado para la expresión de Aor1 marcado con 3xFLAG (en el extremo Ct) en *S. coelicolor*. El vector pNG-STAor1-NE es idéntico, salvo que Aor1 se encuentra marcado en el extremo Nt. En ambos esquemas solo se muestran los promotores y terminadores relevantes para la aplicación de los vectores; así como los sitios de restricción empleados en su construcción.



**Figura MM.5. Casete HKASP.** [A] Esquema del Casete HKASP (3167 bp). Se muestran los módulos utilizados para la construcción del casete, así como los sitios de restricción relevantes para el proceso. [B] Etapas de ensamblaje de los módulos para la obtención del Casete HKASP [C] Esquema de los oligonucleótidos RCD-HKASP-19 y RCD-HKASP-20 con los que se llevó a cabo la mutagénesis dirigida (G>C) del promotor de *vanH*. Se muestra el electroferograma de la secuenciación posterior para comprobar la mutación realizada. [D] Análisis de los módulos que componen el Casete HKASP, previamente a su ensamblaje.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la construcción del Módulo 2 (1632 bp) previamente se obtuvieron los fragmentos 2.A, 2.B y 2.C (*Figura MM.5.A*). El Módulo 2.A (149 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-03 y RCD-HKASP-04 utilizando como molde el plásmido pCRISPR-Theo; este módulo presenta un sitio de restricción SpeI en el extremo 5'. El Módulo 2.B (719 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-05 y RCD-HKASP-06 utilizando como molde DNA genómico de *S. coelicolor* M145; este módulo presenta un sitio de restricción AvrII en el extremo 3'. El Módulo 2.C (805 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-07 y RCD-HKASP-08 utilizando como molde DNA genómico de *S. coelicolor* M145; este módulo presenta los sitios de restricción AvrII y NheI en los extremos 5' y 3' respectivamente.

Para la obtención del Módulo 2 completo primero se ensamblaron los fragmentos 2.A y 2.B mediante PCR solapante con los cebadores RCD-HKASP-03 y RCD-HKASP-17. Posteriormente el fragmento 2.AB obtenido (839 bp) se ensambló con el fragmento 2.C por digestión de ambos fragmentos con AvrII y posterior ligación de los mismos. Tras la ligación se obtuvo el Módulo 2 completo (*Figura MM.5.B*).

El Módulo 3 (133 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-09 y RCD-HKASP-10 utilizando como molde el plásmido pIJ2587. Este módulo presenta los sitios de restricción NheI y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente.

Para la construcción del Módulo 4 (761 bp) previamente se obtuvieron los fragmentos 4.A y 4.B (*Figura MM.5.A*). El Módulo 4.A (352 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-11 y RCD-HKASP-12 utilizando como molde el plásmido pCRISPR-Cas9; este módulo presenta los sitios de restricción BamHI y NdeI en los extremos 5' y 3' respectivamente.

Para la obtención del Módulo 4.B se llevó a cabo un proceso de mutagénesis dirigida por PCR solapante. El promotor de *vanH* se amplificó a partir de DNA genómico de *S. coelicolor* M145 mediante 2 PCRs en las que se introdujo un cambio G>C (*Figura MM.5.C*): en una de las PCR se utilizaron los cebadores RCD-HKASP-18 y RCD-HKASP-19, mientras que en la otra se utilizaron los cebadores RCD-HKASP-20 y RCD-HKASP-21. Posteriormente, ambos fragmentos amplificados se utilizaron como molde para una PCR solapante, en la que se emplearon los cebadores RCD-HKASP-18 y RCD-HKASP-19. El fragmento amplificado, que contiene *vanH*\*p (promotor mutado), se utilizó como molde en una PCR en la que se utilizaron los cebadores RCD-HKASP-13 y RCD-HKASP-14, dando lugar al Módulo 4.B (421 bp).

Para la obtención del Módulo 4 completo se ensamblaron los fragmentos 4.A y 4.B por digestión de ambos fragmentos con NdeI y posterior ligación de los mismos (*Figura MM.5.B*).

El Módulo 5 (375 bp) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-15 y RCD-HKASP-16 utilizando como molde el plásmido pCRISPR-Cas9. Este módulo presenta los sitios de restricción SpeI y DraI en los extremos 5' y 3' respectivamente.

Una vez obtenidos los 5 módulos, se ensamblaron para construir el casete HKASP completo (*Figura MM.5.B-D*). El Módulo 1 y el Módulo 2 se ensamblaron por digestión con SpeI y posterior ligación. El Módulo 3 y el Módulo 4 se ensamblaron por digestión con BamHI y posterior ligación. El Módulo 3-4 obtenido y el Módulo 5 se ensamblaron por digestión con SpeI y posterior ligación. Por último, el Módulo 1-2 y el Módulo 3-4-5 se ensamblaron por digestión con NheI y posterior ligación, dando lugar al Casete HKASP.

Finalmente, el Casete HKASP construido se digirió con las enzimas de restricción BglII y DraI y se clonó en el plásmido pKC796A digerido con BglII y EcoRV (tanto DraI como EcoRV generan extremos romos, por lo que son compatibles), dando lugar al plásmido pHKASP (*Figura MM.6.A*).

### **pHKASP-X**

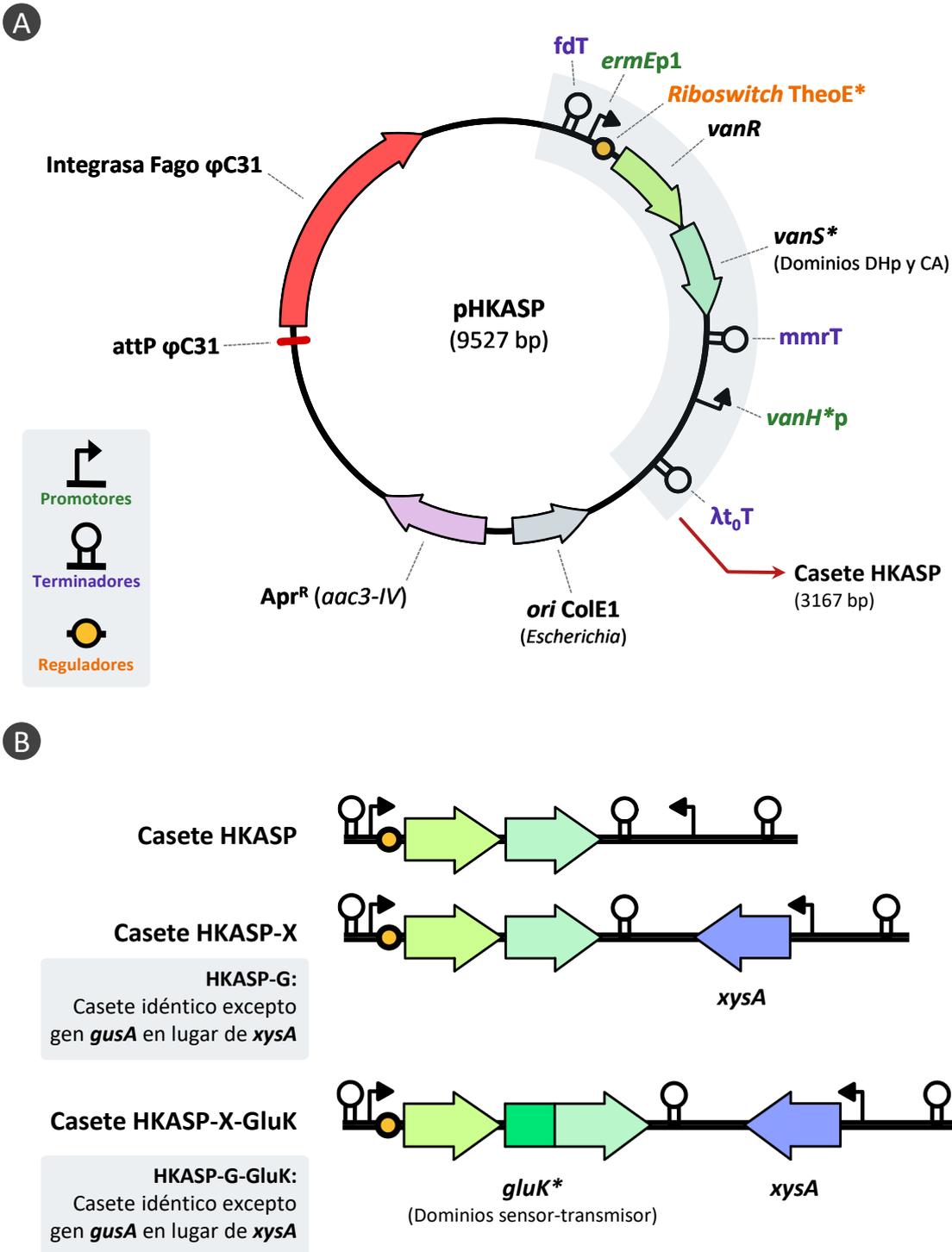
El gen *xysA* de *Streptomyces halstedii* se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-40 y RCD-HKASP-41 utilizando como molde el plásmido pXHis1. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pHKASP mediante las enzimas de restricción NdeI y SnaBI, dando lugar al plásmido pHKASP-X (*Figura MM.6.B*).

### **pHKASP-G**

El gen *gusA* de *E. coli* (optimizado para *S. coelicolor*) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-42 y RCD-HKASP-43 utilizando como molde el plásmido pSETGUS. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pHKASP mediante las enzimas de restricción NdeI y SnaBI, dando lugar al plásmido pHKASP-G (*Figura MM.6.B*).

### **pHKASP-X-GluK y pHKASP-G-GluK**

Un fragmento del gen *gluK* (nt 1-747; corresponde al dominio sensor, las regiones transmembrana y el dominio transmisor) se amplificó por PCR mediante los cebadores RCD-HKASP-36 y RCD-HKASP-37 utilizando como molde DNA genómico de *S. coelicolor* M145. El fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción AvrII y SnaBI, y se clonó en los plásmidos pHKASP-X y pHKASP-G digeridos con AvrII y EcoRV (tanto SnaBI como EcoRV generan extremos romos, por lo que son compatibles), dando lugar a los plásmidos pHKASP-X-GluK y pHKASP-G-GluK respectivamente (*Figura MM.6.B*).



**Figura MM.6. Vector pHKASP y derivados.** [A] Esquema del vector pHKASP. Solo se muestran los promotores y terminadores relevantes para la aplicación del vector. [B] Esquema del Casete HKASP y derivados. Los elementos genéticos se indican en el esquema del vector HKASP en [A], a excepción de los incluidos en los casetes derivados: HKASP-X, HKASP-G, HKASP-X-GluK y HKASP-G-GluK.

### pCRISPR-Cas9-sgVK

El sgRNA para dirigir el corte de la enzima Cas9 contra el gen *vanK* de *S. coelicolor* se diseñó mediante la herramienta *CRISPy* (Ronda et al., 2014); la búsqueda de potenciales sitios de corte inespecíficos (*off-targets*) se realizó con la herramienta *Cas-OFFinder* (Bae et al., 2014). La secuencia guía seleccionada fue GACCTCTATATGAAGCGACG. La secuencia codificante para el sgRNA se amplificó por PCR mediante los cebadores SAM-051 y RCD-HKASP-26 utilizando el plásmido pCRISPR-Cas9 como molde. El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción NcoI y SnaBI, y se clonó en el plásmido pCRISPR-Cas9 digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pCRISPR-Cas9-sgVK.

### pCRISPR-Cas9-Van

Las regiones adyacentes al clúster *van* se amplificaron por PCR. La región a 5' del clúster (998 bp) se amplificó con los cebadores RCD-HKASP-22 y RCD-HKASP-23, mientras que la región a 3' (1003 bp) se amplificó con los cebadores RCD-HKASP-24 y RCD-HKASP-44; en ambos casos se utilizó DNA genómico de *S. coelicolor* M145 como molde. Posteriormente, se llevó a cabo una PCR solapante a partir de los dos fragmentos obtenidos, y usando como cebadores RCD-HKASP-22 y RCD-HKASP-44. El fragmento obtenido (2001 bp) contiene las regiones que flanquean al clúster *van*, por lo que permitirá la delección limpia del mismo cuando se repare el corte generado por la enzima Cas9 por recombinación homóloga. Este fragmento se digirió con la enzima de restricción XbaI y se clonó en el plásmido pCRISPR-Cas9-sgVK digerido con XbaI y StuI, dando lugar al plásmido pCRISPR-Cas9-Van.

## MM.7 - Introducción de vectores en microorganismos

### MM.7.1 - Transformación de *Escherichia coli*

*E. coli* se transformó con los plásmidos oportunos utilizando células químicamente competentes de la cepa de interés mediante la metodología de choque térmico.

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se empleó una modificación del método químico basado en el  $Mg^{2+}$  descrito por A. Nishimura y colaboradores (Nishimura et al., 1990). Las cepas de interés se cultivaron a 37°C en medio LB suplementado con dextrosa 0,2% y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10,0 mM hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6; tras lo cual, los cultivos se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Posteriormente las células se lavaron y se resuspendieron

## MATERIALES Y MÉTODOS

en medio LB suplementado con glicerol 40,0%, PEG-6000 15,0% y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,0 mM. Las células competentes obtenidas se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

La metodología de transformación por choque térmico utilizada fue la descrita por Douglas Hanahan (Hanahan, 1983). Se mezclaron células competentes de la cepa de interés con el plásmido que se desea introducir. Tras una incubación a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min, se aplicó un shock térmico de  $42^\circ\text{C}$  durante 2 min; tras lo cual las muestras se mantuvieron a  $4^\circ\text{C}$  durante otros 2 min. Se añadió medio LB a las muestras y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 h. Finalmente, las muestras se sembraron en placas de LB con el correspondiente antibiótico y se incubaron 24 h a  $37^\circ\text{C}$  (excepto *E. coli* Rosetta-gami B (DE3), que se incubó durante 48 h).

### MM.7.2 - Transformación de *Streptomyces coelicolor*

La transformación de *S. coelicolor* se realizó mediante la transferencia de plásmidos demetilados (aislados a partir de *E. coli* ET12567) a protoplastos de la cepa en cuestión.

Para la obtención de protoplastos se utilizó un método modificado del descrito por Mervin J. Bibb y colaboradores (Bibb et al., 1978). La cepa de interés se cultivó en medio YEG+ $\text{MgCl}_2$  partiendo de un inóculo de  $5 \cdot 10^5$  esporas/mL, y se incubó a  $28^\circ\text{C}$  durante 36 h. El micelio obtenido se lavó varias veces con una solución de sacarosa 10,3%, y se resuspendió en Medio P (TES 5,73 g/L; Sacarosa 103,0 g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,03 g/L,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,25 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3,68 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50,0 mg/L; Elementos traza 2,0 mL/L { $\text{ZnCl}_2$  40,0 mg/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  200,0 mg/L;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg/L;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg/L;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg/L}; pH 7,2) con lisozima 1,5 mg/mL. Tras una incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min, los protoplastos obtenidos se lavaron varias veces con Medio P, y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para la transformación de los protoplastos de *S. coelicolor* obtenidos se utilizó un método modificado del descrito por Mervin J. Bibb y colaboradores (Bibb et al., 1978). Se mezclaron los protoplastos de la cepa de interés, el plásmido que se desea introducir demetilado y Solución P con 25,0% de PEG-6000 (BDH; Ref.: 443915V). Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente se añadió Solución P y se sembraron en placas de R2YE sin antibiótico. Tras 24 h de incubación a  $30^\circ\text{C}$  se añadió el antibiótico correspondiente por cobertera a las placas de R2YE.

### MM.7.3 - Conjugación interespecífica *Escherichia-Streptomyces*

La transferencia de vectores desde *E. coli* ET12567 / pUZ8002 a *S. coelicolor* por conjugación interespecífica se realizó mediante un método modificado del descrito por Fiona Flett y colaboradores (Flett et al., 1997). A una suspensión de  $10^8$  esporas de la cepa de interés de *S. coelicolor* en TSB se aplicó un choque térmico a 50°C durante 10 min. La suspensión de esporas se mezcló con un cultivo de *E. coli* ET12567 / pUZ8002 (cepa demetilante) con el plásmido a transferir cultivado previamente a 28°C durante 12 h en medio LB (con los antibióticos correspondientes). Esta mezcla se plaqueó en medio SFM+MgCl<sub>2</sub> y se realizaron varios pases de selección con ácido nalidíxico para eliminar a *E. coli* y purificar colonias de *Streptomyces* que hayan captado el plásmido (en el proceso de selección, aparte del ácido nalidíxico, también se incluye el antibiótico que sirve como marcador de selección del plásmido).

### MM.8 - Edición genómica mediante CRISPR-Cas9

A continuación, se detalla el proceso de obtención de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrB1/B2*. El método seguido es una modificación del descrito por Youjun Tong y colaboradores (Tong et al., 2015).

Se construyeron los plásmidos pCRISPR-Cas9-sgB y pCRISPR-Cas9-AbrB tal y como se indica en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”. Una vez obtenidos, dichos plásmidos y pCRISPR-Cas9 se introdujeron en *E. coli* ET12567 / pUZ8002 por transformación, y seguidamente en *S. coelicolor* M145 mediante conjugación interespecífica (procesos descritos en el apartado “MM.7 - Introducción de vectores en microorganismos”). Tras comprobar que el sgRNA diseñado y el sistema CRISPR funcionaron correctamente a través de los plásmidos pCRISPR-Cas9 (plásmido vacío control) y pCRISPR-Cas9-sgB (control de corte), se seleccionaron varias colonias *S. coelicolor* M145 / pCRISPR-Cas9-AbrB. Para inducir la pérdida del plásmido (ya debería haber tenido lugar la delección de los genes *abrB1/B2* tras la reparación del corte por recombinación homóloga), las colonias se cultivaron en medio líquido TSB durante 48h a 37°C (el plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB es termosensible) con agitación a 200 rpm. La pérdida del plásmido se comprobó mediante cultivo en placas de R2YE y R2YE+Apramicina, donde se seleccionaron las colonias sensibles a apramicina. Para comprobar la delección de los genes *abrB1/B2* se obtuvo DNA genómico de la cepa generada y se analizó por PCR en comparación con DNA genómico obtenido de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. Se utilizaron tanto oligonucleótidos externos (RCD-005 / RCD-006) como internos (RCD-007 / RCD-008) a la zona delecionada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta abrA1/A2 \Delta abrB1/B2$  se siguieron los mismos pasos que para la obtención de *S. coelicolor* M145  $\Delta abrB1/B2$  indicada previamente, con la excepción de que la cepa base en la que se realizó la delección fue *S. coelicolor* M145  $\Delta abrA1/A2$ , en lugar de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. Se comprobó tanto la delección de los genes *abrB1/B2* como la delección de los genes *abrA1/A2* (generada previamente) mediante oligonucleótidos externos (*abrB1/B2*: RCD-005 / RCD-006) e internos (*abrA1/A2*: RCD-001 / RCD-002; *abrB1/B2*: RCD-005 / RCD-006) e internos (*abrA1/A2*: RCD-003 / RCD-004; *abrB1/B2*: RCD-007 / RCD-008) a la zona delecionada.

Para la obtención de la cepa *S. coelicolor* M145  $\Delta van$  se construyeron los plásmidos pCRISPR-Cas9-sgVK y pCRISPR-Cas9-Van tal y como se indica en el apartado “MM.6 - Diseño y construcción de vectores”. Cuando estos plásmidos se introdujeron, junto a pCRISPR-Cas9, en *S. coelicolor* M145 mediante conjugación interespecífica se comprobó que el sistema no estaba funcionando correctamente, ya que se obtenían colonias en el control de corte (pCRISPR-Cas9-sgVK).

## MM.9 - Manipulación y detección de proteínas

### MM.9.1 - Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Ref.: 500-0201; *Bio-Rad*) y un espectrofotómetro *NanoPhotometer® N60 (IMPLEN)*, siguiendo el protocolo y recomendaciones del fabricante. Para la elaboración de la recta patrón se empleó BSA (Albúmina de Suero Bovino).

