



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA  
Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

Efecto de la concentración citosólica de  
cobre en la germinación y el metabolismo  
secundario de *Streptomyces coelicolor*

Nathaly González Quiñonez

Oviedo, 2018

Tesis Doctoral









UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA  
Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

Tesis Doctoral

Efecto de la concentración citosólica de  
cobre en la germinación y el metabolismo  
secundario de *Streptomyces coelicolor*

Nathaly González

Ángel Manteca

Carlos Olano

M<sup>a</sup> Teresa López











## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| 1.- Título de la Tesis   |  |
|--|--|
| Español/Otro Idioma:<br>Efecto de la concentración citosólica de cobre en la germinación y el metabolismo secundario de <i>Streptomyces coelicolor</i> | Inglés:<br>Cytosolic copper modulates spore germination and secondary metabolism in <i>Streptomyces coelicolor</i> |
| 2.- Autor  |  |
| Nombre:<br>Nathaly del Valle González Quiñonez   | DNI/Pasaporte/NIE:   |
| Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular   |  |
| Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias  |  |

### RESUMEN (en español)

Las bacterias del género *Streptomyces* producen gran variedad de compuestos bioactivos (antibióticos, antitumorales, antifúngicos, etc.). Son uno de los grupos bacterianos más importantes en biotecnología y tienen un ciclo de vida complejo, con procesos de muerte celular programada (MCP), diferenciación morfológica y fisiológica, y esporulación.

El objetivo de esta tesis fue profundizar en la función de genes de *Streptomyces* que formen parte de las rutas biomoleculares que regulan sus procesos de diferenciación y MCP de *Streptomyces*, especialmente aquellas relacionadas con la activación del metabolismo secundario. Tras realizar experimentos de mutagénesis en genes detectados en trabajos previos de nuestro grupo como diferencialmente expresados durante el desarrollo, nos centramos en el estudio de la cepa mutada en los genes *SCO2730/2731* (chaperona de cobre, CopZ/transportador de cobre, CopA). Esta cepa tenía un retraso en la germinación, crecimiento y esporulación, pero también mostraba un aumento notable de la producción de metabolitos secundarios, y lo que es más importante, en esta cepa el metabolismo secundario estaba permanentemente activado, ya que producía metabolitos secundarios desde la germinación.

Para complementar el fenotipo del mutante, fue necesario un plásmido integrativo que tuviera efecto neutro en el fenotipo de *Streptomyces*. Elegimos el sistema del fago  $\Phi$ BT1, cuyo sitio *attB* en *S. coelicolor* se ubica en el gen



SCO4848. Se empleó el plásmido pMS82( $\Phi$ BT1), y se encontró que la integración de pMS82 en el cromosoma de *S. coelicolor* causa un retraso en la germinación. Se comprobó que los genes SCO4848 y SCO4849 se transcriben a partir de un mismo promotor y demostramos que, el fenotipo en germinación se debe a una alteración en la expresión del gen SCO4849. Por ello, se introdujo una copia del gen SCO4849 bajo el control de la región promotora de SCO4848 en el plásmido pMS82, creando el plásmido pNG1. A pNG1 se le introdujo el promotor  $P_{ermE}^*$  para crear un plásmido (pNG2) útil para la sobreexpresión génica. A ambos vectores se les incluyó una copia del gen *bla* (resistencia a ampicilina) para facilitar la selección en *E. coli* (plásmidos pNG3 y pNG4 respectivamente). La integración de los plásmidos pNG1-4 en el cromosoma, no afecta la germinación ni otras fases del desarrollo de *S. coelicolor* ni de la mayoría de los estreptomicetos analizados.

Se complementó la cepa mutada en SCO2730/2731 introduciendo las ORFs de los genes mutados bajo la expresión de sus regiones promotoras. Para ello utilizamos el plásmido pNG3. Posteriormente, mediante experimentos de RNAseq, cuantificación de cobre citosólico en el micelio y en esporas individuales y PCR cuantitativas, entre otras metodologías, se comprobó que el sistema SCO2730/2731 es responsable de la regulación de los niveles de cobre citosólico durante la germinación y que su sistema análogo SCO1045/1046 desempeña un papel central en la homeostasis del cobre en la fase micelial.

Planteamos un modelo para *S. coelicolor* que correlaciona la concentración de cobre citosólico con la germinación, la diferenciación fisiológica (activación del metabolismo secundario) y morfológica, así como con la expresión de genes relacionados con el transporte de cobre. Los niveles de cobre citosólico son los que regulan, mediante su efecto en la actividad de reguladores transcripcionales, la germinación y el metabolismo secundario. La concentración de cobre citosólico se tampona de forma muy precisa por medio de transportadores específicos. La única forma de conseguir la concentración de cobre citosólico óptima para activar el metabolismo secundario durante todo el ciclo de desarrollo de *Streptomyces* es la mutagénesis del sistema de transporte SCO2730/2731, lo que puede tener aplicaciones industriales que deben ser exploradas en el futuro.



## RESUMEN (en Inglés)

Members of the *Streptomyces* genus produce a wide variety of bioactive compounds (antibiotics, antitumor, antifungal, etc.). Streptomycetes are one of the most important bacterial groups in biotechnology. They have a complex life cycle, which includes programmed cell death (PCD), morphological and physiological differentiation, and sporulation.

The goal of this thesis was deep in the characterisation of the biomolecular pathways regulating *Streptomyces* differentiation and PCD, especially those pathways involved in secondary metabolism activation. We mutated genes detected by our group as differentially expressed during development. This thesis focuses on the study of the most outstanding mutant, the *S. coelicolor* strain mutated in the *SCO2730/2731* genes (copper chaperone, CopZ / copper transporter, CopA). This strain has a delay in germination, growth and sporulation, but also shows an outstanding increasing in the production of secondary metabolites, and what is more important, secondary metabolism is permanently activated in this strain. The *SCO2730/2731* mutant produces secondary metabolites since germination.

To complement the phenotype of the mutant, we needed an integrative plasmid with neutral effect on the *Streptomyces* phenotype. We chose the phage system  $\Phi$ BT1, whose *attB* site in *S. coelicolor* is located in the *SCO4848* gene. pMS82 ( $\Phi$ BT1 plasmid) was used, and we found that the integration of pMS82 into the *S. coelicolor* chromosome, causes a delay in germination. We demonstrated that the *SCO4848* and *SCO4849* genes are transcribed from the same promoter, and that the phenotype in germination is due to the alteration in the *SCO4849* expression. Therefore, a copy of the *SCO4849* gene was introduced under the control of the promoter region of *SCO4848* in the pMS82 plasmid, creating pNG1. The *Perme\** promoter was introduced into pNG1 to create pNG2, a plasmid useful for gene overexpression. A copy of the *bla* gene (ampicillin resistance) was included in both vectors to facilitate selection in *E. coli* (pNG3 and pNG4 plasmids respectively). The integration of plasmids pNG1-4 in the chromosome does not affect the germination or other stages of the development of *S. coelicolor* and most of the streptomycetes analysed.

*SCO2730/2731* mutant was complemented introducing the *SCO2730/2731* ORFs under the control of their own promoter regions. For this we use plasmid



pNG3. Through RNAseq, cytosolic copper quantification in mycelium and in individual spores, and quantitative PCR, together with other methodologies, we discover that the *SCO2730/2731* system is responsible, for the regulation of cytosolic copper during germination. By contrast, the *SCO1045/1046* system plays a central role in copper homeostasis in the mycelium.

We propose a model, in *S. coelicolor*, correlating cytosolic copper with germination, physiological (secondary metabolism activation) and morphological differentiation, as well as with the expression of genes related to copper transport. Cytosolic copper modulates the activity of transcriptional regulators that control germination, morphological differentiation and secondary metabolism. The concentration of cytosolic copper is accurately buffered. The only way to achieve the optimal copper concentration to activate secondary metabolism during the entire *Streptomyces* development cycle, is the mutagenesis of the *SCO2730/2731* transport system. Further work will be necessary to explore the putative industrial applications of this knowledge.







*A mi familia*



# Agradecimientos

Alcanzar este nivel académico y hacerlo en este lado del mundo, es algo que no hubiera sido posible sin el apoyo y colaboración de muchas personas. No sólo agradezco haber estado aquí, sino haber tenido la fortuna de trabajar en lo que me gusta y para lo que me formé en mi país, Venezuela.

Al programa de Becas Severo Ochoa (FICYT, Consejería de Educación y Ciencia, Asturias) por la financiación de esta tesis doctoral.

Al Dr. Ángel Manteca, director de esta tesis, por creer en mí dándome la oportunidad de formar parte de su grupo y de llevar a cabo este trabajo. Por su paciencia y guía constante durante estos años.

A la Dra. M<sup>a</sup> Teresa López, codirectora de esta tesis, por su ayuda en el laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y enseñarme sus protocolos, por su apoyo y correcciones.

A los Dres. María Montes y Mario Corte, y a Roberto Álvarez del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, por su colaboración en el procesamiento de las muestras por ICP-MS.

A Marta Alonso Guervos y Ángel Martínez Nistal de Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, por su ayuda en la microscopía confocal.

Al Dr. Luis Menéndez y la Dra. Ana Baamonde, por su amabilidad y disposición para aclarar dudas relacionadas con el doctorado.

A mis compañeras de laboratorio y amigas (Maite, Paula, BeaLab, BeaTec) por enseñarme a trabajar en el laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Por enseñarme sobre cultura española. Por estar ahí para compartir mis alegrías y preocupaciones, por darme consejos profesionales y personales. Y a Gemma, nuestra nueva integrante, por su apoyo y compañía en el laboratorio, las risas y conversaciones. A los que también han formado parte de nuestro grupo de laboratorio, Annalisa, Lucía y David, por haber sido parte del proceso.

A Jessica y Anais, por las conversaciones y su apoyo especialmente en estos últimos meses.

A Paula y Andrea, porque al poco tiempo de conocernos pasamos de compañeras de piso a ser amigas, por tan grata convivencia y por seguir siendo #elCristoTeam.

A Giovanni y Martina, por su hospitalidad, por el aprendizaje mutuo de culturas y los momentos *foodies*.

A Irene, por su amistad, apoyo y cariño. Por las conversaciones sobre nuestras metas y nuestras formas de ver la vida.

A Lisset, por tratarme como una hija desde que nos conocimos y por trasladarme a kilómetros de aquí con su espontaneidad. A Joanna, por su amistad y cariño.

A Lourdes y Carlos, por transmitirme su profesionalidad sin dejar de ser cercanos. A Belén, Rosa, Greta, Silvia y Paula por los momentos compartidos y las risas en las clases de Lourdes.

A Carlos Fernández y su familia, por integrarme en su familia y transmitirme su cariño. A Toñi y Cristóbal, Garay y su familia, Daniela, Meche y Miguelangel, y la familia de Bealab, por adoptarme en festividades navideñas o en otros momentos y hacerme sentir parte de sus familias.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Venezuela, por haberme dado las herramientas para llegar a donde estoy. Por la calidad humana y profesional de quienes me dieron clases.

Al Dr. Gustavo Fermín, por su amistad y cariño. Por transmitirme siempre que la felicidad es el camino y no el destino. Por guiar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y sus sabios consejos.

A mis amigas de Mérida, Mari, Clau, Romi, Mary, Albanita, Eli, Nieves, por el apoyo y cariño que vence fronteras y supera diferencias horarias. Algún día nos reencontraremos en nuestra latitud perfecta, donde calienta el sol y la lluvia refresca.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional, por haber estado ahí en todo momento dándome su amor desde que tengo recuerdos. Por enseñarme muchas de las cosas que definen la persona que soy hoy en día. A mis abuelos, tías, tíos y primas, por estar siempre cerca y pendientes. A mis padres y hermana, sin ellos no sería la persona que soy ni hubiera llegado a donde estoy.

A David, por tantísimo apoyo y amor especialmente en los meses de escritura de esta tesis. Por aguantarme en mi modo "estresicienta" pretesis y calmarme en mis momentos "quiero ir a Mérida". Por convertirse en mi compañero y darme un hogar en estas tierras. Por estar en el desenlace de esta etapa, entender lo que implica y ayudarme siempre que ha podido.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| <b>I.1. Género <i>Streptomyces</i></b> .....                                     | 1  |
| I.1.1. Características del género <i>Streptomyces</i> .....                      | 1  |
| I.1.2. Potencial biotecnológico del género <i>Streptomyces</i> .....             | 2  |
| <b>I.2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i></b> .....                           | 4  |
| I.2.1. Germinación en <i>Streptomyces</i> .....                                  | 5  |
| a) Fases de la germinación .....   | 6  |
| I.2.2. Desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio sólido .....                   | 11 |
| I.2.3. Desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio líquido .....                  | 13 |
| I.2.4. Desarrollo de <i>Streptomyces</i> en condiciones naturales (suelos) ..... | 14 |
| I.2.5. Muerte celular programada en <i>Streptomyces</i> .....                    | 16 |
| <b>I.3. Regulación del desarrollo de <i>Streptomyces</i></b> .....               | 17 |
| I.3.1. Cascadas de regulación .....  | 17 |
| I.3.2. Factores nutricionales y moléculas de señalización química .....          | 22 |
| a) Efectos del carbono, nitrógeno y fosfato .....                                | 22 |
| b) Moléculas de señalización química .....                                       | 23 |
| c) Metales esenciales .....  | 24 |
| <b>I.4. Efecto del cobre en la diferenciación de <i>Streptomyces</i></b> .....   | 24 |
| I.4.1. Cobre en bacterias .....  | 25 |
| I.4.2. Cobre y diferenciación de <i>Streptomyces</i> .....                       | 29 |
| <b>I.5. Manipulación genética en <i>Streptomyces</i></b> .....                   | 35 |
| I.5.1. Genoma de <i>Streptomyces</i> .....                                       | 36 |
| I.5.2. Mutagénesis en <i>Streptomyces</i> .....                                  | 37 |
| I.5.3. Plásmidos integrativos en <i>Streptomyces</i> .....                       | 37 |