### MM.9.2 - Expresión y purificación de proteínas en *Escherichia coli*

#### Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales de *E. coli*, se recogieron células de la cepa de interés cultivada en las condiciones requeridas (cultivos líquidos), y se resuspendieron en solución Tris-HCl 10,0 mM pH 7,0 con *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Ref.: 11697498001; *Roche*). La rotura celular se llevó a cabo en un homogenizador ultrasónico *LABSONIC® M (Sartorius)*, con las siguientes condiciones: 10 pulsos de 10 s con una amplitud del 100% (30 s de reposo entre pulsos) a una temperatura de 4°C.

### Expresión y purificación de Aor1

Para la producción de grandes cantidades de Aor1 en *E. coli* (requeridas para la posterior purificación de anticuerpos  $\alpha$ -Aor1) se realizó una batería de ensayos para optimizar su expresión y purificación.

Se analizó la expresión de Aor1 en las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE) transformadas con los plásmidos pET-2281 y pQE-2281 (en ambos plásmidos, Aor1 se encuentra marcada con 6xHis, y su expresión es inducible por IPTG). Se analizaron diversas condiciones de inducción de Aor1, variando la concentración de IPTG utilizada (0,2 mM o 1,0 mM), la densidad óptica del cultivo a la que se añade el IPTG (D.O. 0,5 o D.O. 2,0) y las condiciones de cultivo durante la inducción (30°C durante 6 h, o 25°C durante 12 h). En todos los casos los cultivos se realizaron en medio líquido LB en agitador orbital termostatzado *ISF-1-W (Kühner)* con agitación a 200 rpm.

Además, para optimizar la rotura celular posterior se analizaron diferentes procedimientos: un homogenizador celular *FastPrep® FP120 (Savant)*, un disruptor ultrasónico *LABSONIC® M (Sartorius)* y un molino criogénico *6770 Freezer/Mill (SPEX SamplePrep)*. En todos los casos, previamente a la rotura celular, las células obtenidas de los cultivos se resuspendieron en Buffer de Lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50,0 mM; NaCl 0,3 M, Triton X-100 0,1%; Imidazol 5,0 mM; *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* Ref.:11873580001 Roche; pH 7,5). Para la rotura en el disruptor celular *FastPrep® FP120 (Savant)* se añadieron esferas de vidrio *Glasperlen 0,40-0,60mm  $\Phi$*  (Ref.: BBI-8541701; *B. Braun Biotech International*) a la muestra, y las condiciones utilizadas fueron 4 ciclos de 20 s a máxima intensidad (30 s de reposo entre ciclos) a una temperatura de 4°C. Las condiciones utilizadas en el homogenizador ultrasónico *LABSONIC® M (Sartorius)* fueron 10 pulsos de 10 s con una amplitud del 100% (30 s de reposo entre pulsos) a una temperatura de 4°C. Las condiciones utilizadas en el molino criogénico *6770 Freezer/Mill (SPEX SamplePrep)* fueron 4 ciclos de 1 min con una intensidad de 15 CPS (30 impactos por segundo); entre ciclos se dejó un reposo de 1 min, y todo el proceso de rotura se llevó a cabo en nitrógeno líquido (-195°C).

Tras el proceso de optimización, la expresión de Aor1 se llevó a cabo en *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) / pET-2281 en un volumen de 400 mL de cultivo. La inducción de Aor1 se realizó cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 2,0 con una concentración de IPTG de 0,2 mM; tras la adición de IPTG los cultivos se incubaron a 25°C durante 12 h. La rotura celular se realizó en el molino criogénico *6770 Freezer/Mill (SPEX SamplePrep)* según las condiciones indicadas previamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La purificación de Aor1 (marcado con 6xHis) a partir de la fracción soluble del lisado celular obtenido se realizó con el kit *HisPur™ Cobalt Resin* (Ref.: 89964; *Thermo Scientific*) en columnas *Econo-Pac® Disposable Chromatography Columns* (Ref.: 7321010, *Bio-Rad*) siguiendo el protocolo y recomendaciones del fabricante. Durante la purificación los lavados de la resina se realizaron a concentraciones de imidazol de 20,0 mM y 30,0 mM, mientras que las eluciones se realizaron a concentraciones de imidazol de 0,25 M y 1,0 M.

### MM.9.3 - Purificación de proteínas en *Streptomyces coelicolor*

Para la extracción de proteínas totales de *S. coelicolor*, se recogió micelio de la cepa de interés cultivada en las condiciones requeridas (cultivos líquidos), se lavó con sacarosa 10,3% y se resuspendió en solución Tris-HCl 1,0 M pH 7,0 con *cOplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Ref.: 11697498001; *Roche*). La rotura celular se llevó a cabo en un disruptor celular *FastPrep® FP120* (*Savant*). Para el proceso de rotura se añadieron esferas de vidrio *Glasperlen 0,40-0,60mm Ø* (Ref.: BBI-8541701; *B. Braun Biotech International*) a la muestra; las condiciones utilizadas fueron 4 ciclos de 15 s a máxima intensidad (1 min de reposo entre ciclos) a una temperatura de 4°C.

### MM.9.4 - Purificación de anticuerpos

Previamente en el laboratorio se llevó a cabo la obtención de anticuerpos policlonales  $\alpha$ -Aor1 mediante inmunización de un conejo de raza *New Zealand* con un péptido del extremo carboxilo del regulador huérfano Aor1 (secuencia del péptido: CAVLHYLENARAPRH). En la presente Tesis Doctoral se realizó la purificación de anticuerpos  $\alpha$ -Aor1 a partir del antisuero obtenido.

Para el proceso de purificación se obtuvieron grandes cantidades del regulador Aor1 según se describe en el apartado “MM.9.2 - Expresión y purificación de proteínas en *Escherichia coli*”. Se cambió el buffer en el que se encontraba la proteína Aor1 purificada a Buffer de Acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,3) mediante diálisis, utilizando *D-Tube™ Dialyzer Maxi MWCO 6-8 kDa* (Ref.: 71509; *Novagen*); se siguió el protocolo y recomendaciones del fabricante.

#### Preparación de la columna (fijación de proteínas)

Para la purificación de los anticuerpos se utilizó una columna *Econo-Column® Chromatography Column 1,5x15,0 cm* (Ref.: 7371517; *Bio-Rad*), que se rellenó con *CNBr-Activated Sepharose® 4B* (Ref.: GE17-0430-01; *Cytiva*). El polímero se lavó primero con HCl 1,0 mM pH 2,75, y posteriormente con Buffer de Acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,3). Tras los

lavados se añadieron 3,29 mg de Aor1 en Buffer de Acoplamiento (se determinó la absorbancia a 280 nm de la solución de proteína previamente), y la columna se incubó a 4°C durante 12 h.

### **Unión de los anticuerpos a la columna**

Se recogió la fracción no retenida a la columna y se determinó la absorbancia a 280 nm para comprobar que la proteína Aor1 se había fijado a la columna correctamente. La columna se lavó con Buffer de Acoplamiento, y posteriormente se añadió Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras la incubación, la columna se lavó con 3 ciclos alternativos de pH mediante la Solución Ácida (Acetato de sodio 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 4,0) y la Solución Básica (Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,0). Tras los ciclos de pH, la columna se lavó con PBS (NaCl 8,0 g/L; KCl 2,0 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g/L; pH 7,4) más azida sódica 0,05%. Posteriormente, se realizó otro lavado con PBS y se añadió el antisuero de conejo inmunizado con el péptido de Aor1. La columna se incubó a 4°C durante 12 h.

### **Elución de los anticuerpos**

Tras la incubación, se recogió la fracción no retenida, y la columna se lavó con solución de lavado (Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,5 M; pH 7,5) varias veces, hasta que la absorbancia a 280 nm de los lavados fue inferior a 0,01. La elución de los anticuerpos unidos a la columna se realizó con glicina 0,1 M pH 2,6. Se recogieron varias fracciones en tubos con Tris-HCl 1,0 M pH 8,0 (para neutralizar el pH ácido de la glicina). Se midió la absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones para evaluar los anticuerpos eluidos. Finalmente se añadió azida sódica 0,05% a los anticuerpos purificados, y se almacenaron a 4°C.

Las mediciones de absorbancia a 280 nm realizadas para monitorizar y controlar la purificación de anticuerpos se realizaron en un espectrofotómetro *NanoPhotometer*<sup>®</sup> N60 (IMPLEN).

### **MM.9.5 - SDS-PAGE**

La separación de proteínas según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los geles separador y concentrador se prepararon a una concentración final de acrilamida del 15,0% y del 4,0% respectivamente. Las muestras de proteínas se estandarizaron en base a la bio masa celular de la que se extrajeron, y se prepararon en Tampón de Carga (Tris-HCl 0,25 M; Glicerol 40,0%; SDS 8,0%; Azul de bromofenol 0,05%; DTT 0,05 M; pH 6,8). Previamente a la electroforesis las muestras se incubaron a 100°C durante 5 min. La electroforesis se realizó en Tampón de

## MATERIALES Y MÉTODOS

Electroforesis (Tris-HCl 30,0 g/L; Glicerol 14,4%; SDS 0,5%) a un amperaje constante de 30 mA/gel. Como marcadores de peso molecular se utilizaron *Unstained Low Range SDS-PAGE Standards* (Ref.: 1610304; *Bio-Rad*) y *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Ref.: 26634; *Thermo Scientific*); este último marcador solo en aquellas muestras en las que se realizó posteriormente un *Western Blot*.

### MM.9.6 - Visualización de proteínas por tinción Coomasie

Para la visualización de proteínas de forma inespecífica, los geles procedentes de SDS-PAGE se tiñeron con azul de Coomasie. Para ello, los geles se mantuvieron 30 min en solución colorante Metanol : Ácido acético : Agua (50:10:40) con Azul de Coomasie 0,5%. Tras varios lavados con agua se mantuvieron en una solución Metanol : Ácido acético : Agua (25:10:65) para desteñir el gel. Finalmente, los geles se fijaron con etanol 25,0% durante 30 min.

### MM.9.7 - Western Blot

Para la detección específica de Aor1 por *Western Blot*, las muestras sometidas a SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de PVDF *Inmobilon®-P PVDF Membrane* (Ref.: IPVH00010; *Millipore*) mediante el sistema *MiniTrans-Blot (Bio-Rad)* a un amperaje constante de 250 mA durante 1 h. Las membranas se lavaron en agua y TBST (Tris-HCl 10,0 mM; Tween-20 0,05%; NaCl 0,15 M; pH 8,0) y se incubaron con una solución de BSA 1,0% en TBST durante 30 min a temperatura ambiente para bloquearlas.

Posteriormente las membranas se incubaron con una solución del anticuerpo primario en TBST. Cuando se utilizó el antisuero de conejo inmunizado con un péptido de Aor1 (dilución 1/10.000) la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 30 min. Sin embargo, cuando se utilizaron los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -Aor1 purificados durante la presente tesis doctoral (dilución 1/1.000), la incubación se realizó a 4°C durante 12 h.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con una solución del anticuerpo secundario en TBST. Se utilizaron anticuerpos de burro contra IgG de conejo conjugados a la enzima peroxidasa HRP: *Amersahm ECL Rabbit IgG HRP-linked whole Ab from donkey* (Ref.: NA934; *Cytiva*); la dilución empleada fue 1/10.000.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se revelaron. El revelado del *Western Blot* se realizó por quimioluminiscencia, gracias a la reacción catalizada por la peroxidasa HRP conjugada al anticuerpo secundario, mediante el kit *WesternBright™ ECL Western Blotting Detection Kit* (Ref.: K-12045; *Advansta*) y películas radiográficas, siguiendo el protocolo y recomendaciones del fabricante.

## MM.10 - Análisis de la producción de antibióticos

### MM.10.1 - Antibióticos endógenos: undecilprodigiosina y actinorrodina

La producción de RED en medio sólido se puede observar como la aparición de pigmentación roja en el micelio de *S. coelicolor*. La producción de ACT en medio sólido se puede observar como la aparición de pigmentación azul (a pH neutro-alcalino) alrededor del micelio de *S. coelicolor* (molécula secretada al medio).

La cuantificación de la producción de RED y ACT en medio líquido se realizó mediante un método colorimétrico modificado del descrito por Tobias Kieser y colaboradores (Kieser et al., 2000).

Para la cuantificación de la ACT, las muestras (incluyendo micelio y sobrenadante) se trataron con KOH a una concentración final de 0,5 M y se incubaron durante 12 h a 4°C. Posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 640 nm. La concentración de ACT se calculó aplicando la Ley de Lambert-Beer ( $\epsilon_{\text{ACT-640}} = 25320,0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Para la cuantificación de la RED, el precipitado celular obtenido del proceso de cuantificación de la ACT (indicado en el párrafo anterior) se lavó con HCl 0,5 M, y se resuspendió en metanol acidificado con HCl 0,5 M. Tras una incubación durante 2 h a temperatura ambiente, se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 530 nm. La concentración de RED se calculó aplicando la Ley de Lambert-Beer ( $\epsilon_{\text{RED-530}} = 100500,0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### MM.10.2 - Producción heteróloga: oviedomicina

Para la determinación de oviedomicina, las muestras (incluyendo micelio y sobrenadante) se trataron con acetato de etilo acidificado (ácido fórmico 1,0%). Tras una incubación a temperatura ambiente durante 45 min se recogió la fase orgánica, que fue desecada para su posterior análisis.

El análisis de los extractos obtenidos fue realizado por el Servicio de Análisis Elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca. El análisis se realizó en un sistema *HPLC*

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Agilent 1100 (Agilent Technologies)* acoplado a un detector UV y un espectrómetro de masas *Agilent Trap XCT (Agilent Technologies)*. La columna empleada fue *HPLC Poroshell 120 C18 Column, 2,7 μm, 2,1x100,0 mm (Agilent Technologies)*. Se utilizó el método de elución en gradiente con acetonitrilo (10,0-100,0% acetonitrilo en 7 min; flujo de 0,5 mL/min). La detección por masas se realizó por ESI (*Electrospray Ionization*) en modo positivo y negativo.

### MM.10.3 - Producción heteróloga: mitramicina

Para la determinación de mitramicina, las muestras (incluyendo micelio y sobrenadante) se trataron con acetato de etilo acidificado (ácido fórmico 1,0%). Tras una incubación a temperatura ambiente durante 45 min se recogió la fase orgánica, que fue desecada para su posterior análisis.

El análisis de los extractos obtenidos fue realizado por el Servicio de Análisis Elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca. El análisis se realizó en un sistema *ACQUITY UPLC H-Class (Waters)* acoplado a un detector UV y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo *Xevo TQ-S Micro (Waters)*. La columna empleada fue *ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 1,7 μm, 2,1x100,0 mm (Waters)*. Se utilizó el método de elución en gradiente con acetonitrilo (10,0-100,0% acetonitrilo en 7 min; flujo de 0,5 mL/min).

### MM.11 - Bioinformática

#### Bases de datos

Las bases de datos de secuencias génicas y proteicas utilizadas fueron: *GenBank*<sup>6</sup> (Benson et al., 2013), *StrepDB*<sup>7</sup>, *P2CS*<sup>8</sup> (Ortet et al., 2015), *P2RP*<sup>9</sup> (Barakat et al., 2013), *UniProt*<sup>10</sup> (Bateman et al., 2021), *STRING*<sup>11</sup> (Szklarczyk et al., 2021), *GeneOntology*<sup>12</sup> (Carbon et al., 2021), *KEGG*<sup>13</sup> (Kanehisa et al., 2021) y *BioCyc*<sup>14</sup> (Karp et al., 2018). La base de datos de uso de codones utilizada fue *CUTG*<sup>15</sup> (Nakamura et al., 2000). La base de datos de estructuras proteicas utilizada fue *RCSB PDB*<sup>16</sup> (Berman et al., 2000). Las bases de datos de compuestos y sus rutas de síntesis (así como de los clústeres génicos asociados) utilizadas fueron: *PubChem*<sup>17</sup> (Kim et al., 2021), *MetaCyc*<sup>18</sup> (Caspi et al., 2020) y *MIBiG*<sup>19</sup> (Kautsar et al., 2020).

<sup>6</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<sup>7</sup> <http://strepdb.streptomyces.org.uk>

<sup>8</sup> <http://www.p2cs.org/>

<sup>9</sup> <http://www.p2rp.org/>

<sup>10</sup> <https://www.uniprot.org/>

<sup>11</sup> <https://string-db.org/>

<sup>12</sup> <http://geneontology.org/>

<sup>13</sup> <https://www.genome.jp/kegg/>

<sup>14</sup> <https://biocyc.org/>

<sup>15</sup> <https://www.kazusa.or.jp/codon/>

<sup>16</sup> <https://www.rcsb.org/>

<sup>17</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>18</sup> <https://metacyc.org/>

<sup>19</sup> <https://mibig.secondarymetabolites.org/>

### Visualización y manipulación de ácidos nucleicos

La visualización y manipulación de secuencias de ácidos nucleicos, así como el diseño de vectores, se realizó en *SnapGene*<sup>20</sup> (*Insightful Science*). La representación de moléculas de RNA se realizó con *RNAstructure*<sup>21</sup> (Reuter & Mathews, 2010).

El diseño de oligonucleótidos se realizó mediante el programa *SnapGene*<sup>22</sup> (*Insightful Science*) y la herramienta *OligoAnalyzer*<sup>23</sup> (*Integrated DNA Technologies*). Los oligonucleótidos empleados en RT-qPCRs fueron diseñados mediante *PrimerQuest Tool*<sup>24</sup> (*Integrated DNA Technologies*).

El diseño de sgRNA para la edición genómica mediante CRISPR-Cas9 se realizó mediante la herramienta *CRISPy*<sup>25</sup> (Ronda et al., 2014). La búsqueda de potenciales sitios de corte inespecíficos (*off-targets*) se llevó a cabo con *Cas-OFFinder*<sup>26</sup> (Bae et al., 2014).

El procesamiento y análisis de datos obtenidos en las RT-qPCRs se realizó en el programa *CFX Manager*<sup>TM</sup> (*Bio-Rad*).

La visualización de los alineamientos de las lecturas obtenidas en el análisis transcriptómico por RNAseq con el genoma de referencia se realizó en *Integrative Genomics Viewer*<sup>27</sup> (Robinson et al., 2011).

El análisis de promotores para la búsqueda de potenciales motivos implicados en la regulación de los mismos se realizó mediante las herramientas *MEME*<sup>28</sup> (Bailey & Elkan, 1994) y *GLAM2*<sup>29</sup> (Frith et al., 2008). El análisis de motivos reguladores se realizó mediante las herramientas *FIMO*<sup>30</sup> (Grant et al., 2011) y *TOMTOM*<sup>31</sup> (Gupta et al., 2007).

La representación de circuitos biológicos sintéticos se realizó en base al lenguaje visual *SBOL*<sup>32</sup> (Baig et al., 2021).

### Visualización y manipulación de proteínas

La visualización y manipulación de secuencias de proteínas se llevó a cabo en *SnapGene*<sup>33</sup> (*Insightful Science*). La visualización y representación de estructuras proteicas tridimensionales se llevó a cabo en *UCSF Chimera*<sup>34</sup> (Pettersen et al., 2004).

<sup>20</sup> <https://www.snapgene.com/>

<sup>21</sup> <https://rna.urmc.rochester.edu/GUI/html/StructureEditor.html>

<sup>22</sup> <https://www.snapgene.com/>

<sup>23</sup> <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

<sup>24</sup> <https://eu.idtdna.com/PrimerQuest>

<sup>25</sup> [http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy\\_scoeli/](http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy_scoeli/)

<sup>26</sup> <http://www.rgenome.net/cas-offinder/>

<sup>27</sup> <https://software.broadinstitute.org/software/igv/>

<sup>28</sup> <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>

<sup>29</sup> <https://meme-suite.org/meme/tools/glam2>

<sup>30</sup> <https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>

<sup>31</sup> <https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>

<sup>32</sup> <https://sbolstandard.org/>

<sup>33</sup> <https://www.snapgene.com/>

<sup>34</sup> <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Análisis de secuencias de proteínas

El análisis de dominios proteicos se realizó con: *InterPro*<sup>35</sup> (Blum et al., 2021), *Pfam*<sup>36</sup> (Mistry et al., 2021), *SMART*<sup>37</sup> (Letunic et al., 2021) y *PROSITE*<sup>38</sup> (Sigrist et al., 2013). El análisis de la topología proteica se llevó a cabo con: *TMHMM-2.0*<sup>39</sup> (Sonnhammer et al., 1998) y *Phobius*<sup>40</sup> (Käll et al., 2004). La predicción de la estructura secundaria proteica se realizó con: *SABLE*<sup>41</sup> (Adamczak et al., 2005), *PSIPRED*<sup>42</sup> (Buchan & Jones, 2019) y *Jpred*<sup>43</sup> (Drozdetskiy et al., 2015).

Los alineamientos para la comparación de secuencias proteicas se desarrollaron en *EMBOSS Needle*<sup>44</sup> (Madeira et al., 2019), mediante un alineamiento global óptimo de dos secuencias a través del algoritmo Needleman-Wunsch, aplicando una matriz de sustitución BLOSUM62.

El análisis filogenético de secuencias proteicas se realizó en *MEGA-X*<sup>45</sup> (Kumar et al., 2018). El análisis de la relación de AbrB1 y reguladores implicados en la resistencia a vancomicina se llevó a cabo mediante el método de máxima verosimilitud aplicando el Modelo Le Gascuel (Le & Gascuel, 2008). El árbol filogenético inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos *neighbor-join* y *BioNJ* a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo JTT. Una distribución Gamma discreta se utilizó para modelizar las diferencias de tasas evolutivas entre los sitios. Se realizó un test *Bootstrap* con 1000 réplicas para evaluar la fiabilidad de los árboles generados.

### Modelización estructural de proteínas y análisis

Se llevó a cabo la modelización estructural por homología del regulador AbrB1 mediante *SWISS-Model*<sup>46</sup> (Waterhouse et al., 2018). Como molde para la modelización del regulador AbrB1 se utilizaron las estructuras de VraR, en el caso del regulador inactivo se empleó la estructura 4GVP, mientras que en el caso del regulador activo se empleó la estructura 4IF4. Los modelos estructurales obtenidos se refinaron y optimizaron mediante *GalaxyRefine2*<sup>47</sup> (Lee et al., 2019). La evaluación de calidad de los modelos se realizó con *MolProbity*<sup>48</sup> (Williams et al., 2018).

La comparación de estructuras tridimensionales se realizó con *FATCAT*<sup>49</sup> (Li, Jaroszewski, et al., 2020).

<sup>35</sup> <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

<sup>36</sup> <http://pfam.xfam.org/>

<sup>37</sup> <https://smart.embl.de/>

<sup>38</sup> <https://prosite.expasy.org/>

<sup>39</sup> <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>

<sup>40</sup> <https://phobius.sbc.su.se/>

<sup>41</sup> <http://sable.cchmc.org/>

<sup>42</sup> <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

<sup>43</sup> <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/>

<sup>44</sup> [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)

<sup>45</sup> <https://www.megasoftware.net/>

<sup>46</sup> <https://swissmodel.expasy.org/>

<sup>47</sup> <https://galaxy.seoklab.org/>

<sup>48</sup> <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

<sup>49</sup> <https://fatcat.godziklab.org/>

### Visualización y manipulación de compuestos químicos

La visualización y manipulación de compuestos químicos se llevó a cabo en *MarvinSketch*<sup>50</sup> (*Chemaxon*).

### Visualización y manipulación de redes

La visualización y manipulación de redes de interacciones biomoleculares se llevó a cabo en *Cytoscape*<sup>51</sup> (Shannon et al., 2003).

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa *SPSS Statistics (IBM)*. Para la comparación de varianzas se aplicó la Prueba de Levene. Para la comparación de medias se aplicó la Prueba T para muestras independientes.

El análisis de componentes principales de las muestras de RNAseq se realizó mediante *RJSplot*<sup>52</sup> (Barrios & Prieto, 2018) en el software *RaNA-Seq* (Prieto & Barrios, 2020).

### Procesamiento y análisis de imágenes

Las fotografías realizadas durante los ensayos se procesaron con *Adobe Photoshop Lightroom*<sup>53</sup> (*Adobe*). El análisis de las imágenes se realizó en *ImageJ*<sup>54</sup> (Schneider et al., 2012).

Para la visualización y procesamiento de las imágenes obtenidas de los geles de agarosa se utilizó el programa *Quantity One (Bio-Rad)*.

### Ofimática

El trabajo ofimático se realizó con el paquete *Microsoft Office 365*<sup>55</sup> (*Microsoft*), *Inkscape*<sup>56</sup> y *Adobe Acrobat DC*<sup>57</sup> (*Adobe*). La gestión de la bibliografía se llevó a cabo con *Mendeley*<sup>58</sup> (*Elsevier*); se ha utilizado el estilo APA 7<sup>o</sup> Edición.

<sup>50</sup> <https://chemaxon.com/products/marvin>

<sup>51</sup> <https://cytoscape.org/>

<sup>52</sup> <https://rjsplot.usal.es/rjsplot.html>

<sup>53</sup> <https://www.adobe.com/es/products/photoshop-lightroom>

<sup>54</sup> <https://imagej.nih.gov/ij/>

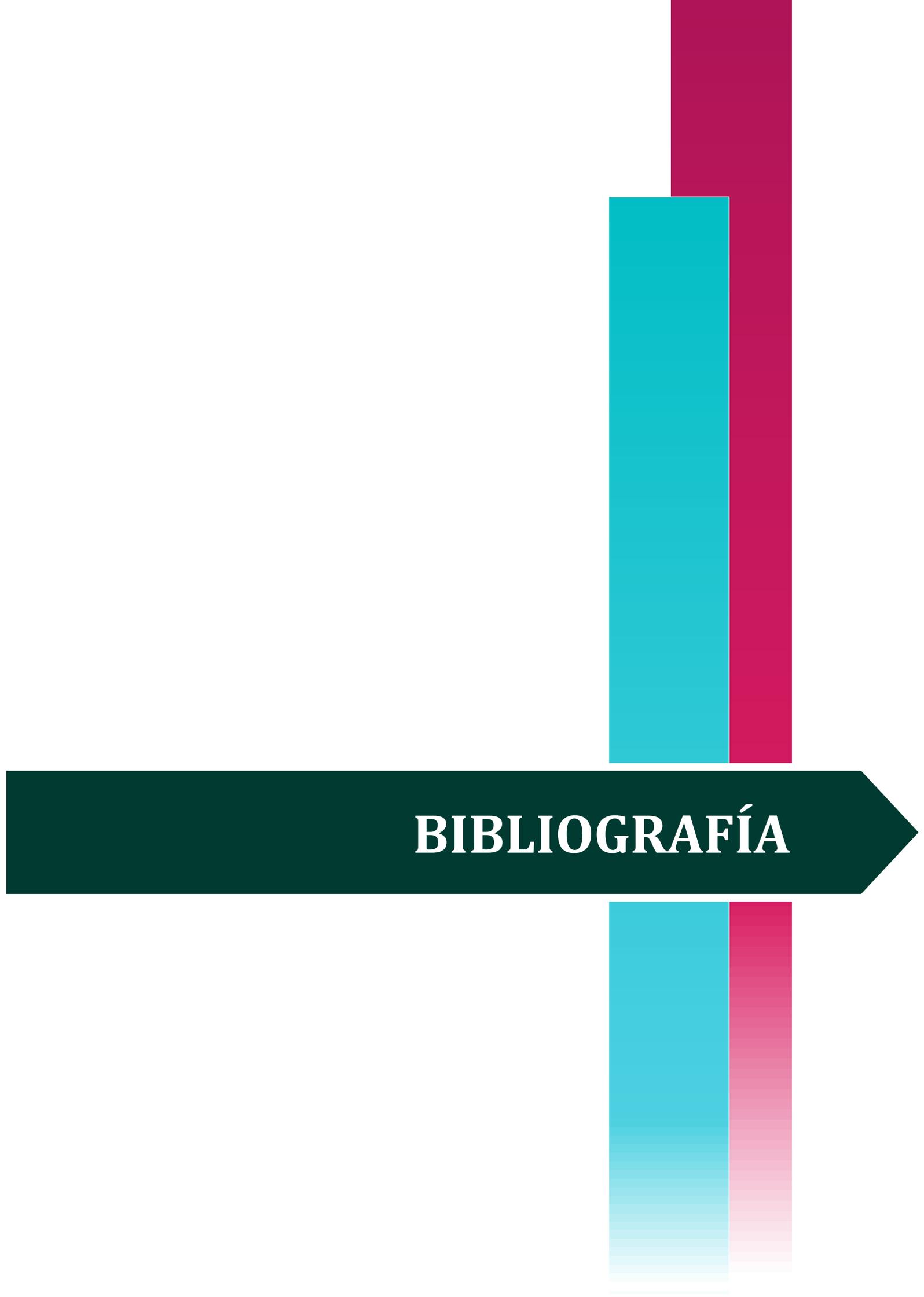
<sup>55</sup> <https://www.microsoft.com/es-es/microsoft-365>

<sup>56</sup> <https://inkscape.org/>

<sup>57</sup> <https://www.adobe.com/es/acrobat.html>

<sup>58</sup> <https://www.mendeley.com/>





# BIBLIOGRAFÍA



- Abrudan, M. I., Smakman, F., Grimbergen, A. J., Westhoff, S., Miller, E. L., van Wezel, G. P., & Rozen, D. E. (2015). Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(35), 11054–11059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504076112>
- Acker, R. F., & Lechevalier, H. (1954). Some nutritional requirements of *Streptomyces griseus* 3570 for growth and candicidin production. *Applied Microbiology*, *2*(3), 152–157. <https://doi.org/10.1128/aem.2.3.152-157.1954>
- Adamczak, R., Porollo, A., & Meller, J. (2005). Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *59*(3), 467–475. <https://doi.org/10.1002/prot.20441>
- Adamidis, T., Riggle, P., & Champness, W. (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotics biosynthesis but not sporulation. *Journal of Bacteriology*, *172*(6), 2962–2969. <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.2962-2969.1990>
- Adham, S. A. I., Campelo, A. B., Ramos, A., & Gil, J. A. (2001). Construction of a Xylanase-Producing Strain of *Brevibacterium lactofermentum* by Stable Integration of an Engineered *xysA* Gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(12), 5425–5430. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5425-5430.2001>
- Aínsa, J. A., Parry, H. D., & Chater, K. F. (1999). A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *34*(3), 607–619. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01630.x>
- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sánchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(4). <https://doi.org/10.1128/mmb.00044-16>
- Al-Bassam, M. M., Bibb, M. J., Bush, M. J., Chandra, G., & Buttner, M. J. (2014). Response Regulator Heterodimer Formation Controls a Key Stage in *Streptomyces* Development. *PLoS Genetics*, *10*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004554>
- Allenby, N. E. E., Laing, E., Bucca, G., Kierzek, A. M., & 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 Research*, *40*(19), 9543–9556. <https://doi.org/10.1093/nar/gks766>
- Álvarez, A. F., Barba-Ostria, C., Silva-Jiménez, H., & Georgellis, D. (2016). Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environmental Microbiology*, *18*(10), 3210–3226. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13397>
- Amin, R., Franz-Wachtel, M., Tiffert, Y., Heberer, M., Meko, M., Ahmed, Y., Matthews, A., Krysenko, S., Jakobi, M., Hinder, M., Moore, J., Okoniewski, N., Macek, B., Wohlleben, W., & Bera, A. (2016). Post-translational serine/threonine phosphorylation and lysine acetylation: A novel regulatory aspect of the global nitrogen response regulator GlnR in *S. coelicolor* M145. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *3*(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00038>
- Amin, R., Reuther, J., Bera, A., Wohlleben, W., & Mast, Y. (2012). A novel GlnR target gene, *nnar*, is involved in nitrate/nitrite assimilation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, *158*(5), 1172–1182. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054817-0>
- Anderson, T. B., Brian, P., & Champness, W. C. (2001). Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *39*(3), 553–566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02240.x>
- Anderson, T. B., Brian, P., Riggle, P., Kong, R., & Champness, W. (1999). Genetic suppression analysis of non-antibiotic-producing mutants of the *Streptomyces coelicolor absA* locus. *Microbiology*, *145*(9), 2343–2353. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2343>
- Antoraz, S. (2018). Mejora genética de cepas de *Streptomyces coelicolor* para la producción de metabolitos secundarios mediante el estudio de su regulación por sistemas de dos componentes [Tesis Doctoral]. Universidad de Salamanca.
- Antoraz, S., Rico, S., Rodríguez, H., Sevillano, L., Alzate, J. F., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2017). The orphan response regulator Aor1 is a new relevant piece in the complex puzzle of *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory network. *Frontiers in Microbiology*, *8*(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02444>
- Antoraz, S., Santamaría, R. I., Díaz, M., Sanz, D., & Rodríguez, H. (2015). Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00461>

## BIBLIOGRAFÍA

- Apel, A. K., Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., & Martín, J. F. (2007). Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology*, *153*(10), 3527–3537. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007070-0>
- Appleman, J. A., Chen, L. L., & Stewart, V. (2003). Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *Journal of Bacteriology*, *185*(16), 4872–4882. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4872-4882.2003>
- Arcamone, F., Cansinelli, G., Franceschi, G., Orezzi, P., & Mondelli, R. (1968). The total absolute configuration of daunomycin. *Tetrahedron Letters*, *9*(30), 3353–3356. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)89490-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)89490-3)
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, *11*, 1101–1110. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000320\)67:6<704::aid-bit8>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000320)67:6<704::aid-bit8>3.0.co;2-l)
- Arroyo-Pérez, E. E., González-Cerón, G., Soberón-Chávez, G., Georgellis, D., & Servín-González, L. (2019). A novel two-component system, encoded by the *sco5282/sco5283* genes, affects *Streptomyces coelicolor* morphology in liquid culture. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JULY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01568>
- Bae, S., Park, J., & Kim, J. S. (2014). Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, *30*(10), 1473–1475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu048>
- Bai, C., Zhang, Y., Zhao, X., Hu, Y., Xiang, S., Miao, J., Lou, C., Zhang, L., & Demain, A. L. (2015). Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(39), 12181–12186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511027112>
- Baig, H., Fontanarossa, P., McLaughlin, J., Scott-Brown, J., Vaidyanathan, P., Gorochoowski, T., Misirli, G., Beal, J., & Myers, C. (2021). Synthetic biology open language visual (SBOL visual) version 3.0. In *Journal of integrative bioinformatics*, *18*(3). <https://doi.org/10.1515/jib-2021-0013>
- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, *2*, 28–36.
- Balewski, J., & Hallberg, Z. (2019). Accurate prediction of bacterial two-component signaling with a deep recurrent neural network ORAKLE. *BioRxiv*, 532721.
- Baltz, R. H. (2006). Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *33*(7), 507–513. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9>
- Barakat, M., Ortet, P., & Whitworth, D. E. (2013). P2RP: A web-based framework for the identification and analysis of regulatory proteins in prokaryotic genomes. *BMC Genomics*, *14*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-269>
- Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A. E., Derrick, P. J., & Challis, G. L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(50), 16282–16283. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>
- Barreiro, C., & Martínez-Castro, M. (2019). Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(4), 1643–1658. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09600-2>
- Barrios, D., & Prieto, C. (2018). RJSplot: Interactive Graphs with R. *Molecular Informatics*, *37*(3), 2–5. <https://doi.org/10.1002/minf.201700090>
- Bateman, A., Martín, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Silva, A. Da, Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Castro, L. G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Baumgartner, J. W., Kim, C., Brissette, R. E., Inouye, M., Park, C., & Hazelbauer, G. L. (1994). Transmembrane signalling by a hybrid protein: Communication from the domain of chemoreceptor Trg that recognizes sugar-binding proteins to the kinase/phosphatase domain of osmosensor EnvZ. *Journal of Bacteriology*, *176*(4), 1157–1163. <https://doi.org/10.1128/jb.176.4.1157-1163.1994>
- Becerril, A., Álvarez, S., Braña, A. F., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R. I., Salas, J. A., & Méndez, C. (2018). Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *PLoS ONE*, *13*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198145>

- Bednarz, B., Kotowska, M., & Pawlik, K. J. (2019). Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6423–6434. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09975-w>
- Beier, D. (2012). Deviations From the Rule: Orphan and Atypical Response Regulators. In R. Gross & D. Beier (Eds.), *Two-Component System in Bacteria*. Caister Academic Press.
- Bekker, M., Teixeira de Mattos, M. J., & Hellingwerf, K. J. (2007). The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Science Progress*, 89 (3/4), 213–242. <https://doi.org/10.3184/003685006783238308>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- 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., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothaft, H., Saier, M. H., & Titgemeyer, F. (2004). In Silico and Transcriptional Analysis of Carbohydrate Uptake Systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1362–1373. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1362-1373.2004>
- Bi, S., Pollard, A. M., Yang, Y., Jin, F., & Sourjik, V. (2016). Engineering Hybrid Chemotaxis Receptors in Bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 5(9), 989–1001. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00053>
- Bianchi, A. A., & Baneyx, F. (1999). Stress responses as a tool to detect and characterize the mode of action of antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5023–5027. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.5023-5027.1999>
- Bibb, M. J., Janssen, G. R., & Ward, J. M. (1985). Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38, 215–226. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90220-3)
- Bibb, M. J., Ward, J. M., & Hopwood, D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, 274(5669), 398–400. <https://doi.org/10.1038/274398a0>
- Bibb, M., Molle, V., & Buttner, M. J. (2000).  $\sigma$ BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4606–4616. <https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4606-4616.2000>
- Bilyk, O., Sekurova, O. N., Zotchev, S. B., & Luzhetskyy, A. (2016). Cloning and heterologous expression of the grecoacycline biosynthetic gene cluster. *PLoS ONE*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158682>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1524. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., & Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: A link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Research*, 14(5), 893–900. <https://doi.org/10.1101/gr.1710304>
- Blomgren, H., Strender, L. E., & Edsmyr, F. (1980). Bestatin treatment and the peripheral lymphocyte population in cancer patients. *Recent Results of Cancer Research*, 75, 133–138. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-81491-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-642-81491-4_21)
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
- Bobek, J., Šmídová, K., & Čihák, M. (2017). A waking review: Old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02205>
- Bonet, B., Teufel, R., Crüsemann, M., Ziemert, N., & Moore, B. S. (2015). Direct capture and heterologous expression of *Salinispora* natural product genes for the biosynthesis of enterocin. *Journal of Natural Products*, 78(3), 539–542. <https://doi.org/10.1021/np500664q>
- Boyle-Vavra, S., Yin, S., Jo, D. S., Montgomery, C. P., & Daum, R. S. (2013). VraT/YvqF is required for methicillin resistance and activation of the VraSR regulon in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 83–95. <https://doi.org/10.1128/AAC.01651-12>