|   |    |
|---|----|
| <b>I. OBJETIVOS</b> .....   | 40 |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 41 |
| <b>II.1. Obtención, validación y análisis fenotípico de mutantes insercionales en <i>S. coelicolor</i></b> .....  | 41 |
| II.1.1. Obtención de mutantes insercionales en <i>S. coelicolor</i> .....   | 41 |
| II.1.2. Validación de los mutantes de <i>S. coelicolor</i> generados por la inserción con el transposón Tn5062 .....  | 45 |
| a) Comprobación mediante amplificación por PCR .....  | 47 |
| b) Comprobación de mutantes mediante <i>Southern Blot</i> .....   | 48 |
| II.1.3. Búsqueda de fenotipos en los mutantes de <i>S. coelicolor</i> obtenidos .....   | 50 |
| <b>II.2. Construcción de los plásmidos pNG1-4 y caracterización de los fenotipos que generan al integrarse en el cromosoma de <i>Streptomyces</i></b> ..... | 52 |
| II.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo .....  | 52 |
| II.2.2. Estudio del sitio de integración de $\phi$ BT1 .....  | 54 |
| II.2.3. Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO4848</i> y <i>SCO4849</i> .....   | 55 |
| a) Extracción de ARN total .....  | 55 |
| b) Análisis de expresión génica mediante transcripción inversa (RT-PCR).....  | 56 |
| b.1) Comprobación de la transcripción acoplada de los genes <i>SCO4848</i> y <i>SCO4849</i> .....   | 57 |
| b.2) Análisis de la transcripción del gen <i>SCO4849</i> .....  | 57 |
| II.2.4. Construcciones génicas realizadas con ADN sintético .....   | 58 |
| II.2.5. Construcción del plásmido integrativo pNG1 .....  | 61 |
| II.2.6. Construcción del plásmido integrativo pNG2 .....  | 64 |
| II.2.7. Construcción del plásmido integrativo pNG3 .....  | 65 |
| II.2.8. Construcción del plásmido integrativo pNG4 .....  | 66 |
| II.2.9. Análisis fenotípico de los plásmidos pNG1-4 integrados en el cromosoma de <i>S. coelicolor</i> .....  | 66 |

|  |           |
|--|-----------|
| a) Cuantificación de la germinación de las esporas .....   | 66        |
| b) Cuantificación de la producción de antibióticos .....   | 67        |
| c) Curvas de crecimiento, cuantificación de proteína .....   | 68        |
| <b>II.3. Estudio del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> .....</b>  | <b>68</b> |
| II.3.1. Análisis fenotípico del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> .....   | 68        |
| a) Condiciones de cultivo .....  | 68        |
| b) Curvas de crecimiento, germinación, y seguimiento del ciclo de desarrollo al microscopio láser confocal .....                                     | 69        |
| c) Cuantificación de la producción de antibióticos .....   | 69        |
| II.3.2. Análisis bioinformático de la conservación de los genes <i>SCO2730 (copZ)</i> y <i>SCO2731 (copA)</i> en el género <i>Streptomyces</i> ..... | 70        |
| II.3.3. Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO2728-SCO2731</i> .....   | 70        |
| a) Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO2728</i> y <i>SCO2729</i> ....  | 71        |
| b) Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO2729</i> y <i>SCO2730</i> ....  | 71        |
| c) Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO2730</i> y <i>SCO2731</i> ....  | 72        |
| II.3.4. Complementación del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> .....   | 73        |
| a) Genes sintetizados .....  | 74        |
| b) Construcción de pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2730</i> .....   | 75        |
| c) Construcción de pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2730/2731</i> .....  | 75        |
| d) Construcción de pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2731</i> .....   | 75        |
| e) Construcción de pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2730/2731</i> .....   | 76        |
| f) Construcción de pNG3-P <sub>1</sub> <i>SCO2730/2731</i> .....   | 76        |
| g) Construcción pNG3-P <sub>2</sub> <i>SCO2730/2731</i> .....  | 77        |
| h) Construcción pNG3-P <sub>3</sub> <i>SCO2730/2731</i> .....  | 78        |
| i) Construcción pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2730</i> .....   | 79        |
| j) Construcción pNG3-P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> <i>SCO2731</i> .....   | 79        |
| II.3.5. Determinación de la concentración de cobre intracelular .....  | 80        |

|   |     |
|---|-----|
| a) Preparación de muestras para la cuantificación de cobre intracelular en el micelio .....   | 80  |
| b) Preparación de muestras para la medida de cobre en esporas ...   | 81  |
| b.1) Muestras de esporas para cuantificación de cobre total .....   | 82  |
| b.2) Muestras para cuantificación de cobre en esporas individuales ( <i>single cell</i> ) .....   | 82  |
| c) Cuantificación de cobre intracelular total (en esporas y micelio) y el cobre en esporas individuales ( <i>single cell</i> ) .....      | 82  |
| II.3.6. Análisis de expresión del gen <i>SCO2730</i> y de genes relacionados con su función .....   | 84  |
| a) Cultivos y extracción de ARN .....   | 85  |
| b) Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa (RT-PCR).....   | 85  |
| c) PCR cuantitativa (qPCR) .....  | 86  |
| II.3.7. <i>RNAseq</i> y análisis bioinformáticos .....  | 87  |
| a) Cultivos y muestras analizadas .....   | 87  |
| b) <i>RNAseq</i> .....  | 88  |
| <b>III.RESULTADOS</b> .....   | 89  |
| <b>III.1. Mutantes por inserción en <i>S. coelicolor</i></b> .....  | 89  |
| <b>III.2. Nuevos plásmidos integrativos basados en <math>\Phi</math>BT1</b> .....   | 90  |
| III.2.1. Fenotipo causado por la integración de pMS82 en el genoma de <i>S. coelicolor</i> .....  | 90  |
| III.2.2. Integración de $\Phi$ BT1 en el cromosoma de <i>S. coelicolor</i> .....  | 93  |
| III.2.3. Construcción de plásmidos integrativos basados en $\Phi$ BT1 que restauran la expresión del gen <i>SCO4849</i> .....             | 98  |
| III.2.4. Integración de los plásmidos con el sitio de integración $\Phi$ BT1 en otros estreptomicetos .....                               | 106 |
| <b>III.3. Función de los genes <i>SCO2730</i> (<i>copZ</i>) y <i>SCO2731</i> (<i>copA</i>)</b> .....                                      | 111 |
| III.3.1. Conservación de los genes <i>SCO2730</i> ( <i>copZ</i> ) y <i>SCO2731</i> ( <i>copA</i> ) en el género <i>Streptomyces</i> ..... | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| III.3.2. Efectos de la interrupción del gen <i>SCO2730 (copZ)</i> en la germinación y la producción de antibiótico .....   | 114 |
| a) Análisis de la transcripción de los genes <i>SCO2730</i> y <i>SCO2731</i> en el mutante en <i>SCO2730 (copZ)</i> .....  | 114 |
| b) Análisis del ciclo de vida en el mutante en <i>SCO2730 (copZ)</i> .....   | 116 |
| c) Análisis de la producción de antibióticos en el mutante en <i>SCO2730 (copZ)</i> .....  | 118 |
| III.3.3. Relación entre el fenotipo del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> y la expresión de los genes <i>SCO2730</i> y <i>SCO2731</i> .....   | 119 |
| III.3.4. Papel de las proteínas <i>SCO2730 (CopZ)</i> y <i>SCO2731 (CopA)</i> en la secreción de cobre durante la germinación .....  | 122 |
| III.3.5. Función del cobre citosólico en la germinación de las esporas .....   | 127 |
| III.3.6. Comparación de los transcriptomas del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> y la cepa silvestre de <i>S. coelicolor</i> (esporas Wt y Wt80Cu) durante la germinación .....                                     | 130 |
| a) Diferencias entre los transcritos de las cepas <i>SCO2730::Tn5062</i> y Wt .....  | 130 |
| a.1) Genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios.....  | 135 |
| a.2) Genes cuya función está relacionada con el cobre.....   | 135 |
| a.3) Genes relacionados con la germinación.....  | 136 |
| b) Diferencias entre los transcriptomas de las cepas Wt80Cu y Wt.....  | 137 |
| b.1) Genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios.....  | 137 |
| b.2) Genes cuya función está relacionada con el cobre .....  | 139 |
| c) Genes diferencialmente expresados en las cepas <i>SCO2730::Tn5062</i> y Wt80Cu comparados con la cepa Wt .....  | 140 |
| <b>IV.DISCUSIÓN</b> .....  | 143 |
| <b>IV.1. La cepa de <i>S. coelicolor</i> afectada en la expresión de los genes <i>SCO2730 (copZ)</i> y <i>SCO2731 (copA)</i> tiene alterada la germinación, el crecimiento y el metabolismo secundario</b> ..... | 143 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>IV.2. Los plásmidos pNG1-4 no afectan el fenotipo de <i>S. coelicolor</i> al integrarse en el cromosoma .....</b>   | <b>143</b> |
| <b>IV.3. La expresión de los genes <i>SCO2728-2731</i> es compleja y está controlada por al menos 4 promotores .....</b>   | <b>148</b> |
| <b>IV.4. La concentración citosólica de cobre regula la germinación, el crecimiento, el metabolismo secundario y la diferenciación de <i>S. coelicolor</i> .....</b>   | <b>150</b> |
| <b>IV.5. Las proteínas <i>SCO2730 (CopZ)/2731 (CopA)</i> son responsables de la liberación de cobre durante la germinación y tienen mayor afinidad por el Cu(I) que el sistema <i>SCO1045 (CopZ)/1046 (CopA)</i> .....</b> | <b>150</b> |
| <b>IV.6. La asincronía en la germinación de las esporas depende de los niveles de cobre citosólico en esporas individuales .....</b>   | <b>152</b> |
| <b>IV.7. Los niveles de cobre citosólico controlan la germinación, el metabolismo primario/secundario y la esporulación .....</b>  | <b>154</b> |
| IV.7.1. Efecto del cobre citosólico en la cepa silvestre de <i>S. coelicolor</i> .....   | 154        |
| IV.7.2. Efecto del cobre citosólico en el mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> ....  | 160        |
| IV.7.3 Relación entre el cobre citosólico, la expresión génica y la diferenciación de <i>Streptomyces</i> .....  | 161        |
| IV.7.4 Posibles aplicaciones industriales del mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> .....   | 162        |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>164</b> |
| <b>VI. REFERENCIAS .....</b>   | <b>166</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Antibióticos descubiertos entre los años 1940 y 2006 .....  | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Fases de la germinación de <i>Streptomyces</i> .....  | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> en medio sólido .....  | 13 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema del desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio sólido .....   | 14 |
| <b>Figura 5.</b> Desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio líquido .....  | 15 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema del desarrollo de <i>Streptomyces</i> en condiciones naturales (suelos) .....   | 15 |
| <b>Figura 7.</b> Mecanismos de regulación del cobre en bacterias Gram positivas y Gram negativas .....   | 27 |
| <b>Figura 8.</b> Homeostasis del cobre en <i>Enterococcus hirae</i> .....  | 29 |
| <b>Figura 9.</b> Algunas de las proteínas asociadas al cobre en el citoplasma y en el ambiente extracelular de <i>Streptomyces</i> .....           | 32 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema propuesto para la regulación del cobre en <i>S. lividans</i> .....   | 34 |
| <b>Figura 11.</b> Esquema de la estructura del transposón Tn5062 y su inserción en el gen mutado .....   | 50 |
| <b>Figura 12.</b> Plásmido pMS82 .....   | 55 |
| <b>Figura 13.</b> Promotores, P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> y P <sub>3</sub> , que regulan la expresión del gen <i>SCO2730</i> .....             | 73 |
| <b>Figura 14.</b> Diferenciación de las cepas silvestre y pMS82 de <i>S. coelicolor</i> en cultivos sólidos (medio GYM) .....                      | 91 |
| <b>Figura 15.</b> Efecto de la integración de pMS82 en la germinación de <i>S. coelicolor</i> .....  | 92 |
| <b>Figura 16.</b> Esquema de la integración de pMS82 en el cromosoma de <i>S. coelicolor</i> ...   | 93 |
| <b>Figura 17.</b> PCR para confirmar la inserción de plásmidos basados en $\Phi$ BT1 en el sitio <i>attB-SCO4848</i> de <i>S. coelicolor</i> ..... | 95 |
| <b>Figura 18.</b> Comparación de la secuencia de la proteína SCO4848 con sus versiones alternativas (SCO4848int1 y SCO4848int2) .....              | 96 |
| <b>Figura 19.</b> Análisis transcripcional de los genes <i>SCO4848</i> y <i>SCO4849</i> .....  | 97 |
| <b>Figura 20.</b> Diseño de secuencias a incluir en plásmidos integrativos basados en $\Phi$ BT1 .....   | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 21.</b> Plásmido integrativo pNG1 .....   | 99  |
| <b>Figura 22.</b> Construcción de pMS82 modificado con P <sub>SCO4848</sub> +SCO4848+SCO4849 .....  | 100 |
| <b>Figura 23.</b> Restauración de la germinación en la cepa <i>S. coelicolor</i> [pNG1] .....   | 101 |
| <b>Figura 24.</b> Crecimiento y producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> con y sin plásmido integrativo .....   | 102 |
| <b>Figura 25.</b> Diferenciación de las cepas silvestre y pNG1 de <i>S. coelicolor</i> en cultivos sólidos (medio GYM) .....  | 103 |
| <b>Figura 26.</b> Plásmido integrativo pNG2 .....   | 104 |
| <b>Figura 27.</b> Plásmido integrativo pNG3 .....   | 105 |
| <b>Figura 28.</b> Plásmido integrativo pNG4 .....   | 106 |
| <b>Figura 29.</b> Alineamiento de la secuencia de SCO4848 de <i>S. coelicolor</i> y sus ortólogos en otros estreptomicetos .....                                    | 107 |
| <b>Figura 30.</b> Alineamiento de la secuencia de SCO4849 de <i>S. coelicolor</i> y sus ortólogos en otros estreptomicetos .....                                    | 108 |
| <b>Figura 31.</b> Germinación en <i>S. lividans</i> , <i>S. griseus</i> y <i>S. clavuligerus</i> con y sin pMS82 o pNG1 .....                                       | 109 |
| <b>Figura 32.</b> Relación entre la germinación de las esporas y el medio de cultivo en el que germinan .....   | 110 |
| <b>Figura 33.</b> Relación entre la germinación de las esporas y el medio de cultivo del que se han obtenido .....  | 111 |
| <b>Figura 34.</b> Alineamiento de la secuencia de SCO2730 de <i>S. coelicolor</i> y sus ortólogos en otros estreptomicetos .....                                    | 112 |
| <b>Figura 35.</b> Alineamiento de la secuencia de SCO2731 de <i>S. coelicolor</i> y sus ortólogos en otros estreptomicetos .....                                    | 113 |
| <b>Figura 36.</b> Análisis transcripcional del entorno genético de SCO2730 ( <i>copZ</i> ) .....  | 116 |
| <b>Figura 37.</b> Retraso en la germinación de las esporas en el mutante en SCO2730 ( <i>copZ</i> ) en medio sólido R5A sin sacarosa .....                          | 117 |
| <b>Figura 38.</b> Retraso en la esporulación del mutante en SCO2730 ( <i>copZ</i> ) en medio sólido SFM .....   | 117 |
| <b>Figura 39.</b> Curva de crecimiento y análisis de la producción de antibióticos en el mutante en SCO2730 ( <i>copZ</i> ) en medio líquido R5A sin sacarosa ..... | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 40.</b> Construcciones para la complementación del mutante en <i>SCO2730</i> ( <i>copZ</i> ) .....   | 119 |
| <b>Figura 41.</b> Germinación y producción de antibióticos en cepas de complementación del mutante en <i>SCO2730</i> ( <i>copZ</i> ) .....   | 120 |
| <b>Figura 42.</b> Análisis de expresión de <i>SCO2730</i> y <i>SCO2731</i> en cepas de complementación del mutante en <i>SCO2730</i> ( <i>copZ</i> ) .....   | 121 |
| <b>Figura 43.</b> Relación entre el cobre citosólico, la germinación y la expresión de los genes <i>SCO2730</i> y <i>SCO2731</i> en medio líquido R5A sin sacarosa .....   | 123 |
| <b>Figura 44.</b> Concentración de cobre citosólico en esporas durmientes, esporas germinadas y micelio de las cepas silvestre (Wt), mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> , y cepa silvestre obtenida de un medio con 80 $\mu$ M $\text{CuSO}_4$ (Wt80Cu) en medio líquido R5A sin sacarosa .....  | 124 |
| <b>Figura 45.</b> Fenotipo y contenido de cobre citosólico en esporas de <i>S. coelicolor</i> procedentes de medio SFM + 80 $\mu$ M $\text{CuSO}_4$ .....  | 126 |
| <b>Figura 46.</b> Contenido de cobre citosólico en esporas de <i>S. coelicolor</i> obtenidas de medio SFM + 80 $\mu$ M $\text{CuSO}_4$ .....   | 127 |
| <b>Figura 47.</b> Efecto de la concentración de cobre extracelular en la germinación y en la concentración de cobre citosólico en medio líquido R5A sin sacarosa ....  | 128 |
| <b>Figura 48.</b> Análisis de la expresión (qPCR) de los genes <i>SCO2730/2731</i> , <i>SCO1045/1046</i> y <i>SCO4136</i> en cultivos de 10 h de la cepa silvestre de <i>S. coelicolor</i> M145 en medio líquido R5A sin sacarosa suplementados con 0, 40 u 80 $\mu$ M $\text{CuSO}_4$ ..... | 129 |
| <b>Figura 49.</b> Transcriptomas del mutante en <i>SCO2730</i> ( <i>copZ</i> ) y la cepa Wt80Cu comparados con la cepa Wt en cultivos de 10 h, en medio líquido R5A sin sacarosa .....   | 131 |
| <b>Figura 50.</b> Modelo que relaciona la concentración de cobre citosólico con la germinación, diferenciación morfológica y fisiológica, y expresión de genes en <i>S. coelicolor</i> .....   | 155 |
| <b>Figura 51.</b> Germinación y esporulación del mutante $\Delta nepA$ en 80 $\mu$ M $\text{CuSO}_4$ .....   | 160 |
| <b>Figura 52.</b> Relación entre el cobre citosólico, la expresión génica y la diferenciación de <i>S. coelicolor</i> .....  | 162 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Algunos de los genes que regulan la diferenciación fisiológica y morfológica de <i>Streptomyces</i> .....   | 19  |
| <b>Tabla 2.</b> Resumen de los principales genes identificados en <i>S. coelicolor</i> con función relacionada al cobre .....   | 33  |
| <b>Tabla 3.</b> Algunos sistemas de integración, derivados de fagos, utilizados en <i>Streptomyces</i> .....  | 39  |
| <b>Tabla 4.</b> Genes interrumpidos en <i>S. coelicolor</i> por inserción del transposón Tn5062 .....   | 42  |
| <b>Tabla 5.</b> Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo .....  | 43  |
| <b>Tabla 6.</b> Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de <i>E. coli</i> .....  | 44  |
| <b>Tabla 7.</b> Medios de cultivo utilizados en este trabajo para el crecimiento de <i>Streptomyces</i> .....   | 46  |
| <b>Tabla 8.</b> Cepas de <i>Streptomyces</i> utilizadas en este trabajo .....   | 53  |
| <b>Tabla 9.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo .....  | 59  |
| <b>Tabla 10.</b> Cebadores utilizados en los análisis de PCR cuantitativa (qPCR) .....  | 86  |
| <b>Tabla 11.</b> Fenotipos observados en cepas de <i>S. coelicolor</i> mutadas en genes de interés .....  | 89  |
| <b>Tabla 12.</b> Valores de abundancia de los transcritos en las cepas Wt80Cu y silvestre de <i>S. coelicolor</i> M145 durante la germinación (10 horas) en cultivos en R5A sin sacarosa .....  | 132 |
| <b>Tabla 13.</b> Valores de abundancia de los transcritos en las cepas Wt80Cu y silvestre de <i>S. coelicolor</i> M145 durante la germinación (10 horas) en cultivos en R5A sin sacarosa .....  | 138 |
| <b>Tabla 14.</b> Valores de abundancia de transcritos con diferencias significativas (q-valor menor que 0,05) en las cepas mutante <i>SCO2730::Tn5062</i> y Wt80Cu comparadas con la cepa silvestre de <i>S. coelicolor</i> M145 durante la germinación (10 horas), en cultivos en R5A sin sacarosa ..... | 141 |