## BIBLIOGRAFÍA

- Brian, P., Riggle, P. J., Santos, R. A., & Champness, W. C. (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *Journal of Bacteriology*, *178*(11), 3221–3231. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3221-3231.1996>
- Brown, J. H., & Kennedy, B. J. (1965). Mithramycin in the treatment of disseminated testicular neoplasms. *New England Journal of Medicine*, *272*(3), 111–118. <https://doi.org/10.1056/NEJM196501212720301>
- Buchan, D. W. A., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W402–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
- Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, F., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y. L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R., & Omura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *15*(3), 361–367. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>
- Burger, L., & Van Nimwegen, E. (2008). Accurate prediction of protein-protein interactions from sequence alignments using a Bayesian method. *Molecular Systems Biology*, *4*(165). <https://doi.org/10.1038/msb4100203>
- Busche, T., Winkler, A., Wedderhoff, I., Rückert, C., Kalinowski, J., & Ortiz de Orué Lucana, D. (2016). Deciphering the transcriptional response mediated by the redox-sensing system HbpS-SenS-SenR from streptomycetes. *PLoS ONE*, *11*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159873>
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019). Two-component sensing and regulation: How do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level? *Annual Review of Microbiology*, *73*, 507–528. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>
- Bush, M. J., Chandra, G., Findlay, K. C., & Buttner, M. J. (2017). Multi-layered inhibition of *Streptomyces* development: BldO is a dedicated repressor of *whiB*. *Molecular Microbiology*, *104*(5), 700–711. <https://doi.org/10.1111/mmi.13663>
- Bush, M. J., Tschowri, N., Schlimpert, S., Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2015). C-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(12), 749–760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3546>
- Bystrykh, L. V., Fernández-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., & Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *178*(8), 2238–2244. <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2238-2244.1996>
- Capstick, D. S., Willey, J. M., Buttner, M. J., & Elliot, M. A. (2007). SapB and the chaplins: Connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *64*(3), 602–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05674.x>
- Carbon, S., Douglass, E., Good, B. M., Unni, D. R., Harris, N. L., Mungall, C. J., Basu, S., Chisholm, R. L., Dodson, R. J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P. D., Albou, L. P., Ebert, D., Kesling, M. J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Mushayahama, T., ... Elser, J. (2021). The Gene Ontology resource: Enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D325–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2020). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes, a 2019 update. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D455–D453. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>
- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019. In *Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services*. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Cerdeño, A. M., Bibb, M. J., & Challis, G. L. (2001). Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): New mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry and Biology*, *8*(8), 817–829. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00054-0)
- Chakraborty, R., & Bibb, M. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology*, *179*(18), 5854–5861. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5854-5861.1997>
- Chang, H. M., Chen, M. Y., Shieh, Y. T., Bibb, M. J., & Chen, C. W. (1996). The CutRS Signal Transduction System of *Streptomyces lividans* Represses the Biosynthesis of the Polyketide Antibiotic Actinorhodin. *Molecular Microbiology*, *21*(5), 1075–1085.
- Chater, K. F. (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, *72*(1), 9–28. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-1-9>
- Chater, K. F. (1975). Construction and phenotypes of double sporulation deficient mutants in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, *87*(2), 312–325. <https://doi.org/10.1099/00221287-87-2-312>

- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5(0), 1–16. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9534.1>
- Chen, Y., Krol, J., Sterkin, V., Fan, W., Yan, X., Huang, W., Cino, J., & Julien, C. (1999). New process control strategy used in a rapamycin fermentation. *Process Biochemistry*, 34(4), 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00108-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00108-3)
- Chen, S., Zheng, G., Zhu, H., He, H., Chen, L., Zhang, W., Jiang, W., & Lu, Y. (2016). Roles of two-component system AfsQ1/Q2 in regulating biosynthesis of the yellow-pigmented coelimycin P2 in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 363(15), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw160>
- Chen, H., Xiong, Z., Liu, K., Li, S., Wang, R., Wang, X., Zhang, Y., & Wang, H. (2016). Transcriptional profiling of the two-component regulatory system VraSR in *Staphylococcus aureus* with low-level vancomycin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(5), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.003>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., Book, A. J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanagan, W., Grubbs, K. J., Horn, H. A., Hoffmann, F. M., Klassen, J. L., Knack, J. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Muller, L., Melo, W. G. P., ... Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
- Coates, A. R., Halls, G., & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Collins, M. J., & Childers, W. S. (2021). The upcycled roles of pseudoenzymes in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 61, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.03.006>
- Combes, P., Till, R., Bee, S., & Smith, M. C. M. (2002). The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the  $\phi$ C31-encoded site-specific recombination system. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5746–5752. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5746-5752.2002>
- Condon, J. R., Reith, S. B., Nassim, J. R., Millard, F. J., Hilb, A., & Stainthorpe, E. M. (1971). Treatment of Paget's disease of bone with mithramycin. *British Medical Journal*, 1(5746), 421–423. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5746.421>
- Corre, C., Song, L., O'Rourke, S., Chater, K. F., & Challis, G. L. (2008). 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17510–17515. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805530105>
- Crack, J. C., Munnoch, J., Dodd, E. L., Knowles, F., Al Bassam, M. M., Kamali, S., Holland, A. A., Cramer, S. P., Hamilton, C. J., Johnson, M. K., Thomson, A. J., Hutchings, M. I., & Le Brun, N. E. (2015). NsrR from *Streptomyces coelicolor* is a nitric oxide-sensing [4Fe-4S] cluster protein with a specialized regulatory function. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12689–12704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643072>
- Craney, A., Hohenauer, T., Xu, Y., Navani, N. K., Li, Y., & Nodwell, J. (2007). A synthetic *luxCDABE* gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria. *Nucleic Acids Research*, 35(6), 1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm086>
- Currie, C. R., Bot, A. N. M., & Boomsma, J. J. (2003). Experimental evidence of a tripartite mutualism: Bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, 101(1), 91–102. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12036.x>
- Currie, C. R., Scottt, J. A., Summerbell, R. C., & Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398(6729), 701–704. <https://doi.org/10.1038/19519>
- Dalisay, D. S., Williams, D. E., Wang, X. L., Centko, R., Chen, J., & Andersen, R. J. (2013). Marine Sediment-Derived *Streptomyces* Bacteria from British Columbia, Canada Are a Promising Microbiota Resource for the Discovery of Antimicrobial Natural Products. *PLoS ONE*, 8(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077078>
- Dalton, K. A., Thibessard, A., Hunter, J. I. B., & Kelemen, G. H. (2007). A novel compartment, the “subapical stem” of the aerial hyphae, is the location of a sigN-dependent, developmentally distinct transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 64(3), 719–737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05684.x>
- Darbon, E., Martel, C., Nowacka, A., Pegot, S., Moreau, P. L., & Viroille, M. J. (2012). Transcriptional and preliminary functional analysis of the six genes located in divergence of *phoR/phoP* in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1553–1566. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3995-2>
- Darken, M. A., Berenson, H., Shirk, R. J., & Sjolander, N. O. (1960). Production of tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in synthetic media. *Applied Microbiology*, 8(1954), 46–51. <https://doi.org/10.1128/am.8.1.46-51.1960>

## BIBLIOGRAFÍA

- Davlieva, M., Shi, Y., Leonard, P. G., Johnson, T. A., Zianni, M. R., Arias, C. A., Ladbury, J. E., & Shamoo, Y. (2015). A variable DNA recognition site organization establishes the LiaR-mediated cell envelope stress response of enterococci to daptomycin. *Nucleic Acids Research*, *43*(9), 4758–4773. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv321>
- Davlieva, M., Tovar-Yanez, A., Debruler, K., Leonard, P. G., Zianni, M. R., Arias, C. A., & Shamoo, Y. (2016). An adaptive mutation in *Enterococcus faecium* LiaR associated with antimicrobial peptide resistance mimics phosphorylation and stabilizes LiaR in an activated state. *Journal of Molecular Biology*, *428*(22), 4503–4519. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.09.016>
- De Jong, W., Manteca, A., Sánchez, J., Bucca, G., Smith, C. P., Dijkhuizen, L., Claessen, D., & Wösten, H. A. B. (2009). NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *71*(6), 1591–1603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06633.x>
- Donaldson, L. W. (2008). The NMR structure of the *Staphylococcus aureus* response regulator VraR DNA binding domain reveals a dynamic relationship between it and its associated receiver domain. *Biochemistry*, *47*(11), 3379–3388. <https://doi.org/10.1021/bi701844q>
- Draper, L. A., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2015). Lantibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(2), 171–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-14>
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), 389–394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- Dulmage, H. T. (1953). The production of neomycin by *Streptomyces fradiae* in synthetic media. *Applied Microbiology*, *1*(2), 103–106. <https://doi.org/10.1128/aem.1.2.103-106.1953>
- ECDC. (2020). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report for 2019. In *European Centre for Disease Prevention and Control*.
- ECDC. (2022). Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2022 (2020 Data). In *European Centre for Disease Prevention and Control*. <https://doi.org/10.2900/112339>
- Elso, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., & Handman, E. (2004). Leishmaniasis host response loci (*Imr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity*, *5*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364042>
- Ezraty, B., & Barras, F. (2016). The “liaisons dangereuses” between iron and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(3), 418–435. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw004>
- Feitelson, J. S., Malpartida, F., & Hopwood, D. a. (1985). Genetic and Biochemical Characterization of the *red* Gene Cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, *131*(2), 2431–2441. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2431>
- Feng, X., Baumgartner, J. W., & Hazelbauer, G. L. (1997). High- and low-abundance chemoreceptors in *Escherichia coli*: Differential activities associated with closely related cytoplasmic domains. *Journal of Bacteriology*, *179*(21), 6714–6720. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6714-6720.1997>
- Fernández-Ábalos, J. M., Reviejo, V., Díaz, M., Rodríguez, S., Leal, F., & Santamaría, R. I. (2003). Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology*, *149*(7), 1623–1632. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26113-0>
- Fernández-Martínez, L., Bishop, A., Parkes, L., Del Sol, R., Salerno, P., Sevcikova, B., Mazurakova, V., Kormanec, J., & Dyson, P. (2009). Osmoregulation in *Streptomyces coelicolor*: Modulation of SigB activity by OsaC. *Molecular Microbiology*, *71*(5), 1250–1262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06599.x>
- Fernández-Martínez, L., Santos-Beneit, F., & Martín, J. F. (2012). Is PhoR-PhoP partner fidelity strict? PhoR is required for the activation of the pho regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Genetics and Genomics*, *287*(7), 565–573. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0698-4>
- Fernández-Moreno, M. A., Martínez, E., Boto, L., Hopwood, D. A., & Malpartida, F. (1992). Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(27), 19278–19290. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)41772-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)41772-3)
- Fink, D., Weißschuh, N., Reuther, J., Wohlleben, W., & Engels, A. (2002). Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *46*(2), 331–347. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03150.x>
- Finney, J. L., Gellatly, B. J., Golton, I. C., & Goodfellow, J. (1980). Solvent effects and polar interactions in the structural stability and dynamics of globular proteins. *Biophysical Journal*, *32*(1), 17–33. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(80\)84913-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)84913-7)

- Fischer, M., Falke, D., Ronitz, J., Haase, A., Damelang, T., Pawlik, T., & Sawers, R. G. (2019). Hypoxia-induced synthesis of respiratory nitrate reductase 2 of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on the histidine kinase OsdK in mycelium but not in spores. *Microbiology*, *165*(8), 905–916. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000829>
- Flårdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>
- Flårdh, K., Richards, D. M., Hempel, A. M., Howard, M., & Buttner, M. J. (2012). Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(6), 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.10.012>
- Flett, F., Mersinias, V., & Smith, C. P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, *155*(2), 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00392-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00392-3)
- Floriano, B., & Bibb, M. (1996). *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *21*(2), 385–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6491364.x>
- Frith, M. C., Saunders, N. F. W., Kobe, B., & Bailey, T. L. (2008). Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Computational Biology*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>
- Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, *188*(12), 4169–4182. <https://doi.org/10.1128/JB.01887-05>
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
- Ganesh, I., Kim, T. W., Na, J. G., Eom, G. T., & Hong, S. H. (2019). Engineering *Escherichia coli* to Sense Non-native Environmental Stimuli: Synthetic Chimera Two-component Systems. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *24*(1), 12–22. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0252-2>
- Ganesh, I., Ravikumar, S., Lee, S. H., Park, S. J., & Hong, S. H. (2013). Engineered fumarate sensing *Escherichia coli* based on novel chimeric two-component system. *Journal of Biotechnology*, *168*(4), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.003>
- Ganesh, I., Ravikumar, S., Yoo, I. K., & Hong, S. H. (2015). Construction of malate-sensing *Escherichia coli* by introduction of a novel chimeric two-component system. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(4), 797–804. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1321-3>
- Ganesh, I., Vidhya, S., Eom, G. T., & Hong, S. H. (2017). Construction of methanol-sensing *Escherichia coli* by the introduction of a *Paracoccus denitrificans* MxaY-based chimeric two-component system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(6), 1106–1111. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11070>
- Gao, Y., Jia, Z., Kong, X., Li, Q., Chang, D. Z., Wei, D., Le, X., Huang, S., Wang, L., & Xie, K. (2011). Combining betulonic acid and mithramycin A effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. *Cancer Research*, *71*(15), 5182–5193. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2016>
- Gardete, S., Wu, S. W., Gill, S., & Tomasz, A. (2006). Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(10), 3424–3434. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-06>
- Gaskell, A. A., Crack, J. C., Kelemen, G. H., Hutchings, M. I., & Le Brun, N. E. (2007). RsmA is an anti-sigma factor that modulates its activity through a [2Fe-2S] cluster cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(43), 31812–31820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705160200>
- Gehring, A. M., Wang, S. T., Kearns, D. B., Storer, N. Y., & Losick, R. (2004). Novel genes that influence development in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *186*(11), 3570–3577. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3570-3577.2004>
- Gómez-Escribano, J. P., Song, L., Fox, D. J., Yeo, V., Bibb, M. J., & Challis, G. L. (2012). Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the *cpk* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chemical Science*, *3*(9), 2716–2720. <https://doi.org/10.1039/c2sc20410j>
- Gongrowska-Jac, M., Szafran, M. J., Mikołajczyk, J., Szymczak, J., Bartyńska, M., Gierlikowska, A., Biały, S., Elliot, M. A., & Jakimowicz, D. (2021). Global Chromosome Topology and the Two-Component Systems in Concerted Manner Regulate Transcription in *Streptomyces*. *MSystems*, *6*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1128/msystems.01142-21>

## BIBLIOGRAFÍA

- González-Cerón, G., Licona, P., & Servín-González, L. (2001). Modified *xylE* and *xylTE* reporter genes for use in *Streptomyces*: Analysis of the effect of *xylT*. *FEMS Microbiology Letters*, *196*(2), 229–234. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00073-8)
- González-Quiñonez, N., López-García, M. T., Yagüe, P., Rioseras, B., Pisciotta, A., Alduina, R., & Manteca, Á. (2016). New  $\Phi$ BT1 site-specific integrative vectors with neutral phenotype in *Streptomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(6), 2797–2808. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7271-0>
- González, A., Jiménez, A., Vázquez, D., Davies, J. E., & Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *521*(2), 459–469. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90287-3](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90287-3)
- Gottelt, M., Kol, S., Gómez-Escribano, J. P., Bibb, M., & Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, *156*(8), 2343–2353. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038281-0>
- Grant, C. E., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2011). FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, *27*(7), 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Groisman, E. A. (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Microbiology*, *70*, 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
- Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., & van Wezel, G. P. (2012). Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Molecular Microbiology*, *86*(6), 1490–1507. <https://doi.org/10.1111/mmi.12072>
- Gullón, S., Vicente, R. L., & Mellado, R. P. (2012). A Novel Two-Component System Involved in Secretion Stress Response in *Streptomyces lividans*. *PLoS ONE*, *7*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048987>
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, *8*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24>
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(4), 1541–1546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337542100>
- Guthrie, E. P., Flaxman, C. S., White, J., Hodgson, D. A., Bibb, M. J., & 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*(3), 727–738. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-727>
- Guy, H. R. (1985). Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins. *Biophysical Journal*, *47*(1), 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83877-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83877-7)
- Hahn, J. S., Oh, S. Y., & Roe, J. H. (2002). Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *184*(19), 5214–5222. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5214-5222.2002>
- Hamed, M. B., Vrancken, K., Bilyk, B., Koepff, J., Novakova, R., Van Mellaert, L., Oldiges, M., Luzhetskyy, A., Kormanec, J., Anné, J., Karamanou, S., & Economou, A. (2018). Monitoring protein secretion in *Streptomyces* using fluorescent proteins. *Frontiers in Microbiology*, *9*(12), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03019>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hata, T., Koga, F., & Kanamori, H. (1953). Studies on leucomycin. II. Bacteriological properties of *Streptomyces kitasatoensis*. *Journal of Antibiotics*, *6*(3), 109–112.
- Heinemann, B., Kaplan, M. A., Muir, R. D., & Hooper, I. R. (1953). Amphomycin, a new antibiotic. *Antibiotics and Chemotherapy*, *3*(12), 1239–1242.
- 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., & Flärdh, K. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1207409109>
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, *186*(20), 6902–6914. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6902-6914.2004>

- Hesketh, A., Chen, W. J., Ryding, J., Chang, S., & Bibb, M. (2007). The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biology*, 8(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r161>
- Hindra, P. P., & Elliot, M. A. (2010). Regulation of a novel gene cluster involved in secondary metabolite production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4973–4982. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-10>
- Hodge, D. R., Thompson, D. M., Panayiotakis, A., & Seth, A. (1995). Transcriptional activation analysis by the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) enzyme assay. In M. J. Tymms (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, 37(28), 409–421. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-288-4:409>
- Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P. J., Rudd, B. A. M., Hayes, M. A., Smith, C. P., & Micklefield, J. (2002). Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chemistry and Biology*, 9(11), 1175–1187. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00252-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00252-1)
- Homerová, D., Knirschová, R., & Kormanec, J. (2002). Response regulator ChiR regulates expression of chitinase gene, *chiC*, in *Streptomyces coelicolor*. *Folia Microbiologica*, 47(5), 499–505. <https://doi.org/10.1007/BF02818788>
- Hong, H. J. (2016). Construction of a bioassay system to identify extracellular agents targeting bacterial cell envelope. *Methods in Molecular Biology*, 1440, 125–137. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3676-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3676-2_10)
- Hong, H. J., Hutchings, M. I., Hill, L. M., & Buttner, M. J. (2005). The role of the novel fem protein VanK in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13055–13061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413801200>
- Hong, H. J., Hutchings, M. I., Neu, J. M., Wright, G. D., Paget, M. S. B., & Buttner, M. J. (2004). Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. *Molecular Microbiology*, 52(4), 1107–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04032.x>
- Hong, H. J., Paget, M. S. B., & Buttner, M. J. (2002). A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Molecular Microbiology*, 44(5), 1199–1211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02960.x>
- Honma, S., Lto, S., Yajima, S., & Sasaki, Y. (2021). Nitric Oxide Signaling for Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) via the DevS/R Two-Component System. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-21>
- Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: From *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology*, 145(9), 2183–2202. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2183>
- Hopwood, D. A. (2006). Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annual Review of Genetics*, 40, 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090639>
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., & Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. The John Innes Foundation.
- Hopwood, D. A., Wildermuth, H., & Palmer, H. M. (1970). Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *Journal of General Microbiology*, 61, 397–408. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-3-397>
- Hopwood, D. A., & Wright, H. M. (1983). CDA is a new chromosomally-determined antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 129(12), 3575–3579. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-12-3575>
- Horbal, L., Siegl, T., & Luzhetskyy, A. (2018). A set of synthetic versatile genetic control elements for the efficient expression of genes in Actinobacteria. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18846-1>
- Hori, M., Oka, S., Sugie, Y., Ohtsuka, H., & Aiba, H. (2017). Construction of a photo-responsive chimeric histidine kinase in *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 63(1), 44–50. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.07.005>
- Hörnschemeyer, P., Liss, V., Heermann, R., Jung, K., & Hunke, S. (2016). Interaction analysis of a two-component system using nanodiscs. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149187>
- Hover, B. M., Kim, S. H., Katz, M., Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Ternei, M. A., Maniko, J., Estrela, A. B., Molina, H., Park, S., Perlin, D. S., & Brady, S. F. (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nature Microbiology*, 3(4), 415–422. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0110-1>
- Howell, M., & Brown, P. J. (2016). Building the bacterial cell wall at the pole. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.021>