## ABREVIATURAS

**GYM:** *Glucose, Yeast, Malt extract*

**LB:** Luria Bertani

**SFM:** *Soy Flavour Manitol*

**TSB:** *Tryptic Soy Broth*

**TSA:** *Tryptic Soy Agar*

**MM:** Medio Mínimo

**ME:** Medio de Esporulación

**ONA:** *Oxoid Nutrient Agar*

**BCDA:** ácido batocuproinedisulfónico

**IP:** Ioduro de Propidio

**BSA:** seroalbúmina bovina

**ADNc:** ADN complementario

**RT-PCR:** *Reverse Transcription PCR*

**qPCR:** *Quantitative PCR*

**RNAseq:** *RNA sequencing*

**CRP:** Proteína receptora de AMP cíclico

**Rpf:** *Resuscitation-promoting factors*

**CDA:** *Calcium-Dependent Antibiotic*

**MCP:** Muerte celular programada

**MI:** Primer micelio

**MII:** Segundo micelio

**ppGpp:** 3'-difosfato,5'-difosfato guanosina

**ICP-MS:** Espectrometría de Masas con plasma acoplado inductivamente



# INTRODUCCIÓN



### **I.1. Género *Streptomyces***

#### **I.1.1. Características del género *Streptomyces***

El género *Streptomyces* (Waksman & Henrici 1943) agrupa bacterias aerobias Gram positivas de crecimiento micelial, con un cromosoma lineal de alto contenido en G+C (69-78%) (Hopwood 2006). Tal como se detallará más adelante, un rasgo distintivo de este género es su ciclo de vida complejo, con procesos de muerte celular programada (MCP), diferenciación morfológica y esporulación, por lo que los estreptomicetos son considerados modelos procarióticos de multicelularidad (Chater 1984).

*Streptomyces* representa uno de los géneros de actinomicetos con mayor número y variedad de especies identificadas (Bhattacharyya *et al.* 1998). Actualmente, de acuerdo al “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, hay más de 500 especies de *Streptomyces* (Whitman *et al.* 2012).

Las bacterias del género *Streptomyces* se han estudiado por más de un siglo, tiempo en el cual ha cambiado radicalmente la percepción que se tenía sobre estos microorganismos. Inicialmente, se describieron como el agente causal de la sarna común de la patata, una enfermedad causada por *Streptomyces scabies* que limita la producción de este tubérculo (Güssow 1914; Millard 1922). Con el aislamiento del antibiótico estreptotricina a partir de *Streptomyces lavendulae* en 1942 (Waksman & Woodruff 1942), se despertó el interés en el estudio de estas bacterias como fuente natural de agentes antimicrobianos. Esto llevó a que dos años después se aislara la estreptomicina a partir de

*Streptomyces griseus*, primer antibiótico eficaz en el tratamiento de la tuberculosis (Schatz & Waksman 1944). La búsqueda de antibióticos dentro del género se intensificó, llevando a que, entre los años 1955 y 1962, se descubriera un gran número de antibióticos (Watve *et al.* 2001) (Fig. 1). En las últimas décadas, el hallazgo de nuevos antibióticos ha disminuido considerablemente. Al mismo tiempo las resistencias bacterianas a los antibióticos disponibles están aumentando dramáticamente.

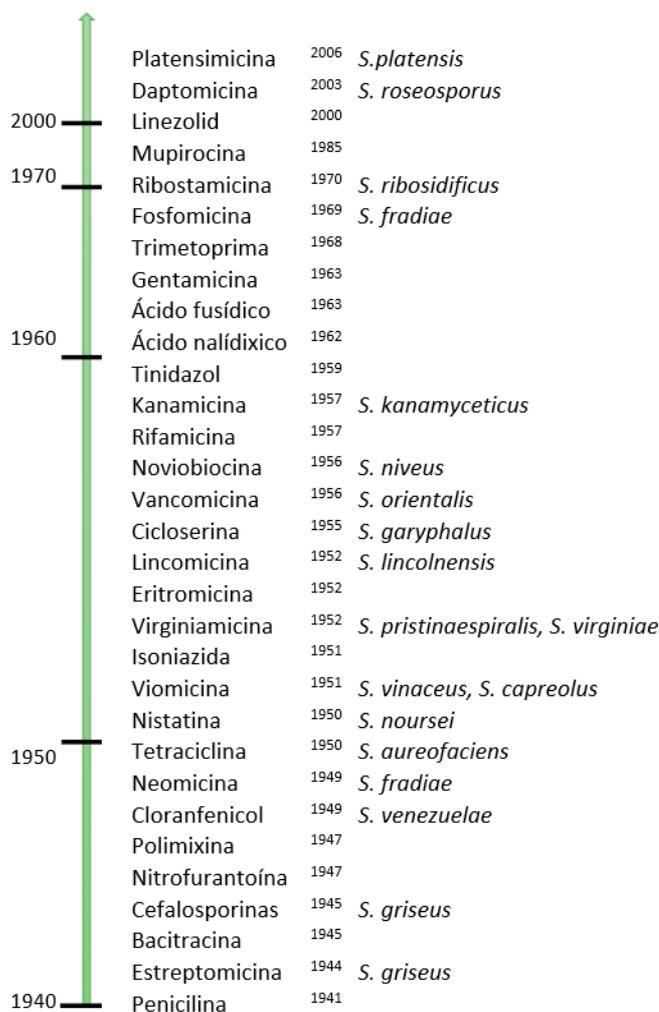
El principal hábitat de las bacterias del género *Streptomyces* es el suelo, donde producen un compuesto volátil, la geosmina, que da el olor a tierra mojada (Gust *et al.* 2003). Se han aislado especies en todo tipo de terrenos, incluso en condiciones extremas (desiertos, suelos alcalinos y salinos), pero también se han encontrado *Streptomyces* en ambientes marinos, así como formando parte de relaciones simbióticas con hongos, plantas y animales (Seipke *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2015).

### **1.1.2. Potencial biotecnológico del género *Streptomyces***

Las bacterias del género *Streptomyces* producen una gran variedad de metabolitos secundarios de interés industrial entre los que se encuentran numerosos antibióticos (Fig. 1), pero también otros compuestos bioactivos como antitumorales, inmunosupresores, antifúngicos, antihelmínticos, herbicidas e insecticidas (Hopwood 2007; Hamedi *et al.* 2017).

## Introducción

---



**Figura 1. Antibióticos descubiertos entre los años 1940 y 2006.** Se muestra la cepa de procedencia cuando es del género *Streptomyces*. Esquema basado en de Lima Procópio *et al.* (2012).

Actualmente, se conocen 12.400 compuestos bioactivos producidos por bacterias del género *Streptomyces*, de los cuales 11.000 son antibióticos (Hamedi *et al.* 2017). El potencial de este género en cuanto a producción de antibióticos supera con mucho al del resto de actinobacterias, que producen 3.600 compuestos bioactivos de los cuales 3.400 son antibióticos (Hamedi *et al.* 2017). La producción de la

mayoría de antibióticos es específica de cada especie. Estos metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en la naturaleza, otorgando una ventaja adaptativa al *Streptomyces* productor, ya que pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (de Lima Procópio *et al.* 2012). Esta ventaja adaptativa ha sido aprovechada a nivel industrial, utilizando diferentes especies de *Streptomyces* para la identificación y producción de antibióticos útiles en clínica y en investigación. *Streptomyces* también produce antibióticos cuando establece relaciones simbióticas con plantas. En estas simbiosis, el antibiótico protege a la planta de patógenos y los exudados vegetales favorecen el desarrollo de la bacteria (Bosso *et al.* 2010). Este comportamiento hace que las especies de *Streptomyces* tengan un potencial biotecnológico en el biocontrol de plagas (Hamedi *et al.* 2017).