## BIBLIOGRAFÍA

- Huang, H., Zheng, G., Jiang, W., Hu, H., & Lu, Y. (2015). One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(4), 231–243. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv007>
- Hulcr, J., Adams, A. S., Raffa, K., Hofstetter, R. W., Klepzig, K. D., & Currie, C. R. (2011). Presence and Diversity of *Streptomyces* in *Dendroctonus* and Sympatric Bark Beetle Galleries Across North America. *Microbial Ecology*, 61(4), 759–768. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9797-0>
- Hussain, R., Harding, S. E., Hughes, C. S., Ma, P., Patching, S. G., Edara, S., Siligardi, G., Henderson, P. J. F., & Phillips-Jones, M. K. (2016). Purification of bacterial membrane sensor kinases and biophysical methods for determination of their ligand and inhibitor interactions. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 810–823. <https://doi.org/10.1042/BST20160023>
- Hutchings, M. I., Hong, H. J., & Buttner, M. J. (2006). The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 59(3), 923–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04953.x>
- Hutchings, M. I., Hong, H. J., Leibovitz, E., Sutcliffe, I. C., & Buttner, M. J. (2006). The  $\sigma$ E cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7222–7229. <https://doi.org/10.1128/JB.00818-06>
- Hutchings, M. I., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Idowu, G. A. (2017). Investigations into the biosynthesis and mode of action of methylenomycin antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) [Tesis Doctoral]. University of Warwick.
- Inaba, Y., Morioka, R., Junaid, M., Shiraiwa, Y., & Suzuki, I. (2018). Development of engineered sensor perceiving gaseous toluene signal in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1277-1>
- Inahashi, Y., Shiraiishi, T., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Kuzuyama, T., & Nakashima, T. (2018). Identification and heterologous expression of the actinoallolide biosynthetic gene cluster. *Journal of Antibiotics*, 71(8), 749–752. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0057-8>
- Ingram, C., Brawner, M., Youngman, P., & Westpheling, J. (1989). *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: Use for the study of *galP1*, a catabolite-controlled promoter. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6617–6624. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6617-6624.1989>
- Iqbal, H. A., Low-Beinart, L., Obiajulu, J. U., & Brady, S. F. (2016). Natural Product Discovery through Improved Functional Metagenomics in *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society*, 138(30), 9341–9344. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02921>
- Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A., & Beppu, T. (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *Journal of Bacteriology*, 174(23), 7585–7594. <https://doi.org/10.1128/jb.174.23.7585-7594.1992>
- Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y., & Suzuki, S. (1965). Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Isolation and characterization of Polyoxins A and B. *Agricultural and Biological Chemistry*, 29(9), 848–854. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858475>
- Iwasa, T., Yamamoto, H., & Shibata, M. (1970). Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism. *Journal of Antibiotics*, 23(12), 595–602.
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J. M., & Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 585–593. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0055-7>
- Jakimowicz, D., & van Wezel, G. P. (2012). Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: How to build a septum in the middle of nowhere? *Molecular Microbiology*, 85(3), 393–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08107.x>
- Janison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science*, 263(March), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6, 1–17. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Jiang, G., Zhang, Y., Powell, M. M., Zhang, P., Zuo, R., Zhang, Y., Kallifidas, D., Tieu, A. M., Luesch, H., Loria, R., & Ding, Y. (2018). High-Yield Production of Herbicidal Thaxtomins and Thaxtomin Analogs in a Nonpathogenic *Streptomyces* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(11), e00164–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00164-18>

- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J. D., & Mascher, T. (2006). Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: Identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *Journal of Bacteriology*, *188*(14), 5153–5166. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-06>
- Junaid, M., Inaba, Y., Otero, A., & Suzuki, I. (2021). Development of a reversible regulatory system for gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by quorum-sensing machinery from marine bacteria. *Journal of Applied Phycology*, *33*(3), 1651–1662. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02397-0>
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, *338*(5), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016>
- Kämpfer, P. (2015). *Streptomyces*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00191>.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., & Tanabe, M. (2021). KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D545–D551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>
- Kang, H. S., & Kim, E. S. (2021). Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts. *Current Opinion in Biotechnology*, *69*, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.016>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, *33*, 300–305. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)
- Karp, P. D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C. A., Latendresse, M., Kothari, A., Keseler, I. M., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, Q., Ong, W. K., Paley, S. M., & Subhraveti, P. (2018). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., Van Der Hooft, J. J. J., Van Santen, J. A., Tracanna, V., Suarez Duran, H. G., Pascal Andreu, V., Selem-Mojica, N., Alanjary, M., Robinson, S. L., Lund, G., Epstein, S. C., Sisto, A. C., Charkoudian, L. K., Collemare, J., Linington, R. G., ... Medema, M. H. (2020). MIBiG 2.0: A repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D454–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>
- Kennedy, B. J., & Torkelson, J. L. (1995). Long-Term Follow-Up of Stage III Testicular Carcinoma Treated With Mithramycin (Plicamycin). *Medical and Pediatric Oncology*, *24*(5), 327–328. <https://doi.org/10.1002/mpo.2950240511>
- Kepplinger, B., Morton-Laing, S., Seistrup, K. H., Marrs, E. C. L., Hopkins, A. P., Perry, J. D., Strahl, H., Hall, M. J., Errington, J., & Ellis Allenby, N. E. (2018). Mode of Action and Heterologous Expression of the Natural Product Antibiotic Vancocresmycin. *ACS Chemical Biology*, *13*(1), 207–214. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00733>
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Kirby, R., Sangal, V., Tucker, N. P., Zakrzewska-Czerwińska, J., Wierzbicka, K., Herron, P. R., Chu, C. J., Chandra, G., Fahal, A. H., Goodfellow, M., & Hoskisson, P. A. (2012). Draft genome sequence of the human pathogen *Streptomyces somaliensis*, a significant cause of actinomycetoma. *Journal of Bacteriology*, *194*(13), 3544–3545. <https://doi.org/10.1128/JB.00534-12>
- Klinzing, D. C., Ishmael, N., Dunning Hotopp, J. C., Tettelin, H., Shields, K. R., Madoff, L. C., & Puopolo, K. M. (2013). The two-component response regulator LiaR regulates cell wall stress responses, pili expression and virulence in group B *Streptococcus*. *Microbiology (United Kingdom)*, *159*(PART7), 1521–1534. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064444-0>
- Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R., & Willey, J. M. (2004). The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *rams* in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(31), 11448–11453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404220101>

## BIBLIOGRAFÍA

- Komatsu, M., Takano, H., Hiratsuka, T., Ishigaki, Y., Shimada, K., Beppu, T., & Ueda, K. (2006). Proteins encoded by the conserved of *Streptomyces coelicolor* A3(2) comprise a membrane-associated heterocomplex that resembles eukaryotic G protein-coupled regulatory system. *Molecular Microbiology*, 62(6), 1534–1546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05461.x>
- Kominek, L. A. (1972). Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1(2), 123–134. <https://doi.org/10.1128/AAC.1.2.123>
- Kominek, L. A. (1975). Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(6), 856–860. <https://doi.org/10.1128/AAC.7.6.856>
- Kormanec, J., & Sevcikova, B. (2000). Identification and transcriptional analysis of a cold shock-inducible gene, *cspA*, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular and General Genetics*, 264(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s004380000298>
- Kormanec, J., Ševčíková, B., & Homérová, D. (2000). Cloning of a two-component regulatory system probably involved in the regulation of chitinase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Folia Microbiologica*, 45(5), 397–406. <https://doi.org/10.1007/BF02817612>
- Koteva, K., Hong, H. J., Wang, X. D., Nazi, I., Hughes, D., Naldrett, M. J., Buttner, M. J., & Wright, G. D. (2010). A vancomycin photoprobe identifies the histidine kinase VanSsc as a vancomycin receptor. *Nature Chemical Biology*, 6(5), 327–329. <https://doi.org/10.1038/nchembio.350>
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M. E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology*, 64, 539–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>
- Krikos, A., Conley, M. P., Boydt, A., Berg, H. C., & Simon, M. I. (1985). Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(March), 1326–1330.
- Krikos, A., Mutoh, N., Boyd, A., & Simon, M. I. (1983). Sensory transducers of *E. coli* are composed of discrete structural and functional domains. *Cell*, 33(2), 615–622. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90442-7)
- Kristich, C. J., Glekas, G. D., & Ordal, G. W. (2003). The conserved cytoplasmic module of the transmembrane chemoreceptor McpC mediates carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1353–1366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03375.x>
- Krysenko, S., Matthews, A., Okoniewski, N., Kulik, A., Girbas, M. G., Tsypik, O., Meyners, C. S., Hausch, F., Wohlleben, W., & Bera, A. (2019). Initial metabolic step of a novel ethanolamine utilization pathway and its regulation in *Streptomyces coelicolor* M145. *MBio*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00326-19>
- Kudou, D., Yasuda, E., Hirai, Y., Tamura, T., & Inagaki, K. (2015). Molecular cloning and characterization of L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4), 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.02.019>
- Kuhstoss, S., Richardson, M. A., & Rao, R. N. (1991). Plasmid cloning vectors that integrate site-specifically in *Streptomyces* spp. *Gene*, 97(1), 143–146. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90022-4)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H., & Hiramatsu, K. (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 49(3), 807–821. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03599.x>
- Kwon, M. J., Novotna, G., Hesketh, A. R., Hill, L., & Hong, H. J. (2013). *In vivo* studies suggest that induction of VanS-dependent vancomycin resistance requires binding of the drug to D-Ala-D-Ala termini in the peptidoglycan cell wall. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4470–4480. <https://doi.org/10.1128/AAC.00523-13>
- Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Soucy, J. P. R., Westwood, D., Daneman, N., & MacFadden, D. R. (2021). Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(4), 520–531. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.018>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Laub, M. T., & Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics*, 41, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>
- Lazar, J. T., & Tabor, J. J. (2021). Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100398>

- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lee, E. J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H. S., Park, J. H., Cha, C. J., Kao, C. M., & Roe, J. H. (2005). A master regulator  $\sigma$ B governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04761.x>
- Lee, G. R., Won, J., Heo, L., & Seok, C. (2019). GalaxyRefine2: Simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W451–W455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>
- Lehning, C. E., Heidelberger, J. B., Reinhard, J., Nørholm, M. H. H., & Draheim, R. R. (2017). A Modular High-Throughput *In Vivo* Screening Platform Based on Chimeric Bacterial Receptors. *ACS Synthetic Biology*, 6(7), 1315–1326. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00288>
- Lejeune, C., Abreu, S., Chaminade, P., Dulermo, T., David, M., Werten, S., & Virolle, M. J. (2021). Impact of Phosphate Availability on Membrane Lipid Content of the Model Strains, *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623919>
- Leonard, P. G., Golemi-Kotra, D., & Stock, A. M. (2013). Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8525–8530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302819110>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D458–D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- Levsikaya, A., Chevalier, A. A., Tabor, J. J., Simson, Z. B., Lavery, L. A., Levy, M., Davidson, E. A., Scouras, A., Ellington, A. D., Marcotte, E. M., & Voigt, C. A. (2005). Engineering *Escherichia coli* to See Light. *Nature*, 438(November), 441–442. <https://doi.org/10.1038/nature04405>
- Lewis, R. A., Wahab, A., Bucca, G., Laing, E. E., Möller-Levet, C. S., Kierzek, A., & Smith, C. P. (2019). Genome-wide analysis of the role of the antibiotic biosynthesis regulator AbsA2 in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS ONE*, 14(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200673>
- Li, Y., Cen, P., Chen, S., Wu, D., & Zheng, J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 5(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF02840919>
- Li, Z., Jaroszewski, L., Iyer, M., Sedova, M., & Godzik, A. (2020). FATCAT 2.0: Towards a better understanding of the structural diversity of proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(1), 60–64. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA443>
- Li, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2017). A Novel Two-Component System, GluR-GluK, Involved in Glutamate Sensing and Uptake in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 199(18), 1–12. <https://doi.org/10.1128/JB.00097-17>
- Li, L., Zhao, Y., Ma, J., Tao, H., Zheng, G., Chen, J., Jiang, W., & Lu, Y. (2020). The orphan histidine kinase PdtA-S-p regulates both morphological differentiation and antibiotic biosynthesis together with the orphan response regulator PdtA-R-p in *Streptomyces*. *Microbiological Research*, 233(October 2019), 126411. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126411>
- Li, Z., Liu, X., Wang, J., Wang, Y., Zheng, G., Lu, Y., Zhao, G., & Wang, J. (2018). Insight into the molecular mechanism of the transcriptional regulation of *amtB* operon in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00264>
- Li, J., Swanson, R. V., Simon, M. I., & Weis, R. M. (1995). The Response Regulators CheB and CheY Exhibit Competitive Binding to the Kinase CheA. *Biochemistry*, 34(45), 14626–14636. <https://doi.org/10.1021/bi00045a003>
- Lin, W., Wang, Y., Han, X., Zhang, Z., Wang, C., Wang, J., Yang, H., Lu, Y., Jiang, W., Zhao, G. P., & Zhang, P. (2014). Atypical OmpR/PhoB subfamily response regulator GlnR of actinomycetes functions as a homodimer, stabilized by the unphosphorylated conserved Asp-focused charge interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15413–15425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543504>
- Linke, H. A. B., Mechlinski, W., & Schaffner, C. P. (1974). Production of Amphotericin B-14C by *Streptomyces nodosus* Fermentation, and Preparation of the Amphotericin B-14C-methyl-ester. *The Journal of Antibiotics*, 27(3), 155–160. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.27.155>
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112–143. <https://doi.org/10.1128/mmb.00054-12>
- Liu, M., Xu, W., Zhu, Y., Cui, X., & Pang, X. (2021). The Response Regulator MacR and its Potential in Improvement of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *Current Microbiology*, 78(10), 3696–3707. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02633-3>

## BIBLIOGRAFÍA

- Liu, S. H., Wang, W., Wang, K. B., Zhang, B., Li, W., Shi, J., Jiao, R. H., Tan, R. X., & Ge, H. M. (2019). Heterologous Expression of a Cryptic Giant Type I PKS Gene Cluster Leads to the Production of Ansaseomycin. *Organic Letters*, 21(10), 3785–3788. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b01237>
- Liu, M., Zhang, P., Zhu, Y., Lu, T., Wang, Y., Cao, G., Shi, M., Chen, X. L., Tao, M., & Pang, X. (2019). Novel two-component system MacRS is a pleiotropic regulator that controls multiple morphogenic membrane protein genes in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(4), 1–23. <https://doi.org/10.1128/AEM.02178-18>
- Liu, P., Zhu, H., Zheng, G., Jiang, W., & Lu, Y. (2017). Metabolic engineering of *Streptomyces coelicolor* for enhanced prodigiosins (RED) production. *Science China Life Sciences*, 60(9), 948–957. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9117-x>
- Llamas-Ramírez, R., Takahashi-Iñiguez, T., & Flores, M. E. (2020). The phosphoenolpyruvate-pyruvate-oxaloacetate node genes and enzymes in *Streptomyces coelicolor* M145. *International Microbiology*, 23(3), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00116-x>
- Lockey, C., Edwards, R. J., Roper, D. I., & Dixon, A. M. (2020). The Extracellular Domain of Two-component System Sensor Kinase VanS from *Streptomyces coelicolor* Binds Vancomycin at a Newly Identified Binding Site. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62557-z>
- Lombó, F., Blanco, G., Fernández, E., Méndez, C., & Salas, J. A. (1996). Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene*, 172(1), 87–91. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00029-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00029-7)
- Lombó, F., Braña, A. F., Salas, J. A., & Méndez, C. (2004). Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *ChemBioChem*, 5(9), 1181–1187. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400073>
- Lu, Y., He, J., Zhu, H., Yu, Z., Wang, R., Chen, Y., Dang, F., Zhang, W., Yang, S., & Jiang, W. (2011). An orphan histidine kinase, OhkA, regulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3020–3032. <https://doi.org/10.1128/JB.00017-11>
- Lu, Y., Wang, W., Shu, D., Zhang, W., Chen, L., Qin, Z., Yang, S., & Jiang, W. (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 625–635. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1184-5>
- Lu, T., Zhu, Y., Zhang, P., Sheng, D., Cao, G., & Pang, X. (2018). SCO5351 is a pleiotropic factor that impacts secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 365(17), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny150>
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2015). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00029>
- Lynch, S. A., Desai, S. K., Sajja, H. K., & Gallivan, J. P. (2007). A High-Throughput Screen for Synthetic Riboswitches Reveals Mechanistic Insights into Their Function. *Chemistry and Biology*, 14(2), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.12.008>
- Maclunas, L. J., Porter, N., Lee, P. J., Gupta, K., & Loll, P. J. (2021). Structures of full-length VanR from *Streptomyces coelicolor* in both the inactive and activated states. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 77, 1027–1039. <https://doi.org/10.1107/S2059798321006288>
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., & MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90603-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90603-M)
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Mak, S., & Nodwell, J. R. (2017). Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular Microbiology*, 106(4), 597–613. <https://doi.org/10.1111/mmi.13837>
- Malik, V. S. (1983). Biochemistry and genetics of chloramphenicol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(5), 332–336. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(83\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90003-0)
- Malpartida, F., & Hopwood, D. A. (1986). Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular and General Genetics*, 205, 66–73. <https://doi.org/10.1007/BF02428033>

- Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C., & 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 Microbiology Letters*, 274(1), 118–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00825.x>
- Margalith, P., & Beretta, G. (1960). Rifomycin. XI. Taxonomic Study on *Streptomyces mediterranei* nov. sp. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 13(4), 321–330. <https://doi.org/10.1007/BF02089930>
- Martín-Martín, S., Rodríguez-García, A., Santos-Beneit, F., Franco-Domínguez, E., Sola-Landa, A., & Martín, J. F. (2017). Self-control of the PHO regulon: The PhoP-dependent protein PhoU controls negatively expression of genes of PHO regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Antibiotics*, 71(1), 113–122. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.130>
- Martín, J. F., & Liras, P. (2021). Molecular mechanisms of phosphate sensing, transport and signalling in *Streptomyces* and related actinobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>
- Martín, J. F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L., Prieto, C., & Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00235.x>
- Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T.-A., & Helmann, J. D. (2004). Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 2888–2896. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2888-2896.2004>
- Maslennikov, I., Klammt, C., Hwang, E., Kefala, G., Okamura, M., Esquivies, L., Mörs, K., Glaubit, C., Kwiatkowski, W., Jeon, Y. H., & Choe, S. (2010). Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10902–10907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001656107>
- Mason, D. J., & Lewis, C. (1964). Biological Activity of the Lincomycin-related Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 7–12.
- McCormick, J. R. (2009). Cell division is dispensable but not irrelevant in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 12(6), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.10.004>
- Mchenney, M. A., Hosted, T. J., Dehoff, B. S., Rosteck, P. R., & Baltz, R. H. (1998). Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology*, 180(1), 143–151. <https://doi.org/10.1128/jb.180.1.143-151.1998>
- McKenzie, N. L., & Nodwell, J. R. (2007). Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5284–5292. <https://doi.org/10.1128/JB.00305-07>
- McKenzie, N. L., & Nodwell, J. R. (2009). Transmembrane topology of the AbsA1 sensor kinase of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 155(6), 1812–1818. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028431-0>
- McKenzie, N. L., Thaker, M., Koteva, K., Hughes, D. W., Wright, G. D., & Nodwell, J. R. (2010). Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA1*. *Journal of Antibiotics*, 63(4), 177–182. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.13>
- Méndez, C., Künzel, E., Lipata, F., Lombó, F., Cotham, W., Walla, M., Bearden, D. W., Braña, A. F., Salas, J. A., & Rohr, J. (2002). Oviedomycin, an unusual angucyclinone encoded by genes of the oleandomycin-producer *Streptomyces antibioticus* ATCC11891. *Journal of Natural Products*, 65(5), 779–782. <https://doi.org/10.1021/np010555n>
- Menéndez-Bravo, S., Paganini, J., Avignone-Rossa, C., Gramajo, H., & Arabolaza, A. (2017). Identification of FadAB complexes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation in *Streptomyces coelicolor* and construction of a triacylglycerol overproducing strain. *Frontiers in Microbiology*, 8(8), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01428>
- Merrick, M. J. (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, 96(2), 299–315. <https://doi.org/10.1099/00221287-96-2-299>
- Millan-Oropeza, A., Henry, C., Lejeune, C., David, M., & Virolle, M. J. (2020). Expression of genes of the Pho regulon is altered in *Streptomyces coelicolor*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65087-w>
- Minatelli, S. (2015). Deleción de los sistemas de dos componentes AbrA y AbrB en *Streptomyces coelicolor*: su efecto en la producción de antibióticos y diferenciación [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Salamanca.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>

## BIBLIOGRAFÍA

- Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), 1433–1444. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.017>
- Molle, V., & Buttner, M. J. (2000). Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Molecular Microbiology*, 36(6), 1265–1278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01977.x>
- Mulinos, M. G. (1955). Cycloserine: an antibiotic paradox. *Antibiotics Annual*, 3, 131–135.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Munnoch, J. T., Martínez, M. T. P., Svistunencko, D. A., Crack, J. C., Le Brun, N. E., & Hutchings, M. I. (2016). Characterization of a putative NsrR homologue in *Streptomyces venezuelae* reveals a new member of the Rrf2 superfamily. *Scientific Reports*, 6(September), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep31597>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Myronovskiy, M., & Luzhetskyy, A. (2019). Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts. *Natural Product Reports*, 36(9), 1281–1294. <https://doi.org/10.1039/c9np00023b>
- Myronovskiy, M., Welle, E., Fedorenko, V., & Luzhetskyy, A. (2011).  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5370–5383. <https://doi.org/10.1128/AEM.00434-11>
- Nakamura, Y., Gojorori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 292. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.292>
- Nass, N. M., Farooque, S., Hind, C., Wand, M. E., Randall, C. P., Sutton, J. M., Seipke, R. F., Rayner, C. M., & O'Neill, A. J. (2017). Revisiting unexploited antibiotics in search of new antibacterial drug candidates: The case of  $\gamma$ -actinorhodin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17232-1>
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11), 1362–1384. <https://doi.org/10.1039/b817069j>
- Nguyen, K., Au-Young, S., & Nodwell, J. (2007). Monomeric red fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in *Streptomyces coelicolor*. *Plasmid*, 58(2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2007.03.005>
- Nguyen, K. T., Willey, J. M., Nguyen, L. D., Nguyen, L. T., Viollier, P. H., & Thompson, C. J. (2002). A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1223–1238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03255.x>
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., & Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6169. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6169>
- Nothaft, H., Rigali, S., Boomsma, B., Swiatek, M., McDowall, K. J., van Wezel, G. P., & 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. *Molecular Microbiology*, 75(5), 1133–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07020.x>
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H. P., Goodfellow, M., & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- Novakova, R., Núñez, L. E., Homerova, D., Knirschova, R., Feckova, L., Rezuchova, B., Sevcikova, B., Menéndez, N., Morís, F., Cortés, J., & Kormanec, J. (2018). Increased heterologous production of the antitumoral polyketide mithramycin A by engineered *Streptomyces lividans* TK24 strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 857–869. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8642-5>
- Novotna, G. B., Kwun, M. J., & Hong, H. J. (2016). *In vivo* characterization of the activation and interaction of the VanR-VanS two-component regulatory system controlling glycopeptide antibiotic resistance in two related *Streptomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1627–1637. <https://doi.org/10.1128/AAC.01367-15>
- O'Connor, T. J., Kanellis, P., & Nodwell, J. R. (2002). The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Molecular Microbiology*, 45(1), 45–57. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03004.x>

- O'Neill, J. (2016). The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. In *UK Government and Wellcome Trust*.
- O'Rourke, S., Wietzorrek, A., Fowler, K., Corre, C., Challis, G. L., & Chater, K. F. (2009). Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *71*(3), 763–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06560.x>
- Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., & Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the *act* Gene Cluster. *Chemistry and Biology*, *16*(2), 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.015>
- Ortet, P., Whitworth, D. E., Santaella, C., Achouak, W., & Barakat, M. (2015). P2CS: Updates of the prokaryotic two-component systems database. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D536–D541. <https://doi.org/10.1093/nar/gku968>
- Osada, N., Kosuge, Y., Ishige, K., & Ito, Y. (2013). Mithramycin, an agent for developing new therapeutic drugs for neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*, *122*(4), 251–256. <https://doi.org/10.1254/jphs.13R02CP>
- Paget, M. S. B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J., & Buttner, M. J. (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *181*(1), 204–211.
- Paget, M. S. B., Leibovitz, E., & Buttner, M. J. (1999). A putative two-component signal transduction system regulates  $\sigma E$ , a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *33*(1), 97–107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01452.x>
- Park, J. H., & Roe, J. H. (2008). Mycothiol regulates and is regulated by a thiol-specific antisigma factor RsrA and  $\sigma R$  in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *68*(4), 861–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06191.x>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, *14*(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pawlik, K., Kotowska, M., Chater, K. F., Kuczek, K., & Takano, E. (2007). A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of Microbiology*, *187*(2), 87–99. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0176-7>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pittenger, R. C., Wolfe, R. N., Hoehn, M. M., Marks, P. N., Daily, W. A., & McGuire, J. M. (1953). Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiotics and Chemotherapy*, *3*(12), 1268–1278.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. (1958). A Guide for the Classification of Streptomycetes According to Selected Groups. Placement of Strains in Morphological Sections. *Applied Microbiology*, *6*(1), 52–79. <https://doi.org/10.1128/am.6.1.52-79.1958>
- Prieto, C., & Barrios, D. (2020). RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics*, *36*(6), 1955–1956. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz854>
- Pullan, S. T., Chandra, G., Bibb, M. J., & Merrick, M. (2011). Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC Genomics*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-175>
- Qian, Z., Bruhn, T., D'Agostino, P. M., Herrmann, A., Haslbeck, M., Antal, N., Fiedler, H. P., Brack-Werner, R., & Gulder, T. A. M. (2020). Discovery of the Streptoketides by Direct Cloning and Rapid Heterologous Expression of a Cryptic PKS II Gene Cluster from *Streptomyces* sp. Tü 6314. *Journal of Organic Chemistry*, *85*(2), 664–673. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02741>
- Quintana, E. T., Wierzbicka, K., Mackiewicz, P., Osman, A., Fahal, A. H., Hamid, M. E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Maldonado, L. A., & Goodfellow, M. (2008). *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *93*(3), 305–313. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9205-z>
- Qureshi, N. K., Yin, S., & Boyle-Vavra, S. (2014). The role of the staphylococcal VraTSR regulatory system on vancomycin resistance and *vanA* operon expression in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085873>

## BIBLIOGRAFÍA

- Rafiee, M. R., Girardot, C., Sigismondo, G., & Krijgsveld, J. (2016). Expanding the Circuitry of Pluripotency by Selective Isolation of Chromatin-Associated Proteins. *Molecular Cell*, *64*(3), 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.019>
- Rao, K. V., Cullen, W. P., & Sobin, B. A. (1960). Mithramycin: antibiotic with antitumor properties. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, *3*, 143.
- Ravikumar, S., Ganesh, I., Maruthamuthu, M. K., & Hong, S. H. (2015). Engineering *Escherichia coli* to sense acidic amino acids by introduction of a chimeric two-component system. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *32*(10), 2073–2077. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0024-z>
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M. S., Haznedar, J. Ö., Zhulin, I. B., & Taylor, B. L. (2000). PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *36*(4), 806–816. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01910.x>
- Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, *11*, 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Reuther, J., & Wohlleben, W. (2007). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: Transcriptional and post-translational regulation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *12*(1–2), 139–146. <https://doi.org/10.1159/000096469>
- Rexer, H. U., Schäberle, T., Wohlleben, W., & Engels, A. (2006). Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of Microbiology*, *186*(6), 447–458. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0159-8>
- Rhodes, P. M. (1984). The Production of Oxytetracycline in Chemostat Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, *26*, 382–385. <https://doi.org/10.1002/bit.260260415>
- Richardson, M. A., Kuhstoss, S., Solenberg, P., Schaus, N. A., & Rao, R. N. (1987). A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene*, *61*(3), 231–241. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90187-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90187-9)
- Rico, S. (2014). Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta positivo de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* [Tesis Doctoral]. Universidad de Salamanca.
- Rico, S., Santamaría, R. I., Yepes, A., Rodríguez, H., Laing, E., Bucca, G., Smith, C. P., & Díaz, M. (2014). Deciphering the regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(8), 2417–2428. <https://doi.org/10.1128/AEM.03378-13>
- Rico, S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S., Krause, E. M., Díaz, M., & Santamaría, R. I. (2014). 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*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109844>
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, *9*(7), 670–675. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.83>
- Rioeras, B., López-García, M. T., Yagüe, P., Sánchez, J., & Manteca, Á. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technology*, *151*, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.068>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, *29*(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., & 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*(14), 2410–2429. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600883>
- Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Apel, K., Santos-Beneit, F., & Martín, J. F. (2009). Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: Direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Research*, *37*(10), 3230–3242. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp162>
- Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Santamaría, R. I., & 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*(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00450>

- Romano-Armada, N., Yañez-Yazlle, M. F., Irazusta, V. P., Rajal, V. B., & Moraga, N. B. (2020). Potential of bioremediation and PGP traits in *Streptomyces* as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture. *Pathogens*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020117>
- Romero, D., Traxler, M. F., Daniel, L., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as Signal Molecules. *Chemical Reviews*, *111*, 5492–5505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>
- Ronda, C., Pedersen, L. E., Hansen, H. G., Kallehauge, T. B., Betenbaugh, M. J., Nielsen, A. T., & Kildegaard, H. F. (2014). Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(8), 1604–1616. <https://doi.org/10.1002/bit.25233>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(4), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rowland, M. A., & Deeds, E. J. (2014). Crosstalk and the evolution of specificity in two-component signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), 5550–5555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317178111>
- Rozas, D., Gullón, S., & Mellado, R. P. (2012). A novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031760>
- Rudd, B. A. M., & Hopwood, D. A. (1979). Genetics of Actinorhodin Biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, *3*(114), 35–43. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-35>
- Rudolph, M. M., Vockenhuber, M. P., & Suess, B. (2013). Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, *159*(PART7), 1416–1422. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067322-0>
- Rudolph, M. M., Vockenhuber, M. P., & Suess, B. (2015). Conditional control of gene expression by synthetic riboswitches in *Streptomyces coelicolor*. In *Methods in Enzymology*, 550. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.10.036>
- Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(8), 509–523. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>
- Ryan, W. G., Schwartz, T. B., & Northrop, G. (1970). Experiences in the Treatment of Paget's Disease of Bone With Mithramycin. *The Journal of the American Medical Association*, *213*(7), 1153–1157. <https://doi.org/10.1001/jama.1970.03170330035004>
- Ryding, N. J., Anderson, T. B., & Champness, W. C. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *Journal of Bacteriology*, *184*(3), 794–805. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.794-805.2002>
- Ryding, N. J., Bibb, M. J., Molle, V., Findlay, K. C., Chater, K. F., & Buttner, M. J. (1999). New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *181*(17), 5419–5425. <https://doi.org/10.1128/jb.181.17.5419-5425.1999>
- Sabido, E. M., Tenebro, C. P., Suarez, A. F. L., Ong, S. D. C., Von Trono, D. J. L., Amago, D. S., Evangelista, J. E., Reynoso, A. M. Q., Villalobos, I. G. M., Alit, L. D. D., Surigao, C. F., Villanueva, C. A., Saludes, J. P., & Dalisay, D. S. (2020). Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* harboring SCCmec type 1 gene. *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/JMSE8100734>
- Saito, A., Shinya, T., Miyamoto, K., Yokoyama, T., Kaku, H., Minami, E., Shibuya, N., Tsujibo, H., Nagata, Y., Ando, A., Fujii, T., & Miyashita, K. (2007). The *dasABC* gene cluster, adjacent to *dasR*, encodes a novel ABC transporter for the uptake of N,N'-diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(9), 3000–3008. <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-06>
- San Paolo, S., Huang, J., Cohen, S. N., & Thompson, C. J. (2006). *rag* genes: Novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, *61*(5), 1167–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05304.x>
- Sánchez de la Nieta, R., Antoraz, S., Alzate, J. F., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2020). Antibiotic Production and Antibiotic Resistance: The Two Sides of AbrB1/B2, a Two-Component System of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 587750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587750>
- Santamaría, R. I., Martínez-Carrasco, A., Sánchez de la Nieta, R., Torres-Vila, L. M., Bonal, R., Martín, J., Tormo, R., Reyes, F., Genilloud, O., & Díaz, M. (2020). Characterization of actinomycetes strains isolated from the intestinal tract and feces of the larvae of the longhorn beetle *Cerambyx welensii*. *Microorganisms*, *8*(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122013>

## BIBLIOGRAFÍA

- Santos-Aberturas, J., & Vior, N. M. (2022). Beyond Soil-Dwelling Actinobacteria: Fantastic Antibiotics and Where to Find Them. *Antibiotics*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020195>
- Santos-Beneit, F. (2018). Genome sequencing analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants that overcome the phosphate-dependent vancomycin lethal effect. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4838-z>
- Santos-Beneit, F., Barriuso-Iglesias, M., Fernández-Martínez, L., Martínez-Castro, M., Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., & 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(21), 7586–7594. <https://doi.org/10.1128/AEM.00465-11>
- Santos-Beneit, F., & Errington, J. (2017). Green fluorescent protein as a reporter for the spatial and temporal expression of *actIII* in *Streptomyces coelicolor*. *Archives of Microbiology*, *199*(6), 875–880. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1358-1>
- Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L., García, A. R., Martín-Martín, S., Ordóñez-Robles, M., Yagüe, P., Manteca, A., & Martín, J. F. (2014). Transcriptional response to vancomycin in a highly vancomycin-resistant *Streptomyces coelicolor* mutant. *Future Microbiology*, *9*(5), 603–622. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.21>
- Santos-Beneit, F., & Martín, J. F. (2013). Vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor* is phosphate-dependent but is not mediated by the PhoP regulator. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *1*(2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.003>
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E., & Martín, J. F. (2008). Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, *154*(8), 2356–2370. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019539-0>
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., & Martín, J. F. (2011). Complex transcriptional control of the antibiotic regulator *afsS* in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators. *Journal of Bacteriology*, *193*(9), 2242–2251. <https://doi.org/10.1128/JB.01462-10>
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., & Martín, J. F. (2012). Overlapping binding of PhoP and AfsR to the promoter region of *glnR* in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiological Research*, *167*(9), 532–535. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.010>
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., & 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. *Molecular Microbiology*, *72*(1), 53–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06624.x>
- Sanz, D. (2014). Implicación del sistema de dos componentes AbrB en la regulación de la producción de antibióticos y diferenciación en *Streptomyces coelicolor* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Salamanca.
- Sasaki, Y., Oguchi, H., Kobayashi, T., Kusama, S., Sugiura, R., Moriya, K., Hirata, T., Yukioka, Y., Takaya, N., Yajima, S., Ito, S., Okada, K., Ohsawa, K., Ikeda, H., Takano, H., Ueda, K., & Shoun, H. (2016). Nitrogen oxide cycle regulates nitric oxide levels and bacterial cell signaling. *Scientific Reports*, *6*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22038>
- Schatz, A., & Waksman, S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *57*(2), 244–248. <https://doi.org/10.3181/00379727-57-14769>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Selvamani, V., Ganesh, I., Chae, S., Maruthamuthu, M. kannan, & Hong, S. H. (2020). Engineering of recombinant *Escherichia coli* towards methanol sensing using *Methylobacterium extroquens* two-component systems. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *48*(1), 24–31. <https://doi.org/10.4014/mbl.1908.08009>
- Selvamani, V., Ganesh, I., Maruthamuthu, M. kannan, Eom, G. T., & Hong, S. H. (2017). Engineering chimeric two-component system into *Escherichia coli* from *Paracoccus denitrificans* to sense methanol. *Biotechnology and Bioengineering*, *22*(3), 225–230. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0484-y>
- Sevillano, L., Vijgenboom, E., van Wezel, G. P., Díaz, M., & Santamaría, R. I. (2016). New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0425-7>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, *13*, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., & Jiang, W. (2009). *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(6), 1149–1160. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1738-1>
- Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Sola-Landa, A., Moura, R. S., & Martín, J. F. (2003). The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(10), 6133–6138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931429100>
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Amin, R., Wohlleben, W., & Martín, J. F. (2013). Competition between the GlnR and PhoP regulators for the *glnA* and *amtB* promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*, *41*(3), 1767–1782. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1203>
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Apel, A. K., & Martín, J. F. (2008). Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*, *36*(4), 1358–1368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1150>
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E., & Martín, J. F. (2005). Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: Identification of PHO boxes. *Molecular Microbiology*, *56*(5), 1373–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04631.x>
- Som, N. F., Heine, D., Holmes, N., Knowles, F., Chandra, G., Seipke, R. F., Hoskisson, P. A., Wilkinson, B., & Hutchings, M. I. (2017). The MtrAB two-component system controls antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, *163*(10), 1415–1419. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000524>
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequence. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, *6*, 175–182. [papers://4b986d00-906f-493f-a74b-71e29d82b719/Paper/p6291](https://papers://4b986d00-906f-493f-a74b-71e29d82b719/Paper/p6291)
- Stankovic, N., Senerovic, L., Ilic-Tomic, T., Vasiljevic, B., & Nikodinovic-Runic, J. (2014). Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(9), 3841–3858. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5590-1>
- Stark, J. (2003). Natamycin: an effective fungicide for food and beverages. In *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781855737037.82>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, *69*, 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Sun, J., Kelemen, G. H., Fernández-Abalos, J. M., & Bibb, M. J. (1999). Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, *145*(9), 2221–2227. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2221>
- Suntharalingam, P., Senadheera, M. D., Mair, R. W., Levesque, C. M., & Cvitkovitch, D. G. (2009). The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, *191*(9), 2973–2984. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-08>
- Swiatek-Polatynska, M. A., Bucca, G., Laing, E., Gubbens, J., Titgemeyer, F., Smith, C. P., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2015). Genome-wide analysis of *in vivo* binding of the master regulator DasR in *Streptomyces coelicolor* identifies novel non-canonical targets. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122479>
- Swiatek-Polatynska, M. A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y. H., Laing, E., Kim, B. G., Smith, C. P., & van Wezel, G. P. (2013). The ROK-family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *195*(6), 1236–1248. <https://doi.org/10.1128/JB.02191-12>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), 605–612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Tahlan, K., Yu, Z., Xu, Y., Davidson, A. R., & Nodwell, J. R. (2008). Ligand Recognition by ActR, a TetR-Like Regulator of Actinorhodin Export. *Journal of Molecular Biology*, *383*(4), 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.081>
- Takano, H., Hashimoto, K., Yamamoto, Y., Beppu, T., & Ueda, K. (2011). Pleiotropic effect of a null mutation in the *cvn1* conserved of *S. coelicolor* A3(2). *Gene*, *477*(1–2), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.01.005>

## BIBLIOGRAFÍA

- Tenebro, C. P., Trono, D. J. V. L., Vicera, C. V. B., Sabido, E. M., Ysulat, J. A., Macaspac, A. J. M., Tampus, K. A., Fabrigar, T. A. P., Saludes, J. P., & Dalisay, D. S. (2021). Multiple strain analysis of *Streptomyces* species from Philippine marine sediments reveals intraspecies heterogeneity in antibiotic activities. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96886-4>
- Thomas, L., Hodgson, D. A., Wentzel, A., Nieselt, K., Ellingsen, T. E., Moore, J., Morrissey, E. R., Legaie, R., Wohlleben, W., Rodríguez-García, A., Martín, J. F., Burroughs, N. J., Wellington, E. M. H., & Smith, M. C. M. (2012). Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture. *Molecular and Cellular Proteomics*, *11*(2), M111.013797. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013797>
- Tian, Y., Fowler, K., Findlay, K., Tan, H., & Chater, K. F. (2007). An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *189*(7), 2873–2885. <https://doi.org/10.1128/JB.01615-06>
- Tierney, A. R. P., & Rather, P. N. (2019). Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, *14*(6), 533–552. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0002>
- Tiffert, Y., Franz-Wachtel, M., Fladerer, C., Nordheim, A., Reuther, J., Wohlleben, W., & Mast, Y. (2011). Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* M145. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(4), 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3086-9>
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R., & Reuther, J. (2008). The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: Identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, *67*(4), 861–880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06092.x>
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., & Lee, S. Y. (2015). CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synthetic Biology*, *4*(9), 1020–1029. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00038>
- Tran, T. M., Ameye, M., Devlieghere, F., De Saeger, S., Eeckhout, M., & Audenaert, K. (2021). *Streptomyces* Strains Promote Plant Growth and Induce Resistance Against *Fusarium verticillioides* via Transient Regulation of Auxin Signaling and Archetypal Defense Pathways in Maize Plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755733>
- Tran, T. T., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1354*, 32–53. <https://doi.org/10.1111/nyas.12948>
- Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. J. R., & Martín, J. F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *FEBS Journal*, *274*(4), 1110–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05662.x>
- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K., & Takeuchi, T. (1957). Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *The Journal of Antibiotics*, *10*(5), 181–188.
- Urem, M., Rossum, T. Van, Bucca, G., Moolenaar, G. F., Laing, E., Swiatek-Polatynska, M. A., Willemse, J., Tenconi, E., Rigali, S., Goosen, N., Smith, C. P., & van Wezel, G. P. (2016). OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the Dormancy Regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* Control Overlapping Regulons. *MSystems*, *1*(3), 1–21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00014-16>
- Utsumi, R., Brissette, R. E., Rampersaud, A., Forst, S. A., Oosawa, K., & Inouye, M. (1989). Activation of Bacterial Porin Gene Expression by a Chimeric Signal Transducer in Response to Aspartate. *Science*, *245*(4923), 1246–1249. <https://doi.org/10.1126/science.2476847>
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 546–558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- van Bogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(15), 5589–5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5589>
- van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. In *Advances in Applied Microbiology*, *89*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9>
- van Wezel, G. P., & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: New links and experimental advances. *Natural Product Reports*, *28*(7), 1311–1333. <https://doi.org/10.1039/c1np00003a>
- van Wezel, G. P., White, J., Hoogvliet, G., & Bibb, M. J. (2000). Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *2*(4), 551–556.