Además de para la obtención de metabolitos secundarios, también hay un gran interés biotecnológico en el uso de los estreptomicetos como fuente de enzimas de uso industrial. Son de especial importancia las enzimas producidas para degradar polímeros naturales tales como celulosa, manano, quitina, xilano, almidón y agar, que pueden ser útiles para la conversión de estos compuestos en fuentes de energía renovable (Vrancken & Anné 2009).

### **1.2. Ciclo de vida de *Streptomyces***

El ciclo de vida de *Streptomyces* es singularmente complejo, e implica un desarrollo multicelular coordinado con la diferenciación fisiológica y morfológica de varios tipos celulares, culminando en la

producción de metabolitos secundarios y la formación y dispersión de esporas (McCormick & Flärdh 2012).

### **I.2.1. Germinación en *Streptomyces***

Los microorganismos del suelo están expuestos a factores que generan estrés químico, físico y/o biológico, ya que las condiciones son muy variables y los nutrientes se agotan periódicamente, lo cual obstaculiza el crecimiento (Challis & Hopwood 2003). Una estrategia de supervivencia de muchas bacterias y hongos para enfrentar tales condiciones es la entrada en un estado de latencia. En este estado, las células detienen su crecimiento y se convierten en formas muy resistentes con un metabolismo inactivo (o de actividad limitada) (Bobek *et al.* 2017). A pesar de que la germinación es una fase importantísima del ciclo de vida de *Streptomyces*, ha sido relativamente poco estudiada, principalmente porque es una fase del desarrollo sin aparente utilidad industrial.

Las esporas de los estreptomicetos están rodeadas por cubiertas hidrofóbicas relativamente gruesas, que conservan información genética durante condiciones desfavorables y están adaptadas a la dispersión por el viento, agua o insectos, permaneciendo en estado de latencia hasta germinar en un ambiente favorable (Noens 2007a; Bobek *et al.* 2017). Además del grosor de la pared celular, la resistencia de las esporas a temperaturas extremas y otros factores fisicoquímicos viene dada por la poca cantidad de agua en su interior (Kalakoutskii & Agre 1976). En este ambiente deshidratado, las macromoléculas adoptan conformaciones inactivas (p. ej. proteínas desnaturalizadas o

agregadas) que son estabilizadas y protegidas por la trehalosa (Bobek *et al.* 2017). Aún no está claro si en *Streptomyces*, las esporas en estado de latencia poseen un metabolismo nulo o limitado. De cualquier manera, todas las macromoléculas necesarias para la germinación tienen que ser pre-sintetizadas antes de la entrada en latencia (Bobek *et al.* 2017).

Para germinar, las esporas requieren como mínimo condiciones de hidratación óptimas. Sin embargo, la salida de la latencia es más rápida y exitosa en presencia de nutrientes y estímulos específicos (Bobek *et al.* 2017). Las esporas también necesitan los niveles adecuados de nutrientes intracelulares, como trehalosa (Ranade & Vining 1993) y polifosfatos (Strakova *et al.* 2013), que promuevan el reinicio metabólico antes de ser capaces de detectar y asimilar una fuente de energía externa (Bobek *et al.* 2017). Se considera que el factor de transcripción CRP (proteína receptora de AMP cíclico) es clave en la salida del estado de latencia (Noens 2007a).

### **a) Fases de la germinación**

La germinación representa una reconstitución completa de la célula a partir de la espora. En ella ocurren cambios morfológicos, que empiezan con la degradación de la cubierta y un gran incremento de la actividad metabólica (Bobek *et al.* 2017). La germinación de las esporas es un proceso secuencial que ha sido dividido en tres etapas (Hardisson *et al.* 1978): oscurecimiento, hinchamiento, y emergencia del tubo germinativo (Fig. 2).

*Oscurecimiento.* Durante esta etapa las esporas pierden su impermeabilidad (Fig. 2), permitiendo la entrada de agua que conducirá a la etapa de hinchamiento y la subsecuente pérdida de resistencia al calor. Pocos minutos después de haberse iniciado la germinación, las características ópticas de las esporas cambian y las células pueden reactivar su metabolismo (Bobek *et al.* 2017). El oscurecimiento requiere cationes bivalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , y  $\text{Fe}^{+2}$ , así como las reservas de energía de la espora (Hardisson *et al.* 1978; Eaton & Ensign 1980; Salas *et al.* 1983).

La degradación de la cubierta implica la reactivación de hidrolasas con función similar a la lisozima. Estas enzimas participan en la lisis de la pared celular y facilitan la remodelación del peptidoglicano que la constituye, lo cual da acceso a nutrientes externos (Bobek *et al.* 2017). Dentro de estas hidrolasas de la pared celular se encuentra la familia de proteínas Rpf (*Resuscitation-promoting factors*), las cuales hidrolizan los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico de la pared celular (Bobek *et al.* 2017).

*Hinchamiento.* Las esporas aumentan de volumen debido a la entrada de agua (Fig. 2). Con la hidratación, se activa rápidamente la hidrólisis de la trehalosa generando una subida en los niveles de glucosa (McBride & Ensign 1987; McBride & Ensign 1990). Éste parece ser un paso esencial en la germinación de las esporas, ya que sólo cuando ha disminuido la concentración intracelular de trehalosa, las proteínas vuelven a sus conformaciones funcionales (Nwaka & Holzer 1998; Singer & Lindquist 1998).

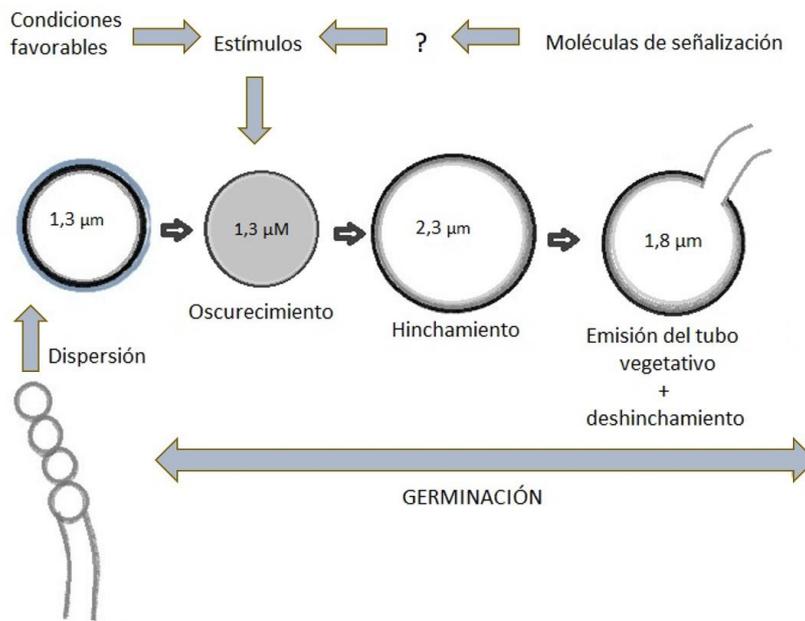
Los ribosomas presentes en las esporas están inactivos (Mikulik *et al.* 1984; Bobek *et al.* 2004). Minutos después de que comience la

germinación (de 30 a 60 min) los ribosomas ya son completamente funcionales, de manera que se traducen nuevas proteínas a partir de las reservas de ARN mensajeros (Strakova *et al.* 2013). En esta etapa, las esporas son metabólicamente activas y capaces de utilizar la trehalosa como principal fuente de energía (McBride & Ensign 1987). La energía obtenida se utiliza para la síntesis de proteínas (Mikulik *et al.* 1984) y en la primera replicación de ADN, la cual ocurre justo antes o simultáneamente con la etapa de emisión del tubo germinativo (Mikulik *et al.* 1977). Más tarde, las esporas son capaces de detectar otras fuentes de nutrientes externos y ajustar sus rutas metabólicas en respuesta a los mismos (Bobek *et al.* 2017).

*Emergencia del tubo germinativo.* La emisión del tubo germinativo es la última fase de la germinación y un evento básico para el crecimiento apical de las hifas (Bobek *et al.* 2017). Los tubos, aún no septados, surgen de la pared interna de las esporas (Fig. 2) (Glauert & Hopwood 1961) y progresan a través de la capa más externa. La acumulación de la proteína SsgA señala los puntos dónde emergerán los tubos germinativos (Noens 2007a). SsgA no es esencial para la germinación, pero en su ausencia disminuye el número promedio de tubos germinativos por espора y su sobreexpresión tiene el efecto contrario (Noens 2007a).

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró la existencia de una nueva fase en la germinación que consiste en el deshinchamiento de la espора una vez que emerge el tubo germinativo (Fig. 2) (Rioseras *et al.* 2016). Esta fase depende de la cantidad de enlaces cruzados del peptidoglicano, en cuya formación participa la carboxipeptidasa *SCO4439*. La mutación de esta carboxipeptidasa hace

que aumente el hinchamiento en las esporas, por lo que alcanzan diámetros de hasta 5  $\mu\text{m}$  (2,5 veces más que la cepa salvaje) antes de deshincharse (Rioseras *et al.* 2016). La existencia de esta fase demuestra que la regulación de la entrada de agua en las esporas es más compleja de lo que cabría imaginar y puede desregularse en mutantes como el indicado anteriormente (Rioseras *et al.* 2016).



**Figura 2. Fases de la germinación de *Streptomyces*.** Adaptado de Rioseras *et al.* (2016) y Bobek *et al.* (2017).

Una de las proteínas críticas en el crecimiento vegetativo y, por tanto, en la emisión del tubo germinativo, es la proteína DivIVA. DivIVA que se ubica en los ápices de las hifas asegurando el crecimiento y la formación de nueva pared celular (Flärdh 2003; Flärdh *et al.* 2012; Bobek *et al.* 2017). La expresión de DivIVA comienza poco después de la hidratación de las esporas y su síntesis aumenta a lo largo de la germinación (Strakova *et al.* 2013). Poco después del comienzo de la

germinación (300 min en *S. coelicolor*), se expresan los genes que codifican la proteína asociada a la división celular FtsZ y la proteína asociada al crecimiento celular FilP (Bobek *et al.* 2017). La expresión de estos genes se ha considerado como el punto en el que finaliza la fase de germinación (Strakova *et al.* 2013; Bobek *et al.* 2017).

Durante la germinación, de las esporas de *S. coelicolor* se producen tres metabolitos secundarios diferentes: un terpenoide llamado albaflavenona y dos policétidos (germicidina A y chalcona). Estos compuestos son generados *de novo* durante la germinación, no provienen de las esporas latentes, y constituyen buenos ejemplos de metabolitos secundarios que son producidos durante las fases de crecimiento vegetativo (Čihák *et al.* 2017). Hasta el momento, no se ha observado que la albaflavenona tenga algún efecto sobre en la germinación. No obstante, este compuesto puede ofrecer una ventaja en ambientes altamente competitivos, dado que tiene un efecto antibacteriano sobre *Bacillus subtilis*. En cuanto a los polcétidos, se ha observado que ambos tienen un efecto inhibitorio de la germinación (Čihák *et al.* 2017).

Aún queda mucho por descubrir acerca de la regulación de la germinación, incluyendo las señales externas (y sus sensores) que activan/inhiben el proceso y cuáles son los mecanismos subyacentes a estos controles. En esta tesis, demostramos que la concentración intracelular de cobre es uno de los factores que contribuyen a la regulación de la germinación (capítulo Discusión).

### **1.2.2. Desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido**

De acuerdo a la descripción tradicional del ciclo de vida de *Streptomyces* (Chater 1984), una vez que las esporas germinan, se forma una red de estructuras filiformes llamadas hifas (Fig. 3). Estas hifas crecen por extensión apical y a través de nuevas ramificaciones, formando el llamado micelio sustrato o vegetativo (Flärdh & Buttner 2009). La energía necesaria para el crecimiento de este micelio es generada por la conversión de materiales orgánicos presentes en el suelo, disponibles gracias a que *Streptomyces* secreta una amplia variedad de enzimas hidrolíticas (Chater *et al.* 2010).

En condiciones limitantes de nutrientes (especialmente de fuentes de carbono y nitrógeno) (Pérez *et al.* 2011), el micelio vegetativo sustenta el desarrollo de hifas aéreas hidrofóbicas y no ramificadas (Fig. 3), las cuales atravesarán la superficie agua-aire y acabarán formando esporas (Noens 2007a). Los nutrientes necesarios para la formación del micelio aéreo provienen en su mayoría de la lisis del micelio vegetativo (Chater 1984; Méndez *et al.* 1985; Miguelez *et al.* 1999). Esta podría ser una de las razones por las que la producción de antibiótico está acoplada al desarrollo, ofreciendo protección contra los microorganismos que son atraídos por los nutrientes generados por la lisis celular (Flärdh & Buttner 2009; McCormick & Flärdh 2012).