- Vasanthakumar, A., Handelsman, J. O., Schloss, P. D., Bauer, L. S., & Raffa, K. F. (2008). Gut microbiota of an invasive Subcortical Beetle, *Agrilus planipennis* fairmaire, across various life stages. *Environmental Entomology*, 37(5), 1344–1353. <https://doi.org/10.1093/ee/37.5.1344>
- Vrancken, K., van Mellaert, L., & Anné, J. (2008). Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3475–3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01966-07>
- Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produd by a Soil *Actinomyces*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 45, 609–614. <https://doi.org/10.3181/00379727-45-11768>
- Wang, S. (2012). Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. In *Protein Phosphorylation in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/48277>
- Wang, Y., Cen, X. F., Zhao, G. P., & Wang, J. (2012). Characterization of a New GlnR binding box in the promoter of *amtB* in *Streptomyces coelicolor* inferred a PhoP/GlnR competitive binding mechanism for transcriptional regulation of *amtB*. *Journal of Bacteriology*, 194(19), 5237–5244. <https://doi.org/10.1128/JB.00989-12>
- Wang, C., Ge, H., Dong, H., Zhu, C., Li, Y., Zheng, J., & Cen, P. (2007). A novel pair of two-component signal transduction system *ecrE1/ecrE2* regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Biologia*, 62(5), 511–516. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0101-9>
- Wang, G., Izawa, M., Yang, X., Xu, D., Tanaka, Y., & Ochi, K. (2017). Identification of a Novel Lincomycin Resistance Mutation Associated with Activation of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 1–10. <https://doi.org/10.1128/AAC.02247-16>
- Wang, W., Li, X., Li, Y., Li, S., Fan, K., & Yang, K. (2015). A genetic biosensor for identification of transcriptional repressors of target promoters. *Scientific Reports*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep15887>
- Wang, R., Mast, Y., Wang, J., Zhang, W., Zhao, G., Wohleben, W., Lu, Y., & Jiang, W. (2013). Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 87(1), 30–48. <https://doi.org/10.1111/mmi.12080>
- Wang, L., Tian, X., Wang, J., Yang, H., Fan, K., Xu, G., Yang, K., & Tan, H. (2009). Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8617–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900592106>
- Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2009). Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 294(2), 150–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01563.x>
- Wang, J., & Zhao, G. P. (2009). GlnR positively regulates *nasA* transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(1), 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.147>
- Wanner, L. A. (2006). A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology*, 96(12), 1363–1371. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1363>
- Ward, S. M., Delgado, A., Gunsalus, R. P., & Manson, M. D. (2002). A NarX-Tar chimera mediates repellent chemotaxis to nitrate and nitrite. *Molecular Microbiology*, 44(3), 709–719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02902.x>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weerasuriya, S., Schneider, B. M., & Manson, M. D. (1998). Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli*: Signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 914–920. <https://doi.org/10.1128/jb.180.4.914-920.1998>
- Weiser, J., Buriánková, K., Kalachová, L., Branny, P., & Pernodet, J. L. (2006). Construction and testing of a bacterial luciferase reporter gene system for *in vivo* measurement of nonsense suppression in *Streptomyces*. *Folia Microbiologica*, 51(1), 62–64. <https://doi.org/10.1007/BF02931452>
- White, J., & Bibb, M. (1997). *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 627–633. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.627-633.1997>
- WHO. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. In *World Health Organization*.
- WHO. (2021a). 2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development. In *World Health Organization*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>

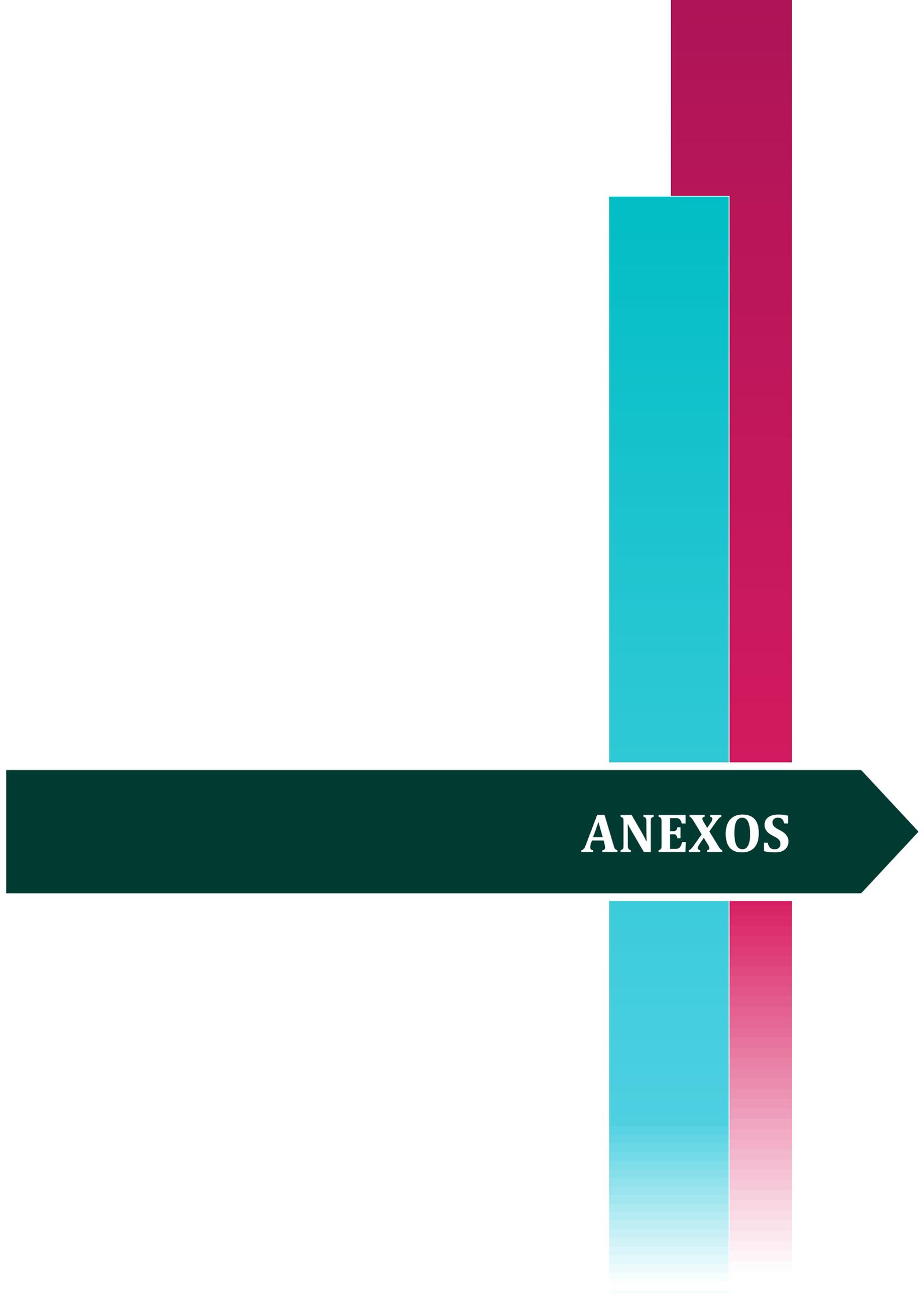
## BIBLIOGRAFÍA

- WHO. (2021b). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021. In *World Health Organization*. <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2020/en/>
- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, *27*(1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- Wolański, M., Jakimowicz, D., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2014). Fifty years after the replicon hypothesis: Cell-specific master regulators as new players in chromosome replication control. *Journal of Bacteriology*, *196*(16), 2901–2911. <https://doi.org/10.1128/JB.01706-14>
- Wray, L. V., Atkinson, M. R., & Fisher, S. H. (1991). Identification and cloning of the *glnR* locus, which is required for transcription of the *glnA* gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *173*(22), 7351–7360. <https://doi.org/10.1128/jb.173.22.7351-7360.1991>
- Wray, L. V., & Fisher, S. H. (1993). The *Streptomyces coelicolor glnR* gene encodes a protein similar to other bacterial response regulators. *Gene*, *130*(1), 145–150. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90359-B](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90359-B)
- Wright, L. F., & Hopwood, D. A. (1976). Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, *95*(1), 96–106. <https://doi.org/10.1099/00221287-95-1-96>
- Xia, H., Li, X., Li, Z., Zhan, X., Mao, X., & Li, Y. (2020). The Application of Regulatory Cascades in *Streptomyces*: Yield Enhancement and Metabolite Mining. *Frontiers in Microbiology*, *11*(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00406>
- Xiang, S. H., Li, J., Yin, H., Zheng, J. T., Yang, X., Wang, H. Bin, Luo, J. L., Bai, H., & Yang, K. Q. (2009). Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering*, *11*(4–5), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.06.003>
- Xu, G., Wang, J., Wang, L., Tian, X., Yang, H., Fan, K., Yang, K., & Tan, H. (2010). “Pseudo”  $\gamma$ -butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(35), 27440–27448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143081>
- Xu, Y., Willems, A., Au-Yeung, C., Tahlan, K., & Nodwell, J. R. (2012). A two-step mechanism for the activation of actinorhodin export and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *MBio*, *3*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00191-12>
- Xu, Y., You, D., & Ye, B. C. (2017). Nitrogen regulator GlnR directly controls transcription of genes encoding lysine deacetylases in Actinobacteria. *Microbiology*, *163*(11), 1702–1710. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000553>
- Xu, J., Zhang, J., Zhuo, J., Li, Y., Tian, Y., & Tan, H. (2017). Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansochromogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(48), 19708–19720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809145>
- Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Rioseras, B., Martín, J. F., Sánchez, J., & Manteca, A. (2014). Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086296>
- Yang, C., Huang, C., Zhang, W., Zhu, Y., & Zhang, C. (2015). Heterologous Expression of Fluostatin Gene Cluster Leads to a Bioactive Heterodimer. *Organic Letters*, *17*(21), 5324–5327. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02683>
- Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Lee, K., Kim, W. S., Park, S. S., Hahn, J. S., & Kim, B. G. (2009). NdgR, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(3), 501–511. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1802-x>
- Yeo, K. J., Han, Y. H., Eo, Y., & Cheong, H. K. (2013). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the extracellular sensory domain of DraK histidine kinase from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *69*(8), 909–911. <https://doi.org/10.1107/S1744309113018769>
- Yeo, K. J., Hong, Y. S., Jee, J. G., Lee, J. K., Kim, H. J., Park, J. W., Kim, E. H., Hwang, E., Kim, S. Y., Lee, E. G., Kwon, O., & Cheong, H. K. (2014). Mechanism of the pH-induced conformational change in the sensor domain of the DraK histidine kinase via the E83, E105, and E107 residues. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107168>
- Yeo, K. J., Kim, E. H., Hwang, E., Han, Y. H., Eo, Y., Kim, H. J., Kwon, O., Hong, Y. S., Cheong, C., & Cheong, H. K. (2013). pH-dependent structural change of the extracellular sensor domain of the DraK histidine kinase from *S. coelicolor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *431*(3), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.018>

- Yepes, A. (2006). Mutación y estudio de sistemas de dos componentes en *Streptomyces coelicolor*: reguladores globales de la producción de antibióticos [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Salamanca.
- 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., & Díaz, M. (2011). Novel Two-component Systems Implied in Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019980>
- Yin, S., Daum, R. S., & Boyle-Vavra, S. (2006). VraSR two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 336–343. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.336-343.2006>
- Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S., Tan, H., Lu, Y., & Jiang, W. (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 85(3), 535–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08126.x>
- Yu, Z., Zhu, H., Zheng, G., Jiang, W., & Lu, Y. (2014). A genome-wide transcriptomic analysis reveals diverse roles of the two-component system DraR-K in the physiological and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9351–9363. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6102-z>
- Zerikly, M., & Challis, G. L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *ChemBioChem*, 10(4), 625–633. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800389>
- Zhang, C., Zhao, W., Duvall, S. W., Kowallis, K. A., & Childers, W. S. (2022). Regulation of the activity of the bacterial histidine kinase PleC by the scaffolding protein PodJ. *Journal of Biological Chemistry*, 298(4), 101683. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101683>
- Zhang, G., Tian, Y., Hu, K., Feng, C., & Tan, H. (2010). *SCO3900*, co-transcribed with three downstream genes, is involved in the differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Current Microbiology*, 60(4), 268–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9536-2>
- Zhang, G., Tian, Y., Hu, K., Zhu, Y., Chater, K. F., Feng, C., Liu, G., & Tan, H. (2012). Importance and regulation of inositol biosynthesis during growth and differentiation of *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 83(6), 1178–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08000.x>
- Zhang, P., Wu, L., Zhu, Y., Liu, M., Wang, Y., Cao, G., Chen, X. L., Tao, M., & Pang, X. (2017). Deletion of MtrA inhibits cellular development of *Streptomyces coelicolor* and alters expression of developmental regulatory genes. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02013>
- Zhao, Y., Li, L., Zheng, G., Jiang, W., Deng, Z., Wang, Z., & Lu, Y. (2018). CRISPR/dCas9-Mediated Multiplex Gene Repression in *Streptomyces*. *Biotechnology Journal*, 13(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201800121>
- Zheng, G., Liu, P., He, W., Tao, H., Yang, Z., Sun, C., Wang, W., Lu, Y., & Jiang, W. (2021). Identification of the cognate response regulator of the orphan histidine kinase OhkA involved in both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14–15), 5905–5914. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11442-4>
- Zhu, Y., & Inouye, M. (2003). Analysis of the role of the EnvZ linker region in signal transduction using a chimeric Tar/EnvZ receptor protein, Tez1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22812–22819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300916200>
- Zhu, Y., Wang, X., Zhang, J., Ni, X., Zhang, X., Tao, M., & Pang, X. (2022). The regulatory gene *wblA* is a target of the orphan response regulator OrrA in *Streptomyces coelicolor*. *Environmental Microbiology*, 00(86). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15992>
- Zhu, Y., Zhang, P., Lu, T., Wang, X., Li, A., Lu, Y., Tao, M., & Pang, X. (2021). Impact of MtrA on phosphate metabolism genes and the response to altered phosphate conditions in *Streptomyces*. *Environmental Microbiology*, 23(11), 6907–6923. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15719>
- Zhu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Wang, J., Lu, Y., & Pang, X. (2020). Impact on Multiple Antibiotic Pathways Reveals MtrA as a Master Regulator of Antibiotic Production in *Streptomyces* spp. and Potentially in Other Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20). <https://doi.org/10.1128/AEM.01201-20>
- Zhu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Xu, W., Wang, X., Wu, L., Sheng, D., Ma, W., Cao, G., Chen, X. I., Lu, Y., Zhang, Y. Z., & Pang, X. (2019). The developmental regulator MtrA binds GlnR boxes and represses nitrogen metabolism genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 112(1), 29–46. <https://doi.org/10.1111/mmi.14252>

## BIBLIOGRAFÍA

Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>



# ANEXOS



## Anexo I. Sistemas de Dos Componentes de *Streptomyces coelicolor*

TCS completos en *S. coelicolor*:

Histidina Quinasa (HK)			Regulador de Respuesta (RR)			Organiz. (5'→3')
Gen	Nombre	Familia	Gen	Nombre	Familia	
<b>SCO0203</b>	<b>OsdK / DevS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO0204</b>	<b>OsdR / DevR</b>	<b>NarL</b>	<b>RR-HK</b>
SCO0422	-	Clásica	SCO0421	-	NarL	HK-RR
SCO0551	-	Clásica	SCO0552	-	OmpR	RR-HK
SCO1071	-	Clásica	SCO1070	-	NarL	HK-RR
SCO1137	-	Clásica	SCO1136	-	IclR	HK-RR
SCO1259	-	Clásica	SCO1260	-	NarL	HK-RR
SCO1369	-	Clásica	SCO1370	-	NarL	HK-RR
<b>SCO1744</b>	<b>AbrA1</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO1745</b>	<b>AbrA2</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO1802	-	Clásica	SCO1801	-	NarL	HK-RR
<b>SCO2121</b>	<b>MacS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO2120</b>	<b>MacR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO2142	-	Clásica	SCO2143	-	OmpR	HK-RR
<b>SCO2166<sup>a</sup></b>	<b>AbrB2</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO2165<sup>a</sup></b>	<b>AbrB1</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO2215	-	Clásica	SCO2216	-	NarL	HK-RR
SCO2307	-	Clásica	SCO2308	-	NarL	HK-RR
SCO2359	-	Clásica	SCO2358	-	NarL	HK-RR
<b>SCO2518</b>	<b>EcrA1</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO2517</b>	<b>EcrA2</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO2800	-	Clásica	SCO2801	-	OmpR	RR-HK
<b>SCO3012</b>	<b>MtrB</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3013</b>	<b>MtrA</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO3062</b>	<b>DraK</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3063</b>	<b>DraR</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO3225</b>	<b>AbsA1</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3226</b>	<b>AbsA2</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
<b>SCO3359</b>	<b>CseC</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3358</b>	<b>CseB</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO3390</b>	<b>SatK</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3389</b>	<b>SatR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
<b>SCO3589</b>	<b>VanS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO3590</b>	<b>VanR</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
SCO3639	-	Clásica	SCO3638	-	NarL	HK-RR
SCO3641	-	Clásica	SCO3640	-	NarL	HK-RR
SCO3654	-	Clásica	SCO3653	-	NarL	HK-RR
SCO3740	-	Clásica	SCO3741	-	OmpR	RR-HK
SCO3757	-	Clásica	SCO3756	-	NarL	HK-RR
SCO4021	-	Clásica	SCO4020	-	OmpR	RR-HK
<b>SCO4073</b>	<b>RagK</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4072</b>	<b>RagR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO4124	-	Clásica	SCO4123	-	NarL	HK-RR
<b>SCO4155<sup>b</sup></b>	<b>CssS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4156<sup>b</sup></b>	<b>CssR</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO4229</b>	<b>PhoR</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4230</b>	<b>PhoP</b>	<b>OmpR</b>	<b>HK-RR</b>
<b>SCO4275</b>	<b>SenS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4276</b>	<b>SenR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO4362	-	Clásica	SCO4363	-	NarL	HK-RR
<b>SCO4667</b>	<b>SitK</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4668</b>	<b>SitR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO4791	-	Clásica	SCO4792	-	NarL	HK-RR
<b>SCO4906</b>	<b>AfsQ2</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4907</b>	<b>AfsQ1</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
SCO5131	-	Clásica	SCO5132	-	NarL	HK-RR
<b>SCO5282</b>	-	<b>Clásica</b>	<b>SCO5283</b>	-	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO5378</b>	<b>ChiS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO5377</b>	<b>ChiR</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
<b>SCO5404</b>	<b>RapA2</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO5403</b>	<b>RapA1</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
SCO5435	-	Clásica	SCO5434	-	IclR	HK-RR

## ANEXOS

Histidina Quinasa (HK)			Regulador de Respuesta (RR)			Organiz. (5' → 3')
Gen	Nombre	Familia	Gen	Nombre	Familia	
SCO5454	-	Clásica	SCO5455	-	NarL	HK-RR
SCO5683	-	Clásica	SCO5684	-	NarL	HK-RR
<b>SCO5748</b>	<b>OsaA</b>	<b>Híbrida</b>	<b>SCO5749</b>	<b>OsaB</b>	<b>OsaB</b>	<b>HK-RR</b>
<b>SCO5779</b>	<b>GluK</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO5778</b>	<b>GluR</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
<b>SCO5784</b>	-	<b>Clásica</b>	<b>SCO5785</b>	-	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO5824	-	Clásica	SCO5825	-	NarL	HK-RR
SCO5829	-	Clásica	SCO5828	-	NarL	HK-RR
<b>SCO5863</b>	<b>CutS</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO5862</b>	<b>CutR</b>	<b>OmpR</b>	<b>RR-HK</b>
SCO5871	KdepD	Clásica	SCO5872	KdpE	OmpR	HK-RR
SCO6139	-	Clásica	SCO6140	-	NarL	HK-RR
SCO6163	-	Clásica	SCO6162	-	NarL	HK-RR
SCO6253	-	Clásica	SCO6254	-	NarL	HK-RR
SCO6353	-	Clásica	SCO6354	-	OmpR	RR-HK
SCO6362	-	Clásica	SCO6363	-	NarL	HK-RR
<b>SCO6421</b>	<b>EcrE1</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO6422</b>	<b>EcrE2</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-RR</b>
SCO6668	-	Clásica	SCO6667	-	NarL	HK-RR
SCO7076	-	Clásica	SCO7075	-	OmpR	RR-HK
SCO7089	-	Clásica	SCO7088	-	NarL	HK-RR
SCO7231	-	Clásica	SCO7230	-	OmpR	RR-HK
SCO7297	-	Clásica	SCO7298	-	TrxB	RR-HK
SCO7534	-	Clásica	SCO7533	-	OmpR	RR-HK
SCO7649	-	Clásica	SCO7648	-	NarL	HK-RR
SCO7711	-	Clásica	SCO7712	-	NarL	HK-RR
<b>TCS con organización de tríada</b>						
SCO0871	-	Clásica	SCO0870	-	CheY	RR-HK-RR
			SCO0872	-	RssB	
<b>SCO4597</b>	<b>AbrC2</b>	<b>Clásica</b>	<b>SCO4596</b>	<b>AbrC3</b>	<b>NarL</b>	<b>HK-HK-RR</b>
<b>SCO4598</b>	<b>AbrC1</b>	<b>Clásica</b>				

**oHK en *S. coelicolor*:**

Histidina Quinasa huérfana (oHK)		
Gene	Nombre	Familia
SCO0211	-	Classic
SCO0588	CvnA11	Classic
SCO0599	-	Classic
SCO0676	-	Classic
SCO0767	-	Classic
SCO0946	-	Classic
SCO1160	CvnA3	Classic
SCO1217	-	Classic
SCO1402	CvnA4	Classic
<b>SCO1596</b>	<b>OhkA</b>	<b>Classic</b>
<b>SCO1630</b>	<b>CvnA9</b>	<b>Classic</b>
SCO2452	-	Classic
SCO2879	CvnA12	Classic
SCO3119	-	Classic
SCO3284	-	Classic
SCO3750	-	Classic
SCO3796	-	Classic
SCO3948	-	Classic
SCO4009	-	Hybrid
SCO4120	-	Classic
SCO5040	-	Classic

Histidina Quinasa huérfana (oHK)		
Gene	Nombre	Familia
SCO5104	-	Classic
<b>SCO5239</b>	<b>PdtaS</b>	<b>Classic</b>
SCO5289	CvnA5	Classic
SCO5304	-	Classic
SCO5460	-	Classic
SCO5540	CvnA2	Classic
<b>SCO5544</b>	<b>CvnA1</b>	<b>Classic</b>
SCO6069	CvnA6	Classic
SCO6268	-	Classic
SCO6369	-	Classic
SCO6424	-	Classic
SCO6484	-	Classic
SCO6794	CvnA7	Classic
SCO6943	CvnA8	Classic
SCO7009	-	Classic
SCO7220	-	Classic
SCO7327	-	Hybrid
SCO7354	-	Classic
<b>SCO7422</b>	<b>CvnA10</b>	<b>Classic</b>
SCO7463	CvnA13	Classic

**oRR en *S. coelicolor*:**

Regulador de Respuesta huérfano (oRR)		
Gene	Nombre	Familia
SCO1220	-	LytTR
SCO1654	-	NarL
<b>SCO2013</b>	<b>PdtaR</b>	<b>AmiR</b>
SCO2152	-	CheY
<b>SCO2281</b>	<b>Aor1</b>	<b>NarL</b>
<b>SCO3008</b>	<b>OrrA</b>	<b>NarL</b>
SCO3134	-	NarL
SCO3144	-	NarL
<b>SCO3818</b>	-	<b>NarL</b>

Regulador de Respuesta huérfano (oRR)		
Gene	Nombre	Familia
<b>SCO4159</b>	<b>GlnR</b>	<b>OmpR</b>
SCO4201	-	RssB
<b>SCO4768</b>	<b>BldM</b>	<b>NarL</b>
SCO5006	-	ATPase
<b>SCO5351</b>	-	<b>CheY</b>
<b>SCO5881</b>	<b>RedZ</b>	<b>NarL</b>
<b>SCO6029</b>	<b>Whil</b>	<b>NarL</b>
SCO6364	-	OmpR
<b>SCO6685</b>	<b>RamR</b>	<b>NarL</b>



## Anexo II. Oligonucleótidos empleados

\*En la columna *Aplicación*, los oligonucleótidos utilizados como cebadores directos son aquellos marcados con (D), mientras que los utilizados como cebadores reversos son aquellos marcados con (R).

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	APLICACIÓN
SAM-051	ACGCCTACGTAAAAAAGCA CCGACTCGGTGCC	(R) Construcción del casete sgRNA. El sitio de restricción SnaBI está subrayado.
SAM-056	TCCACACGTGGCACC GCGAT	Secuenciación del casete sgRNA en los plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9.
SAM-057	AGAGCATCACCGCCTGTAC	Secuenciación del molde para la recombinación homóloga introducidos en el sitio XbaI en los plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9.
SAM-058	CTAACGTCTGGAAAGACGAC A	Secuenciación del molde para la recombinación homóloga introducidos en el sitio XbaI en los plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9.
SAM-067	CATGCCATGG <b><i>GCAGGACACG</i></b> <b><i>GATCGTCATAGTTTTAGAGC</i></b> TAGAAATAGC	(D) Construcción del casete sgRNA dirigido contra <i>abrB1/B2</i> . La secuencia guía está marcada en cursiva y negrita. El sitio de restricción NcoI está subrayado.
SAM-068	GCAGGACACGGATCGTCATA	(D) Comprobación del plásmido pCRISPR-sgB.
SAM-069	TTTTTTTCTAGAGGAGCTTG TCCTCGACGGCG	(D) Construcción del molde de homología de la región a 5' de <i>abrB1/B2</i> para CRISPR. El sitio de restricción XbaI está subrayado.
SAM-070	CCGGTACCGTAAAAGACCC CTCCGCCCGCGTGTACTGC	(R) Construcción del molde de homología de la región a 5' de <i>abrB1/B2</i> para CRISPR.
SAM-071	CAGTACACGCGGGCGGAGGG GTCTTTTACGGTAGCCGGA	(D) Construcción del molde de homología de la región a 3' de <i>abrB1/B2</i> para CRISPR.
SAM-072	TTTTTTTCTAGAGTCGGGCA AGCTGGAGGACC	(R) Construcción del molde de homología de la región a 3' de <i>abrB1/B2</i> para CRISPR. El sitio de restricción XbaI está subrayado.
DSM-002	TATATAAAGCTTCACTCCAC CCTTGGACGGACC	(D) Amplificación del operón <i>abrB1/B2</i> bajo su propio promotor. El sitio de restricción HindIII está subrayado.
DSM-004	TATATAGAATTCGGCGCCTT GCTTCGC	(R) Amplificación del operón <i>abrB1/B2</i> bajo su propio promotor. El sitio de restricción HindIII está subrayado.
RCD-001	CCCTGGTGGTCGCGCGTGG TCGGGC	(D) Comprobación externa de la delección genómica $\DeltaabrA1/A2$ (SCO1744/45).
RCD-002	GCTTCAACGTCCGCACCAGC AGCGGCGCCG	(R) Comprobación externa de la delección genómica $\DeltaabrA1/A2$ (SCO1744/45).
RCD-003	GTGGCGGCTCGTCCCGAC GGCGC	(D) Comprobación interna de la delección genómica $\DeltaabrA1/A2$ (SCO1744/45).
RCD-004	GCGGGGAGTCGGAGCGGTC AGCCGGG	(R) Comprobación interna de la delección genómica $\DeltaabrA1/A2$ (SCO1744/45).
RCD-005	ATGATCTTCCGCGGAAGGC	(D) Comprobación externa de la delección genómica $\DeltaabrB1/B2$ .
RCD-006	GGGTCAGGGTCTCTTCTG	(R) Comprobación externa de la delección genómica $\DeltaabrB1/B2$ .
RCD-007	GAGGAAGCCGGAGGCCCGG CCCCG	(D) Comprobación interna de la delección genómica $\DeltaabrB1/B2$ .
RCD-008	GCCGCGCTTCGTGCAGGCC ATCCGGG	(R) Comprobación interna de la delección genómica $\DeltaabrB1/B2$ .
RCD-009	GGACAAGGTCGAGAAGAAC	(D) RT-qPCR de <i>rpsL</i> (SCO4659)

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	APLICACIÓN
RCD-010	GAGTTCGGCTTCTTCGG	(R) RT-qPCR de <i>rpsL</i> (SCO4659)
RCD-011	CTTCTCCTTCTTGGCGC	(R) Amplificación del gen <i>rpsL</i> (SCO4659)
RCD-015	CCTCGAAGGTGGTCAGTATG	(D) RT-qPCR de <i>abrB1</i> (SCO2165)
RCD-016	ACGTGGTGCTGATGGAC	(R) RT-qPCR de <i>abrB1</i> (SCO2165)
RCD-017	CCTGGATGATGCGGTAGG	(D) RT-qPCR de <i>abrB2</i> (SCO2166)
RCD-018	AACTCGTCGCCACCTTC	(R) RT-qPCR de <i>abrB2</i> (SCO2166)
RCD-031	GAGTCCTTCGACGAGATGC	(D) RT-qPCR de <i>bfr</i> (SCO2113)
RCD-032	GAAGAGCCGCTGGTAGTTC	(R) RT-qPCR de <i>bfr</i> (SCO2113)
RCD-045	TCGTGATGATGCTGCAC	(D) RT-qPCR de <i>vanJ</i> (SCO3592)
RCD-046	CGAACAGACCGAACCAC	(R) RT-qPCR de <i>vanJ</i> (SCO3592)
RCD-047	ATGCTGTCCGAGTCCTTC	(D) RT-qPCR de <i>SCO7536</i>
RCD-048	CCAGTCCGGTGATCTTCTC	(R) RT-qPCR de <i>SCO7536</i>
RCD-049	TACGTGGCCCTCTACAC	(D) RT-qPCR de <i>ecrA1</i> (SCO2518)
RCD-050	TGGGTGTCGACGATGAG	(R) RT-qPCR de <i>ecrA1</i> (SCO2518)
RCD-051	GTCATCACGTTACCTTCC	(D) RT-qPCR de <i>redG</i> (SCO5897)
RCD-052	GATGTGCTCGGTGTTCTG	(R) RT-qPCR de <i>redG</i> (SCO5897)
RCD-053	TTGTTGCTGCTCATCTCTC	(D) RT-qPCR de <i>SCO6440</i>
RCD-054	TCGTGCGGGCTTCTTGAC	(R) RT-qPCR de <i>SCO6440</i>
RCD-059	ATATGCTAGCGCTCGGTACC AGCCCGACCCGAGCACGCGC	(D) Amplificación del promotor <i>ermE</i> *p. El sitio de restricción NheI está subrayado.
RCD-060	ATATCATATGTGGGGTCCCTC CTTGAGTGGTTCTGTATCC	(R) Amplificación del promotor <i>ermE</i> *p. El sitio de restricción NdeI está subrayado.
RCD-F-BH2281	ATAGGATCCATGGAACGTGA CGTGCGGCCCGCCCTGCG	(D) Amplificación del gen <i>aor1</i> . El sitio de restricción BamHI está subrayado.
RCD-R-2281HI	AATAAGCTTCTCGAGGTGGC GTGGCGCCCGCGCTTC	(R) Amplificación del gen <i>aor1</i> . El sitio de restricción HindIII está subrayado.
RCD-HKASP-01	ATAAGATCTCTAGTGCCTTC GACGAGATCCCGC	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 1). El sitio de restricción BglII está subrayado.
RCD-HKASP-02	ATAACTAGTTTTTGCTAAACA ACTTTCAACAGTTTCAGCGG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 1). El sitio de restricción SpeI está subrayado.
RCD-HKASP-03	ATAACTAGTGTGTTGGGCTG GACAATCGTG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.A). El sitio de restricción SpeI está subrayado.
RCD-HKASP-04	AATCAGCACACGCATTGGTT GCCTCCTTAGCAGGGTGC	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.A).
RCD-HKASP-05	TAAGGAGGCAACCAATGCGT GTGCTGATTGTCGAGGACG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.B).
RCD-HKASP-06	ATACCTAGGCTATCCACCGT CGCCGCCCGC	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.B). El sitio de restricción AvrII está subrayado.
RCD-HKASP-07	ATACCTAGGGATATCGCCGA ACAGCGGCGCTTCGCGGCC	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.C). El sitio de restricción AvrII está subrayado. El sitio de restricción EcoRV está doble subrayado
RCD-HKASP-08	ATAGCTAGCGTCATCCATCT GCACCGGTCGAGGCGGC	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.C). El sitio de restricción NheI está subrayado.
RCD-HKASP-09	ATAGCTAGCGATACCCGGAG TGCGTGAGCAGGGACAG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 3). El sitio de restricción NheI está subrayado.
RCD-HKASP-10	ATAGGATCCCCGAACGCCGC AGCGCCGTCAC	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 3). El sitio de restricción BamHI está subrayado.
RCD-HKASP-11	ATAGGATCCCGTCCGCCTGC CTGCTTTTGGCCGG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.A). El sitio de restricción BamHI está subrayado.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	APLICACIÓN
RCD-HKASP-12	ATACATATGTACGTATACGG CGTCTGCGGACCGGCCGGG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.A). El sitio de restricción Ndel está subrayado. El sitio de restricción SnaBI está doble subrayado
RCD-HKASP-13	ATACATATGGCCTCTATTCA AGGCGCCTCGGTGTTGCCG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B). El sitio de restricción Ndel está subrayado.
RCD-HKASP-14	ATAACTAGTGTTCATGGTCCG GGTCGGCACCCACGCGG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B). El sitio de restricción SpeI está subrayado.
RCD-HKASP-15	ATAACTAGTGGCGTCAGCTA CGATGTTCCGGGGACTGC	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 5). El sitio de restricción SpeI está subrayado.
RCD-HKASP-16	ATATTTAAAGTCCGCTCCCT TCTCTGACGCCGTCCACG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 5). El sitio de restricción DraI está subrayado.
RCD-HKASP-17	ATACCTAGGCTATCCACCGT CGCCG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 2.AB). El sitio de restricción AvrII está subrayado.
RCD-HKASP-18	GAAGGCGTTCACGACCTCT ACGTCC	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B1).
RCD-HKASP-19	CCCGTATGCGCTTTTCGATA TGCTGACGATATATTACC	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B1).
RCD-HKASP-20	GGTAATATATCGTCAGCATA TCGAAAAGCGCATACGGG	(D) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B2).
RCD-HKASP-21	GGACGGTGGATTTTCGCGTTG CG	(R) Construcción del casete HKASP (Módulo 4.B2).
RCD-HKASP-22	CCAGGGCCAGTACGTCTTCT GGGACACCGACG	(D) Construcción del molde de homología de la región a 5' de <i>vanK</i> para CRISPR.
RCD-HKASP-23	GCTCGGCTGCACGCGCGCCA GGGCCCGCCATCGGC	(R) Construcción del molde de homología de la región a 5' de <i>vanK</i> para CRISPR.
RCD-HKASP-24	CGGGCCCTGGCGCGCGTGCA GCCGAGCAGCCGAGCAG	(D) Construcción del molde de homología de la región a 3' de <i>vanK</i> para CRISPR.
RCD-HKASP-26	CATGCCATGG <b>GACCTCTATA</b> <b>TGAAGCGACG</b> GTTTTAGAGC TAGAAATAGC	(D) Construcción del casete sgRNA dirigido contra <i>vanK</i> . La secuencia guía está marcada en cursiva y negrita. El sitio de restricción NcoI está subrayado.
RCD-HKASP-28	CGTCCGGCTTCGGGCTCGGC GCCGACGACTACCTGACC	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-29	GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAA CCGTA AAAAAGGCCGCG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-30	CACCACCGACTATTTGCAAC AGTGCCGTTGATCGTGC	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-31	CCAGAGGGCGGGATGCGAAG AATGCGATGCCGCTCG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-32	GGAACACTACAGCGAACCGAAG ACGGCAACCCGCCGCTCG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-33	GGTTGTGACCGGGGTGGACA CGTACGCGGGTGCTTACG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-34	GCCTGGGACCCGGAACCGT TATGCGAATCCTTCGGG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-35	GACGCCGACGCTGACCCGAC CGGCCCTAAGTCGTGG	Secuenciación del plásmido HKASP.
RCD-HKASP-36	ATACCTAGGGTGAGCACCCG ACTGCTCCCGCTGCTCATCG	(D) Amplificación de un fragmento del gen <i>gluK</i> (nt 1-747). El sitio de restricción AvrII está subrayado.
RCD-HKASP-37	ATATACGTACAGAACGTCCT CCACGTGGTCGGCCATCTCG	(R) Amplificación de un fragmento del gen <i>gluK</i> (nt 1-747). El sitio de restricción SnaBI está subrayado.
RCD-HKASP-40	ATACATATGGCTCAGAATCC CCCGTTCGGCGGCC	(D) Amplificación del gen <i>xysA</i> . El sitio de restricción Ndel está subrayado.

## ANEXOS

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	APLICACIÓN
RCD-HKASP-41	ATAT <u>ACGTAC</u> AGCTTCCTTT CGGGCTTTGTTAGCAGCCGG	<b>(R)</b> Amplificación del gen <i>xysA</i> . El sitio de restricción <i>Sna</i> BI está subrayado.
RCD-HKASP-42	ATACATATGCTGCGGCCCGT CGAAACCCCGACCCGCG	<b>(D)</b> Amplificación del gen <i>gusA</i> . El sitio de restricción <i>Nde</i> I está subrayado.
RCD-HKASP-43	ATAT <u>ACGTAG</u> CTTATCACTG CTTCCCGCCCTGCTGCGGC	<b>(R)</b> Amplificación del gen <i>gusA</i> . El sitio de restricción <i>Sna</i> BI está subrayado.
RCD-HKASP-44	TATATCTAGACGCCGTC AAC GCGACGATGATCCTGCTCGC	<b>(R)</b> Construcción del molde de homología de la región a 3' de <i>vanK</i> para CRISPR. El sitio de restricción <i>Xba</i> I está subrayado.
SEQ-HKASP-RMF	GAAGCGACGTGGTCGATGAG CCGCCACCCACG	Secuenciación del Módulo Reportero (Plataforma HKASP).
SEQ-HKASP-RMR	GTCAGACGGCCGCTGAGGGA CCGCGACCACCCCTCC	Secuenciación del Módulo Reportero (Plataforma HKASP).
SEQ-HKASP-SMF	GGATCATCGCCACCGTGCCG GGCGTCGGCTACCGC	Secuenciación del Módulo Sensor (Plataforma HKASP).
SEQ-HKASP-SMR	GCGGGCCACGTCGAGGATGG CCTTCGAGACGGCCAGC	Secuenciación del Módulo Sensor (Plataforma HKASP).