El micelio aéreo crece en el aire, de ahí su nombre, y forma cubiertas protectoras en su superficie formadas por proteínas hidrofóbicas (chaplina, rodlinas, SapB, SapT) (Claessen *et al.* 2006; Flärdh & Buttner 2009). Finalmente, las hifas del micelio aéreo se diferencian curvándose en sus extremos y formando septos de pared gruesos que dan lugar a largas cadenas de esporas unigenómicas (Fig. 3)

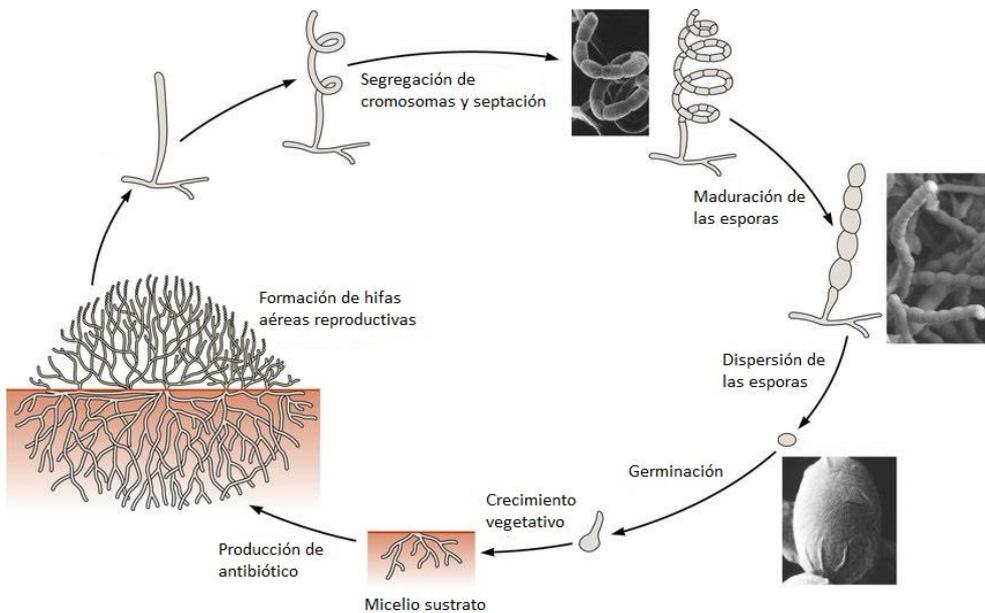
(Claessen *et al.* 2006; Flärdh & Buttner 2009). Estas esporas se liberan, siendo éste el modo de reproducción y dispersión de estas bacterias. Las esporas permanecen latentes hasta que encuentran las condiciones nutricionales adecuadas y germinan, dando lugar a un nuevo micelio colonizador (Fig. 3).

Durante la pasada década, nuestro grupo de investigación realizó un estudio exhaustivo del ciclo de desarrollo de *Streptomyces* en el que se analizaron los cambios morfológicos y bioquímicos que acompañan la diferenciación. Se consiguió ampliar el ciclo de desarrollo tradicional, al encontrar un nuevo estadio que había pasado inadvertido dado que en condiciones de laboratorio es muy transitorio (Manteca & Sanchez 2009). Esta nueva fase, llamada primer micelio (MI), precede a la fase de micelio sustrato, y consiste en un micelio joven, totalmente compartimentado (Fig. 4).

Ambos micelios, sustrato y aéreo son multinucleados, es decir, tienen septos esporádicos en sus hifas que separan fragmentos multigenómicos. De forma que, las esporas representarían la única fase con compartimentos unigenómicos (Claessen *et al.* 2006; Flärdh & Buttner 2009).

Recientemente, se han caracterizado los tabiques del MI, que están formados en su mayoría por membranas celulares sin una pared de peptidoglicano detectable (Yagüe *et al.* 2016). El MI sufre un proceso de MCP en el que se alternan segmentos vivos y muertos dentro de la misma hifa (Manteca *et al.* 2005a, 2005b). Los segmentos viables de este micelio comienzan a crecer y se diferencian en un micelio multinucleado, llamado segundo micelio (MII), que se corresponde con el micelio sustrato en tiempos tempranos o con el micelio aéreo una

vez que empieza a expresar las cubiertas hidrofóbicas y a crecer en el aire (Fig. 4). Finalmente, se produce la fase de esporulación de parte de las hifas de micelio aéreo. La fase de MII (sustrato y aéreo) se correlaciona con la producción de metabolitos secundarios (Manteca *et al.* 2005a, 2005b, 2006).

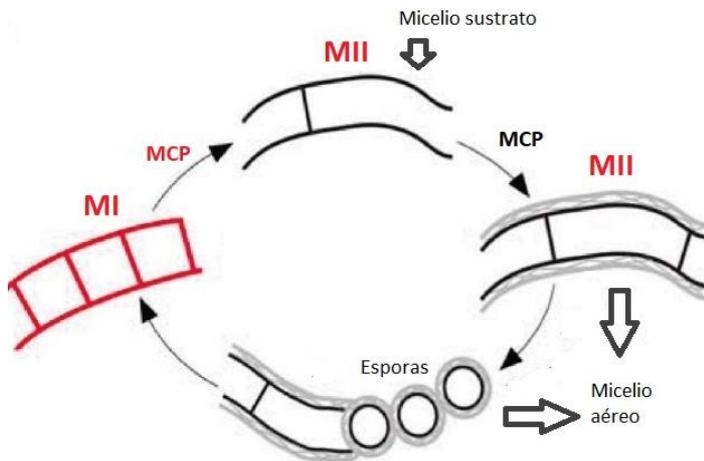


**Figura 3. Ciclo de vida de *Streptomyces* en medio sólido.** Adaptado de Barka *et al.* (2016).

### 1.2.3. Desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido

El nuevo modelo de desarrollo descrito por nuestro grupo de investigación en medio sólido se puede aplicar también a cultivos líquidos: un micelio compartimentado (MI) sufre un proceso de MCP y se diferencia en un micelio multinucleado (MII) (Fig. 5). Hay una detención transitoria del crecimiento que se corresponde con la MCP

del MI, y la fase de producción con el desarrollo del MII, al igual que sucede en cultivos sólidos (Manteca *et al.* 2008b).



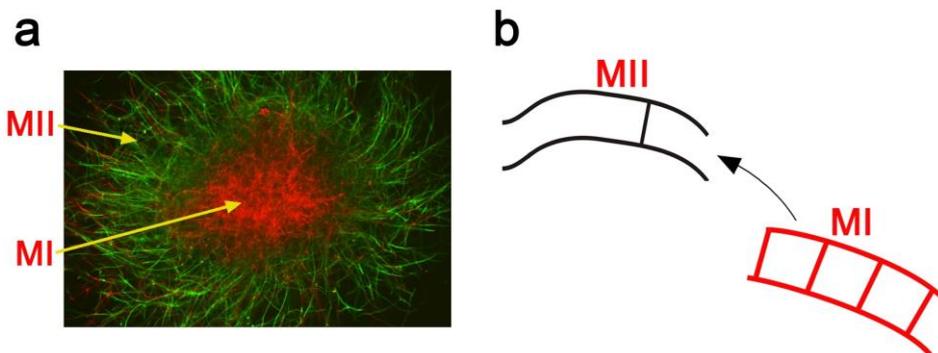
**Figura 4. Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido.** En rojo, se señalan las fases del ciclo descritas por nuestro grupo de investigación. MI: primer micelio; MCP: muerte celular programada; MII: segundo micelio. Adaptado de Yagüe *et al.* (2012).

De esta forma se demostró que, en cultivos líquidos, aunque no hay esporulación en la mayoría de los estreptomicetos, sí existe una diferenciación comparable a la de cultivos sólidos, consistente en la diferenciación de un micelio (MII) productor de metabolitos secundarios (Manteca *et al.* 2008b).

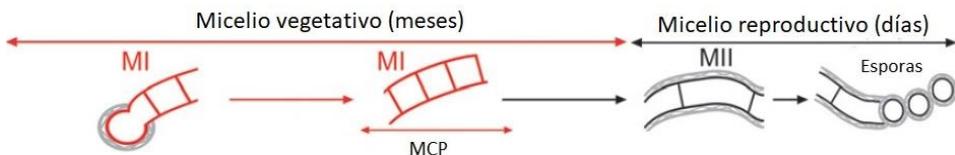
#### 1.2.4. Desarrollo de *Streptomyces* en condiciones naturales (suelos)

Manteca y Sánchez (2009) demostraron que, en condiciones naturales (tierra no suplementada con nutrientes) las esporas de *Streptomyces* germinan lentamente (no antes de 7 días) y de manera

muy asincrónica (a los 20 días de cultivo aún quedan esporas sin germinar). Además, la fase de MI puede extenderse hasta 1 mes, sin haber agrupaciones de hifas que formen *pellets* ni procesos de muerte celular (Fig. 6). Considerando estos resultados, se postuló que *Streptomyces* habita en el suelo principalmente en la forma de MI, estado vegetativo, y que sólo cuando debe ocurrir la segregación de los cromosomas previa a la esporulación existe la fase (transitoria) de crecimiento rápido de un MII multinucleado productor de metabolitos secundarios (Manteca & Sanchez 2009; Yague *et al.* 2013a).



**Figura 5. Desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido.** (a) *Pellet* de *Streptomyces antibioticus* en medio líquido, visto con microscopía confocal (tinción con SYTO9 y yoduro de propidio). (b) MI: primer micelio; MII: segundo micelio. Tomado de Yagüe *et al.* (2012).



**Figura 6. Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en condiciones naturales (suelos).** Tomado de Yagüe *et al.* (2013a) MI, primer micelio; MII, segundo micelio; MCP, muerte celular programada.

### **1.2.5. Muerte celular programada en *Streptomyces***

El término “muerte celular programada” es utilizado para describir cualquier tipo de muerte celular que implica mecanismos moleculares específicos determinados genéticamente, y es una parte del programa de desarrollo del organismo, que contribuye a mantener su homeostasis o forma parte de su respuesta inmune (Galluzzi *et al.* 2015).

*Streptomyces* tiene dos rondas de MCP en cultivos sólidos. La primera afecta al MI y representa un evento clave del desarrollo, precediendo la formación del MII (Manteca *et al.* 2006; Manteca *et al.* 2007). La segunda ronda incluye la muerte de una parte del micelio sustrato y de las hifas no esporulantes del micelio aéreo, contribuyendo a la liberación de nutrientes adicionales necesarios para la esporulación (Miguel *et al.* 1999; Manteca *et al.* 2006; Yague *et al.* 2013b).

Ambos eventos de muerte celular siguen un patrón morfológico secuencial (Miguel *et al.* 1999; Manteca *et al.* 2005a) que incluye la activación de enzimas (proteasas, peptidasas, amidasas, muramididasas) encargadas del dismantelamiento celular (Nicieza *et al.* 1999; Manteca *et al.* 2006; Manteca *et al.* 2007; Yagüe *et al.* 2010), e implica la muerte selectiva de partes específicas del micelio, en un tiempo particular y con una duración determinada. Esto demuestra que son procesos de MCP que forman parte del programa de desarrollo de la colonia (Miguel *et al.* 1999; Filippova & Vinogradova 2017). Algunos autores consideran que los mecanismos de MCP en estreptomicetos (como en otros microorganismos con un ciclo de desarrollo complejo) podrían ser precursores filogenéticos de mecanismos apoptóticos de eucariotas (Nicieza *et al.* 1999; Filippova & Vinogradova 2017).

El número de rondas de MCP en *Streptomyces* depende de las condiciones de cultivo. Como se apuntó arriba, en cultivos sólidos confluentes hay dos (Manteca *et al.* 2006). En colonias aisladas, tras un primer ciclo de germinación, MI, MCP, MII y esporulación, las esporas germinan de nuevo (probablemente por la difusión de nutrientes del medio de cultivo) y se repiten sucesivos ciclos de desarrollo con múltiples rondas de MCP (Manteca & Sanchez 2009). En cultivos líquidos (Manteca *et al.* 2008b) hay una única MCP, que separa la fase vegetativa de MI de la fase productora de metabolitos secundarios (MII) (Yagüe *et al.* 2010; Rioseras *et al.* 2014).

### **I.3. Regulación del desarrollo de *Streptomyces***

En *Streptomyces*, existe una correlación entre la diferenciación fisiológica (producción de metabolitos secundarios) y la diferenciación morfológica (formación del micelio sustrato y aéreo) (Horinouchi 2002; Manteca *et al.* 2008b). Por ello, no es de extrañar que estos procesos tengan numerosos elementos reguladores en común.

La regulación del desarrollo de *Streptomyces* es un tema amplio, complejo y no del todo conocido. A continuación, se describirán someramente algunas de las cascadas biomoleculares y de los efectores más importantes que participan en dicha regulación.

#### **I.3.1. Cascadas de regulación**

Los primeros mutantes obtenidos en *Streptomyces* que afectaban al desarrollo se clasificaron en dos categorías principales

según su fenotipo: mutantes “*bald*” (*bld*) (Merrick 1976), incapaces de formar hifas aéreas (Hopwood *et al.* 1970); y los mutantes con fenotipo “*white*” (*whi*) (Chater 1972) que desarrollan el micelio aéreo pero no forman esporas pigmentadas (Hopwood *et al.* 1970; Chater 1972).

La cascada de regulación *bld* (Tabla 1), comprende principalmente reguladores que dirigen la producción de proteínas implicadas en la formación del micelio aéreo y, en algunos casos, en la producción de metabolitos secundarios (Claessen *et al.* 2006; Den Hengst *et al.* 2010; Bibb *et al.* 2012; Al-Bassam *et al.* 2014). Los genes más importantes incluidos en la cascada *whi* codifican proteínas reguladoras que promueven la división celular, la segregación de los cromosomas, y la maduración de las esporas (Tabla 1) (Chater 2001; Bush *et al.* 2013; Al-Bassam *et al.* 2014; Bush *et al.* 2016).

Otra de las rutas reguladoras que controlan el desarrollo del micelio aéreo es la denominada ruta “*sky*” (Claessen *et al.* 2006). Al igual que la cascada de genes *bld*, controla la producción de proteínas estructurales que participan en la formación del micelio aéreo. No obstante, la vía *sky* actúa en un punto intermedio entre la regulación mediada por los genes *bld* y la llevada a cabo por los genes *whi*, sin ser parte de ninguna de estas dos cascadas reguladoras (Claessen *et al.* 2006).

Existen muchos otros reguladores que afectan a la formación del micelio aéreo, la esporulación y/o la producción de metabolitos secundarios, ya sea a nivel global o en puntos muy específicos de un determinado proceso. Algunos de los más importantes se mencionan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Algunos de los genes que regulan la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces*.** Adaptado de Claessen *et al.* (2006), van Wezel & McDowall (2011) y Yagüe *et al.* (2013b).

|  | Gen               | Número SCO                 | Referencia                       |
|--|-------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Reguladores con efecto positivo en el metabolismo secundario | <i>actII-orf4</i> | SCO5085                    | (Gramajo <i>et al.</i> 1993)     |
|  | <i>redD</i>       | SCO5877                    | (Feitelson <i>et al.</i> 1985)   |
|  | <i>atrA</i>       | SCO4118                    | (Uguru <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>absA1/2</i>    | SCO3225/3226               | (Anderson <i>et al.</i> 2001)    |
|  | <i>relA</i>       | SCO1513                    | (Chakraborty <i>et al.</i> 1996) |
|  | <i>rshA</i>       | SCO5794                    | (Sun <i>et al.</i> 2001)         |
|  | <i>cprA</i>       | SCO6312                    | (Onaka <i>et al.</i> 1998)       |
|  | <i>absR1/2</i>    | SCO6992/6993               | (Park <i>et al.</i> 2000)        |
|  | <i>afsQ1/2</i>    | SCO4907/4906               | (Shu <i>et al.</i> 2009)         |
|  | <i>rok7B7</i>     | SCO6008                    | (Park <i>et al.</i> 2009)        |
|  | <i>absB</i>       | SCO5572                    | (Price <i>et al.</i> 1999)       |
|  | <i>absC</i>       | SCO5405                    | (Hesketh <i>et al.</i> 2009)     |
|  | <i>rapA1/2</i>    | SCO5403/5404               | (Lu <i>et al.</i> 2007)          |
|  | <i>redZ</i>       | SCO5881                    | (Guthrie <i>et al.</i> 1998)     |
|  | <i>cpkO</i>       | SCO6280                    | (Pawlik <i>et al.</i> 2007)      |
|  | <i>ecrE1/2</i>    | SCO6421/6422               | (Wang <i>et al.</i> 2007)        |
| <i>esha</i>  | SCO7699           | (Saito <i>et al.</i> 2006) |                                  |
| <i>relC</i>  | SCO4648           | (Ochi 1990)                |                                  |
| Reguladores con efecto negativo en el metabolismo secundario | <i>slbR</i>       | SCO0608                    | (Yang <i>et al.</i> 2012)        |
|  |                   | SCO6808                    | (Yang <i>et al.</i> 2008)        |
|  | <i>cprB</i>       | SCO6071                    | (Onaka <i>et al.</i> 1998)       |
|  | <i>siqQ</i>       | SCO4908                    | (Shu <i>et al.</i> 2009)         |
|  | <i>cdgA</i>       | SCO2817                    | (Den Hengst <i>et al.</i> 2010)  |

## Introducción

|   |                |              |                                    |
|---|----------------|--------------|------------------------------------|
|   | <i>rrdA</i>    | SCO1104      | (Ou <i>et al.</i> 2009)            |
|   | <i>phoP/R</i>  | SCO4229/4230 | (Santos-Beneit <i>et al.</i> 2009) |
|   | <i>dasR</i>    | SCO5231      | (Rigali <i>et al.</i> 2006)        |
|   |                | SCO1712      | (Lee <i>et al.</i> 2010)           |
|   | <i>cutRS</i>   | SCO5862/5863 | (Chang <i>et al.</i> 1996)         |
|   | <i>nsdA</i>    | SCO5582      | (Den Hengst <i>et al.</i> 2010)    |
|   | <i>nsdB</i>    | SCO7252      | (Zhang <i>et al.</i> 2007)         |
|   | <i>wblA</i>    | SCO3579      | (Kang <i>et al.</i> 2007)          |
| Genes cuya mutación genera un fenotipo <i>bld</i>     | <i>bldB</i>    | SCO5723      | (Champness 1988)                   |
|   | <i>bldC</i>    | SCO4091      | (Hunt <i>et al.</i> 2005)          |
|   | <i>bldG</i>    | SCO3549      | (Bignell <i>et al.</i> 2000)       |
|   | <i>bldK</i>    | SCO5112/5116 | (Akanuma <i>et al.</i> 2011)       |
|   | <i>bldH</i>    | SCO2792      | (Takano <i>et al.</i> 2003)        |
|   | <i>bldM</i>    | SCO4768      | (Molle & Buttner 2000)             |
|   | <i>bldN</i>    | SCO3323      | (Bibb <i>et al.</i> 2000)          |
| Genes relacionados con la formación del micelio aéreo | <i>chpC</i>    | SCO1674      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpH</i>    | SCO1675      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpE</i>    | SCO1800      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpG</i>    | SCO2699      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpF</i>    | SCO2705      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpA</i>    | SCO2716      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpD</i>    | SCO2717      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>chpB</i>    | SCO7257      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>rdIA</i>    | SCO2718      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>rdIB</i>    | SCO2719      | (Claessen <i>et al.</i> 2003)      |
|   | <i>ramCSAB</i> | SCO6681-6684 | (Keijser <i>et al.</i> 2002)       |
|   | <i>bldN</i>    | SCO3323      | (Bibb <i>et al.</i> 2000)          |

## Introducción

|  |             |              |                                  |
|--|-------------|--------------|----------------------------------|
|  | <i>bldC</i> | SCO4091      | (Hunt <i>et al.</i> 2005)        |
|  | <i>bldM</i> | SCO4768      | (Molle & Buttner 2000)           |
|  | <i>bldH</i> | SCO2792      | (Takano <i>et al.</i> 2003)      |
| Genes relacionados con la esporulación | <i>whiJ</i> | SCO4543      | (Ainsa <i>et al.</i> 2010)       |
|  | <i>whiB</i> | SCO3034      | (Davis & Chater 1992)            |
|  | <i>whiD</i> | SCO4767      | (Ryding <i>et al.</i> 1999)      |
|  | <i>whiG</i> | SCO5621      | (Mendez & Chater 1987)           |
|  | <i>whiE</i> | SCO5314-5621 | (Davis & Chater 1990)            |
|  | <i>whiH</i> | SCO5819      | (Davis & Chater 1990)            |
|  | <i>ssgA</i> | SCO3926      | (Kawamoto <i>et al.</i> 1997)    |
|  | <i>ssgB</i> | SCO1541      | (Kormanec & Sevcikova 2002)      |
|  | <i>ssgC</i> | SCO7289      | (Noens <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>ssgD</i> | SCO6722      | (Noens <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>ssgE</i> | SCO3158      | (Noens <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>ssgF</i> | SCO7175      | (Noens <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>ssgG</i> | SCO2924      | (Noens <i>et al.</i> 2005)       |
|  | <i>parA</i> | SCO3886      | (Kim <i>et al.</i> 2000)         |
|  | <i>parB</i> | SCO3887      | (Kim <i>et al.</i> 2000)         |
|  | <i>mreB</i> | SCO2611      | (Burger <i>et al.</i> 2000)      |
|  | <i>mbl</i>  | SCO2451      | (Heichlinger <i>et al.</i> 2011) |
|  | <i>slbR</i> | SCO0608      | (Yang <i>et al.</i> 2012)        |
|  |             | SCO6808      | (Yang <i>et al.</i> 2008)        |
|  | <i>sigF</i> | SCO4035      | (Kelemen <i>et al.</i> 1996)     |

### **1.3.2. Factores nutricionales y moléculas de señalización química**

La disponibilidad de nutrientes es uno de los factores que afectan a la producción de metabolitos secundarios y a la diferenciación morfológica de *Streptomyces* (McCormick & Flärdh 2012; Romero-Rodríguez *et al.* 2018).

#### **a) Efectos del carbono, nitrógeno y fosfato**

El carbono es el componente mayoritario de las biomoléculas. No obstante, altas concentraciones de este elemento, derivadas de la glucosa u otras fuentes de carbono de fácil asimilación, favorecen el crecimiento bacteriano pero pueden inhibir el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica de *Streptomyces* (Ruiz *et al.* 2010; McCormick & Flärdh 2012; Romero-Rodríguez *et al.* 2017; Romero-Rodríguez *et al.* 2018). La represión por catabolito de carbono (CCR) es uno de los procesos mediante los cuales la concentración de carbono afecta a la diferenciación morfológica y a la síntesis de metabolitos secundarios (Romero-Rodríguez *et al.* 2017).

El ion fosfato,  $\text{PO}_4^{-3}$ , también es un nutriente fundamental para las células. El efecto sobre la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces* depende de su concentración (Romero-Rodríguez *et al.* 2018). *Streptomyces*, como otras bacterias, cuenta con un sistema de dos componentes formado por una proteína quinasa de membrana (PhoR) y un regulador de respuesta con unión al ADN (PhoP) que regulan los niveles intracelulares de fosfato (Sola-Landa *et al.* 2003; Santos-Beneit 2015). Altos niveles de fosfato (superiores a 10 mM) disminuyen la producción de metabolitos secundarios en distintas

especies de *Streptomyces* (Martín 1989). No obstante, la escasez de fosfato (concentraciones inferiores a 0,1 mM) estimula la formación de micelio aéreo (Tenconi *et al.* 2012) y la producción de metabolitos secundarios a través del sistema de PhoP/PhoR en varias especies *Streptomyces* (Rodríguez-García *et al.* 2007).

El nitrógeno es otro elemento esencial para las células. En *Streptomyces*, además de ser un componente esencial de ácidos nucleicos y proteínas, también puede formar parte de precursores de metabolitos secundarios (Romero-Rodríguez *et al.* 2018). Por tanto, su disponibilidad y metabolismo pueden afectar la síntesis de metabolitos secundarios. Se ha observado que niveles muy elevados de nitrógeno causan un retraso en la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces* (Romero-Rodríguez *et al.* 2018).

### **b) Moléculas de señalización química**

Algunas especies de *Streptomyces* utilizan un tipo de moléculas de señalización química u hormonas microbianas llamadas  $\gamma$ -butirolactonas que, junto con sus receptores específicos, son capaces de señalar y coordinar la transición del metabolismo primario a la producción de antibióticos y/o la diferenciación morfológica (Horinouchi 2002; Takano 2006). La  $\gamma$ -butirolactona de *S. griseus*, conocida como factor A, fue la primera en identificarse en este género y es la que se ha estudiado en más detalle hasta el momento. Esta cascada de señalización induce la producción de estreptomicina y de otros metabolitos secundarios, así como la esporulación en *S. griseus* (Horinouchi 2002; Takano 2006).

La guanosina tetrafosfato (ppGpp) es una alarmona de distintas bacterias, su síntesis ocurre cuando hay escasez de aminoácidos para la síntesis de proteínas (Sharma & Chatterji 2010). En *Streptomyces*, afecta a la producción de metabolitos secundarios y a la diferenciación morfológica (Chakraburty & Bibb 1997; Hesketh *et al.* 2007).

### **c) Metales esenciales**

Se consideran metales esenciales aquellos que en cantidades traza estimulan el crecimiento microbiano, tales como Fe, Ni, Zn, Co, Mn, Cu. Hasta ahora, no se ha relacionado ningún efecto positivo de otros metales (p. ej. Hg, Ag, Cd, As, Au) por lo que no se consideran esenciales (Bruins *et al.* 2000). La acumulación de los metales esenciales afecta de distinta manera a la diferenciación. Con respecto al Fe, se ha demostrado que estimula el desarrollo morfológico y la producción de metabolitos secundarios en ciertas especies de *Streptomyces* (Yamanaka *et al.* 2005). En el caso del Ni, hay estudios que demuestran que inhibe el crecimiento y la producción de antibióticos en concentraciones de 5µg/mL (Abbas & Edwards 1990). Por otro lado, altas concentraciones (superiores a 10µg/mL) de Zn, Mn o Co estimulan el crecimiento pero inhiben la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Abbas & Edwards 1990).

### **1.4. Efecto del cobre en la diferenciación de *Streptomyces***

El cobre es un oligoelemento indispensable para casi todas las formas de vida. La evolución biológica lo ha seleccionado como

bioelemento principalmente por sus propiedades electroquímicas únicas (Palumaa 2013).

El cobre tiene un potencial oxidativo que le permite existir en dos estados reversibles, un estado reducido (ion cuproso,  $\text{Cu}^+$ ) y otro oxidado (ion cúprico,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Esta característica lo convierte en un elemento esencial en las proteínas implicadas en la transferencia de electrones y en la oxidación catalítica de varios sustratos en organismos eucariotas y procariotas (Worrall & Vijgenboom 2010). Sin embargo, dicho potencial oxidativo puede llegar a dañar los sistemas biológicos y hacer que el cobre sea altamente tóxico (Palumaa 2013).

Las células controlan el transporte de cobre y su concentración intracelular a través de proteínas específicas que facilitan su entrada, distribución y salida, asegurando la concentración óptima de este elemento de forma que cubra los requerimientos celulares sin acumularse a niveles perjudiciales. Estos procesos homeostáticos se modulan dinámicamente mediante mecanismos de regulación, que operan a nivel de la transcripción de genes, la estabilidad y el tráfico de proteínas (Puig *et al.* 2002).

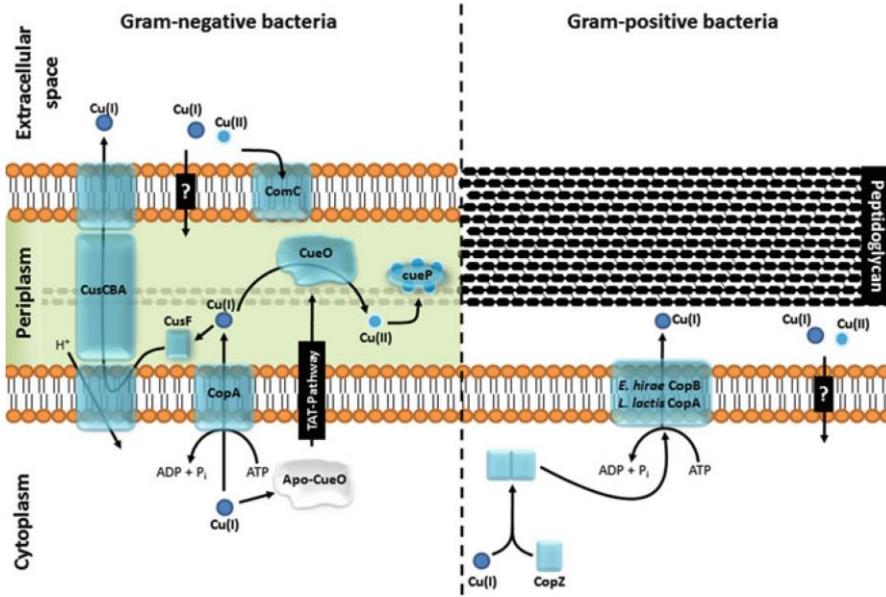
### **1.4.1. Cobre en bacterias**

Las evidencias, en su mayoría, sugieren que el  $\text{Cu(I)}$  es la forma del ion metálico que es adquirida por las células bacterianas y la forma que se transporta al interior celular (Solioz & Stoyanov 2003). No obstante, el  $\text{Cu(I)}$  en presencia de oxígeno puede causar daño celular, por lo que en el citoplasma está unido a proteínas de unión al  $\text{Cu(I)}$  llamadas chaperonas. Estas chaperonas secuestran el cobre, lo

transportan y lo entregan a determinadas proteínas (p. ej. transportadores de membrana) mediante interacciones proteína-proteína altamente específicas (Puig *et al.* 2002).

Los reguladores transcripcionales sensibles al cobre detectan el exceso de este metal dentro de la célula y modulan la transcripción de los genes y operones con alguna función en la homeostasis del cobre, asegurando un balance adecuado en la célula (Solioz *et al.* 2010). Además, la rápida secreción del exceso de cobre fuera del citosol a través de ATPasas específicas, es común, si no ubicuo, y es el mecanismo básico de la resistencia bacteriana al exceso de cobre (Solioz *et al.* 2010).

En bacterias Gram negativas, los mecanismos/proteínas responsables de la homeostasis del cobre están distribuidos en la membrana interna, periplasma y membrana externa de las células. En *Escherichia coli* (Fig. 7), no se conoce con precisión cómo entra el cobre en las células. Una vez que llega al citoplasma, el Cu(I) activa la expresión de genes responsables de su transporte debido a su unión a represores transcripcionales específicos. Con su unión a Cu(I), CueR activa la expresión de los genes *cueO* y *copA*, y CusRS induce la expresión del operón *cusFBA* y una ATPasa *copA*, la cual transporta Cu(I) hacia el periplasma. CueO, en el periplasma, disminuye la toxicidad del Cu(I) mediante su oxidación a Cu(II). El exporte del cobre desde el periplasma ocurre a través del sistema CusCFBA, en el cual la chaperona de cobre CusF transfiere el Cu(I) al complejo CusCBA (Santo *et al.* 2014).



**Figura 7. Mecanismos de regulación del cobre en bacterias Gram positivas y Gram negativas.** En Gram negativas: CusCBA exporta Cu(I) del periplasma; CusF dirige el cobre al sistema CusCBA; CopA importa Cu(I) al periplasma con hidrólisis de ATP; ComC reduce la permeabilidad al cobre en la membrana externa; CueO oxida el Cu(I) periplásmico a Cu(II); CueP actúa como reserva del cobre periplásmico. En Gram positivas: CopZ es una chaperona de cobre que se une al cobre citoplásmico y lo entrega a la ATPasa de cobre de tipo P<sub>1</sub> (CopA en *Lactococcus lactis*; CopB en *Enterococcus hirae*), que a su vez exporta el Cu(I) hacia el espacio extracelular. Tomado de Santo *et al.* (2014).

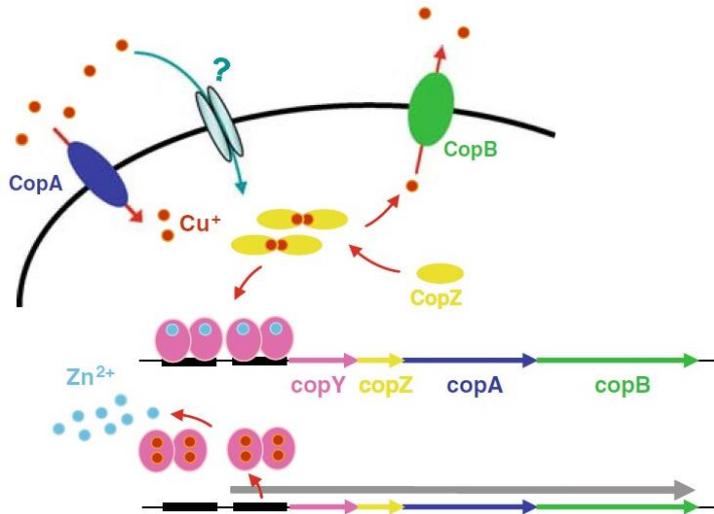
Las ATPasas implicadas en el importe de cobre solo se han caracterizado en *Enterococcus hirae* (CopA) y *Synechocystis* (CtaA) (Solioz *et al.* 2010). Mientras que la función de la CopA de *E. hirae* en la fisiología celular aún no está clara, el transportador CtaA de *Synechocystis* importa el cobre que se incorpora a una plastocianina, una proteína del tilacoide que contiene cobre (Tottey *et al.* 2001). Otra vía para la entrada de cobre en las células es la biosíntesis y liberación de moléculas con alta afinidad al cobre, llamadas metanobactinas (Balasubramanian & Rosenzweig 2008). Hasta el momento la entrada del cobre unido a metanobactinas solo se ha observado en bacterias

metanótrofas (Balasubramanian *et al.* 2011), tales como *Methylosinus trichosporium* OB3b.

La primera metalochaperona de Cu(I) identificada en bacterias fue CopZ, como parte del operón *copYZAB* en la bacteria Gram positiva *E. hirae* (Fig. 8) (Odermatt & Solioz 1995). CopZ actúa en el transporte intracelular de cobre, mientras que CopB es una ATPasa de tipo P<sub>1</sub> que exporta cobre (Solioz *et al.* 2010). En *E. hirae*, CopA es una ATPasa de tipo P<sub>1</sub> que sirve para el importe de cobre (Odermatt & Solioz 1995), mientras que en el resto de bacterias estudiadas, CopA exporta cobre (Solioz *et al.* 2010). CopZ se requiere para que ocurra la transferencia de Cu(I) a los dominios transmembrana de unión a metales. A su vez, la unión de Cu(I) a estos dominios sirve para regular la actividad de las ATPasas transportadoras de cobre (Chaplin *et al.* 2015a). En *E. hirae*, la transcripción del operón *copYZAB* es regulada por el represor CopY unido al Zn(II) (Fig. 8). En condiciones de altas concentraciones de cobre, CopY acepta dos iones Cu(I) procedentes de CopZ con la concomitante liberación de Zn(II), lo que lleva a la desrepresión del operón *copYZAB* y al aumento en el exporte de cobre (Solioz *et al.* 2010).

En otras bacterias Gram positivas donde el gen *copY* está ausente, se ha identificado otra familia de reguladores dependientes de cobre, los represores de tipo CsoR (Liu *et al.* 2007). Este metaloregulador responde a los niveles de Cu(I) citosólico elevados a través de un cambio estructural inducido alostéricamente con su unión al Cu(I), llevando a su disociación de sus secuencias diana (Ma *et al.* 2009; Chang *et al.* 2014; Tan *et al.* 2014) y aumentando la expresión de genes implicados en la secreción de cobre. Estos genes generalmente

implican una chaperona tipo CopZ y una ATPasa tipo CopA (Chaplin *et al.* 2015a).



**Figura 8. Homeostasis del cobre en *Enterococcus hirae*.** El cobre entra en la célula a través de CopA o por canales inespecíficos. El exceso de cobre citoplásmico se une a CopZ que puede donar Cu<sup>+</sup> a CopB, para el transporte, y al represor CopY, para inducir el operón *cop*. Cuando CopZ dona Cu<sup>+</sup> a CopY, en cada monómero CopY un Zn<sup>2+</sup> es reemplazado por dos Cu<sup>+</sup> y se libera la represión ejercida por CopY de los genes que están corriente abajo. Tomado de Solioz *et al.* (2010).

#### 1.4.2. Cobre y diferenciación de *Streptomyces*

Varios autores han demostrado que la biodisponibilidad de cobre en ciertas cepas de *Streptomyces* estimula el desarrollo morfológico y la producción de antibiótico (Ueda *et al.* 1997; Keijser *et al.* 2000; Fujimoto *et al.* 2012; Blundell *et al.* 2013). Aparentemente, esta dependencia está restringida a la fase de crecimiento reproductivo (micelio aéreo y esporas), ya que el crecimiento vegetativo puede

ocurrir en condiciones limitantes de cobre (Dwarakanath *et al.* 2012; Blundell *et al.* 2013).

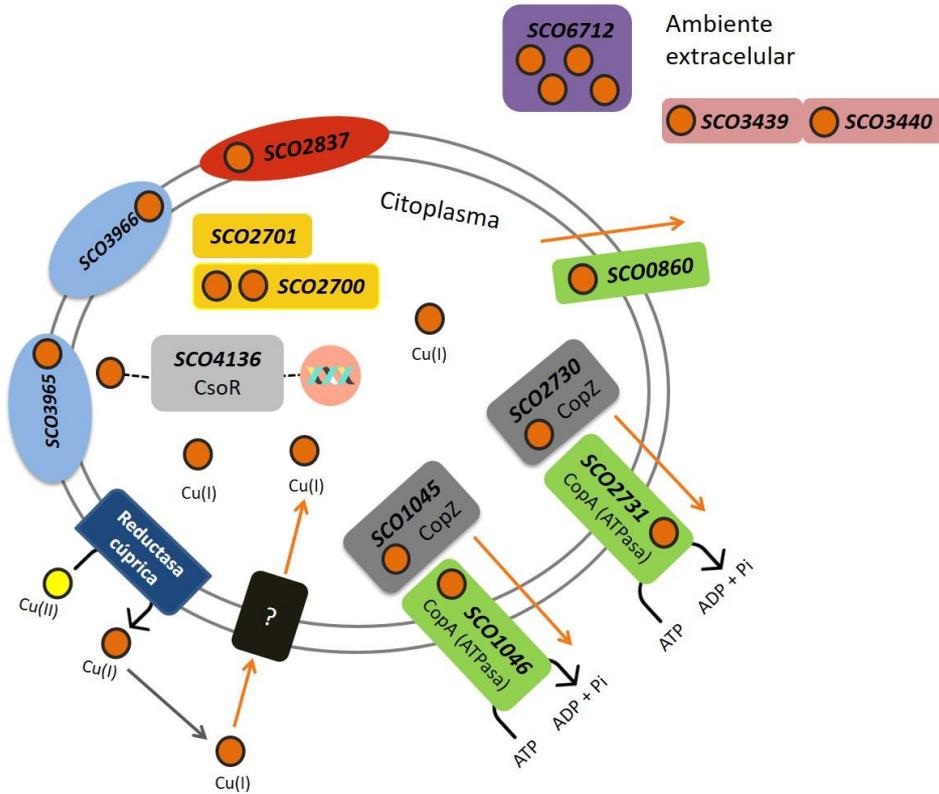
Las proteínas de *S. coelicolor* relacionadas con cobre se han identificado *in silico*, e incluyen gran número de potenciales cuproenzimas extracelulares, proteínas redox, y metalochaperonas de cobre (Andreini *et al.* 2008; Worrall & Vijgenboom 2010; Fujimoto *et al.* 2012) (Tabla 2). El efecto estimulador del cobre en el desarrollo, sugiere que algunas funciones bioquímicas dependientes de este bioelemento se correlacionan con el complejo ciclo de vida de los estreptomicetos y que, al menos una parte de las cuproproteínas y cuproenzimas deben cumplir una función en el desarrollo (Blundell *et al.* 2013). Las funciones de las proteínas moduladas por cobre en el desarrollo y diferenciación de *Streptomyces* aún no han sido completamente elucidadas (Worrall y Vijgemboom, 2010).

El citosol de *S. coelicolor* contiene proteínas que se ha postulado que están implicadas en sistemas de detoxificación de cobre (Fig. 9) (Worrall & Vijgenboom 2010). El mecanismo de entrada de cobre en *Streptomyces* aún se desconoce, pero probablemente requiere de la enzima reductasa cúprica, que reduce el Cu(II) a Cu(I) (Vijgenboom & Keijser 2002). La reductasa cúprica podría participar en la entrada de cobre en *Streptomyces*, puesto que su actividad aumenta en cultivos deficientes en cobre en comparación con células que tienen suficiente cantidad de este metal (Albarracín *et al.* 2008).

Se han identificado dos sistemas que contienen genes que codifican una metalochaperona de cobre de tipo CopZ y un transportador ATPasa de tipo P<sub>1</sub> como CopA (Fig. 9) (Dwarakanath *et al.* 2012). Tal como se comentó en el apartado anterior, en bacterias Gram

positivas, incluyendo *Streptomyces*, los genes *copA* y *copZ* son regulados transcripcionalmente por la proteína sensora de cobre CsoR (Fig. 9) (Liu *et al.* 2007; Dwarakanath *et al.* 2012). El primer miembro de la familia CsoR fue descubierto en *Mycobacterium tuberculosis* (Liu *et al.* 2007), donde se observó que, con niveles elevados de cobre, la expresión de CsoR era fuertemente inducida. En *Streptomyces lividans* se ha identificado una proteína CsoR (*SLI\_4375*) que modula un regulón de tres *loci*, constituido por dos operones tipo *copZA* y por su propio gen *csoR* (Dwarakanath *et al.* 2012).

En *S. lividans*, en condiciones de estrés por exceso de cobre, los iones Cu(I) se unen a las moléculas de proteína CsoR sin cobre (apo-CsoR) que están unidas al ADN, activando la desrepresión transcripcional de ATPasas de tipo P<sub>1</sub> (CopA) y metalochaperonas de tipo CopZ que permiten exportar rápidamente el Cu(I) del citosol, y finalmente induciendo también la expresión de *csoR* (Dwarakanath *et al.* 2012; Chaplin *et al.* 2015a). En condiciones limitantes de cobre, actúa una vía extracitoplásmica que incluye dos metalochaperonas de cobre (Sco y ECuC) (Blundell *et al.* 2013; Blundell *et al.* 2014). Esta vía sirve para entregar el cobre a la enzima citocromo c oxidasa (CcO) (Blundell *et al.* 2013) y a la oxidasa con radical cobre GlxA (Chaplin *et al.* 2015b; Petrus *et al.* 2016). GlxA es clave para la iniciación del desarrollo morfológico dependiente de cobre, específicamente en la transición de hifas vegetativas a hifas aéreas reproductivas, y si no recibe correctamente el cobre se detiene el desarrollo (Chaplin *et al.* 2015b; Petrus *et al.* 2016).

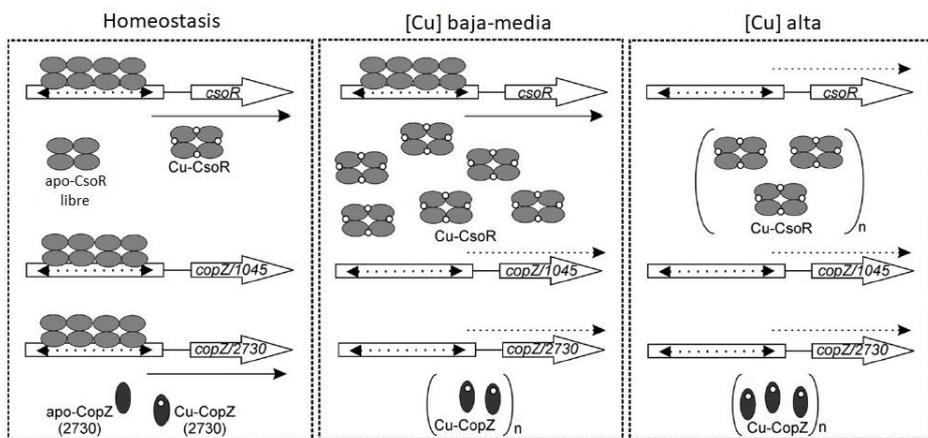


**Figura 9. Algunas de las proteínas asociadas al cobre en el citoplasma y en el ambiente extracelular de *Streptomyces*.** Círculo amarillo, Cu(II); círculo naranja, Cu(I); en azul oscuro reductasa cúprica; flechas en naranja indican transporte de cobre; en negro se ilustra el mecanismo, aún desconocido, de importe de Cu(I). En gris claro regulador transcripcional CsoR; en gris oscuro chaperonas de Cu(I) tipo CopZ; en verde ATPasas de cobre tipo CopA; en azul claro chaperonas de cobre extracitoplásmico (ceden el cobre a la enzima citocromo c oxidasa y a la oxidasa GlxA); en rojo GlxA; en rosa oxidasas multicobre; en morado lacasa. Adaptado de Vijgenboom y Keijser (2002), Worrall y Vijgenboom (2010), Petrus *et al.* (2016).

**Tabla 2. Resumen de los principales genes identificados en *S. coelicolor* con función relacionada al cobre.** Adaptado de Worrall & Vijgenboom (2010). Grupo: 1, enzimas; 2, transportadores de electrones; 3, chaperonas; 4, transportadores de cobre; 5, reguladores transcripcionales.

|         | Gen     | Producto del gen                                      | Referencias                      |
|---------|---------|---|----------------------------------|
| Grupo 1 | SCO2700 | Tirosinasa (melD2)                                    | (Yang & Chen 2009)               |
|         | SCO2837 | GlxA, actúa en la diferenciación morfológica          | (Chaplin <i>et al.</i> 2015b)    |
|         | SCO3439 | Oxidasa multicobre                                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO3440 | Oxidasa multicobre                                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO6710 | Glicosil hidrolasas                                   | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO6712 | Lacasa  | (Machczynski <i>et al.</i> 2004) |
|         | SCO7657 | Lisil oxidasa   | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO7671 | Chalcona sintasa                                      | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
| Grupo 2 | SCO2155 | Citocromo c oxidasa, subunidad I                      | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO2156 | Citocromo c oxidasa, subunidad II                     | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO7674 | Proteína de unión a metales                           | (Worrall <i>et al.</i> 2006)     |
| Grupo 3 | SCO1045 | Chaperona de cobre, CopZ                              | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO2701 | Tirosinasa (melD1)                                    | (Yang & Chen 2009)               |
|         | SCO2730 | Chaperona de cobre, CopZ                              | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO3965 | ECuC, chaperona de cobre                              | (Blundell <i>et al.</i> 2014)    |
|         | SCO3966 | Chaperona Sco1/SenC                                   | (Fujimoto <i>et al.</i> 2012)    |
| Grupo 4 | SCO0860 | ATPasa de tipo P                                      | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO1046 | ATPasa tipo P (operón con SCO1045)                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO2731 | ATPasa tipo P (operón con SCO2730)                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO3964 | Posible proteína de exporte de cobre                  | (Blundell <i>et al.</i> 2014)    |
|         | SCO4053 | Proteína con dominios similares a CopC/D              | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO4315 | Transportador CutC                                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
|         | SCO6117 | Transportador CutC                                    | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |
| Grupo 5 | SCO4136 | Regulador transcripcional en respuesta al cobre, CsoR | (Worrall & Vijgenboom 2010)      |

En condiciones de homeostasis, todas las secuencias del operador están ocupadas por dos tetrámeros de CsoR que reprimen la transcripción. En el citosol quedan algunas moléculas de CsoR no unido al cobre (apo-CsoR), y otras de CsoR y CopZ (SCO2730) unidos a cobre que actúan como tampón del metal. Cuando aumentan los niveles de cobre intracelular, la respuesta del sistema ocurre en tres pasos (Fig. 10).



**Figura 10. Esquema propuesto para la regulación del cobre en *S. lividans*.** La identidad de los genes corresponde al genoma de *S. coelicolor*. Tomado de Dwarakanath *et al.* (2012).

Una baja concentración de cobre puede ser tamponada por la chaperona CopZ (SCO2730) y el regulador apo-CsoR libres. En una concentración de cobre “intermedia”, el cobre se une a CsoR lo que permite la separación del represor de su operador, y la expresión de los genes *copZ* (SCO2730, SCO1045) y los genes *copA* (SCO2731, SCO1046). Una concentración de cobre aún más alta que la considerada intermedia, induce la unión del cobre a todas las moléculas de apo-CsoR que estaban unidas al operador del gen *csoR*, activando la

expresión del gen *csoR*. Consecuentemente se produce más CsoR que tamponará el cobre intracelular. En cuanto se restauran los niveles de cobre, las moléculas de apo-CsoR se unen de nuevo a las secuencias de los operadores, y el sistema regresa a su “estado basal” de homeostasis (Dwarakanath *et al.* 2012).

### **I.5. Manipulación genética en *Streptomyces***

Las técnicas de genética molecular son básicas para investigar la función de los genes, la diferenciación morfológica, la producción de metabolitos secundarios, la regulación de estos procesos y el flujo metabólico general de *Streptomyces* (Lilya & Andriy 2017). Esta información permite mejorar las cepas ya utilizadas en la industria, facilita el hallazgo/creación de nuevas cepas con potencial biotecnológico y contribuye a mejorar los procesos de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de actinomicetos.

El empleo de las técnicas de genética molecular se ha visto facilitado por el acceso a los genomas de los microorganismos a modificar genéticamente. Durante los últimos años se han desarrollado tecnologías de secuenciación con bajo coste y alto rendimiento, facilitando la secuenciación de numerosos genomas en un lapso de tiempo relativamente corto (Harrison & Studholme 2014; Kim *et al.* 2015; Studholme 2016). Las secuencias clasificadas como genomas del género *Streptomyces*, disponibles en la base de datos del *GenBank* a fecha de 15 de abril de 2018, son 1.153. De éstas, 117 corresponden a genomas completos (cromosoma y plásmidos), 25 a secuencias

cromosómicas, 463 a secuencias publicadas como *scaffolds* y 548 a secuencias publicadas como *contigs*.

### **1.5.1. Genoma de *Streptomyces***

El tamaño promedio del cromosoma lineal de *Streptomyces* está entre 8 y 9 Mb (Hopwood 2006). No obstante, hay algunas excepciones como el cromosoma de *S. cattleya* NRRL 8057 (6,28 Mb) (Barbe *et al.* 2011) y el de *S. rapamycinicus* NRRL 5491 (12,7 Mb) (Baranasic *et al.* 2013). El cromosoma de *Streptomyces* está formado por un “núcleo” central que contiene la mayor parte de los genes esenciales y dos “brazos” donde se concentran los genes no esenciales (Hopwood 2006). Además del cromosoma lineal, el genoma de la mayoría de especies de *Streptomyces* incluye plásmidos, normalmente uno o dos, circulares o lineales (Lilya & Andriy 2017).

El primer genoma de *Streptomyces* secuenciado fue el de *S. coelicolor* A3(2) y constituyó un hito en el campo de la microbiología industrial (Bentley *et al.* 2002). Este genoma tiene 8,7 Mb que incluyen 7825 secuencias codificantes (Bentley *et al.* 2002) y contiene al menos 15 agrupaciones de genes para la biosíntesis de posibles metabolitos secundarios aún no identificados (rutas crípticas), además de otros 5 que codifican antibióticos ya identificados (Romero-Rodríguez *et al.* 2018).

### **1.5.2. Mutagénesis en *Streptomyces***

Desde que se comenzó a investigar el género *Streptomyces*, surgió la necesidad de utilizar estrategias de mutagénesis. En los primeros años, las técnicas disponibles solo permitían obtener mutantes de manera aleatoria a través de tratamientos con agentes mutagénicos como la nitrosoguanidina (Delić *et al.* 1970) y la radiación ultravioleta (Hopwood & Sermonti 1962). Posteriormente, el desarrollo de técnicas de biología molecular permitió la interrupción y delección de genes de manera sitio-específica. Se desarrollaron técnicas de mutagénesis dirigida y plásmidos adecuados para su uso en *Streptomyces* que permiten la expresión de genes individuales, operones y agrupaciones génicas. Actualmente, se disponen de varios sistemas que facilitan la obtención de mutantes en *S. coelicolor*, tales como, reemplazo génico mediante PCR sitio dirigida y el sistema de recombinación  $\lambda$  RED conocido como REDIRECT (Gust *et al.* 2003), genoteca de cósmidos para obtener mutantes por transposición (Fernández-Martínez *et al.* 2011), y plásmidos que permiten la obtención de mutantes sin marcadores mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Tong *et al.* 2015).

### **1.5.3. Plásmidos integrativos en *Streptomyces***

Dentro de las técnicas más empleadas para la manipulación genética de *Streptomyces* se encuentra el uso de plásmidos integrativos (Fogg *et al.* 2017). En estos vectores, se emplea el sistema de recombinación sitio específica de algunos fagos para integrar ADN en el genoma bacteriano. Este proceso ocurre entre el sitio *attP* del plásmido

y el sitio *attB* del cromosoma bacteriano (Khaleel *et al.* 2011). Entre las ventajas que ofrecen estos plásmidos integrativos pueden mencionarse: su bajo número de copias dentro de las células bacterianas (normalmente una o, menos frecuente, dos copias en tándem); la incorporación permanente (herencia vertical) del material genético en el cromosoma bacteriano, y la posibilidad de evitar el riesgo de interrumpir genes esenciales (Smokvina *et al.* 1990; Burrus & Waldor 2004).

Algunos de los sistemas de integración utilizados en *Streptomyces* se muestran en la Tabla 3. Aunque cada uno pueda ofrecer ventajas para determinados diseños experimentales, el sitio *attP* del bacteriófago  $\Phi$ C31 ha sido, hasta el momento, el más utilizado y estudiado (Gregory *et al.* 2003).

Los vectores que incluyen el sitio *attP* del bacteriófago  $\Phi$ C31 fueron los primeros plásmidos integrativos (Bierman *et al.* 1992). A pesar de ofrecer ventajas como, permitir construcciones versátiles y poder usarse en un amplio rango de especies de *Streptomyces* (Bierman *et al.* 1992; Kieser *et al.* 2000), su principal limitación es que pueden integrarse en diferentes posiciones del genoma, lo que conlleva a distintas mutaciones y fenotipos en *Streptomyces* (Combes *et al.* 2002). Esto hace que los fenotipos observados puedan ser una consecuencia de la integración del plásmido en lugar de atribuirse a la construcción genética que se introduce, obstaculizando el estudio de genes de interés.

Los vectores de tipo  $\Phi$ BT1 se integran en el *attB* localizado en el gen *SCO4848* (genoma de *S. coelicolor*) (Gregory *et al.* 2003). Se ha descrito que su integración conlleva a la expresión de una versión

modificada pero funcional del gen *SCO4848*, sin causar efecto en el fenotipo de *Streptomyces* (Gregory *et al.* 2003).

**Tabla 3. Algunos sistemas de integración, derivados de fagos, utilizados en *Streptomyces*.**

| Fago | Integración en <i>Streptomyces</i>  | Referencias  |
|------|---|--|
| ΦC31 | Alrededor de 20 especies del género   | (Thorpe <i>et al.</i> 2000; Baltz 2012)              |
| ΦBT1 | <i>SCO4848</i> en el genoma de <i>S. coelicolor</i> y en su gen ortólogo en otras especies de <i>Streptomyces</i> | (Gregory <i>et al.</i> 2003; Baltz 2012)             |
| R4   | <i>S. parvulus</i> , <i>S. roseosporus</i> y probablemente en otros estreptomicetos                               | (Chater & Carter 1979; Baltz 2012)                   |
| VWB  | <i>S. venezuelae</i>  | (van Mellaert <i>et al.</i> 1998)                    |
| TG1  | <i>S. catleya</i> , <i>S. roseosporus</i> y en otras especies del género  | (Foor <i>et al.</i> 1985; Baltz 2012)                |
| SV1  | <i>S. venezuelae</i>  | (Smith <i>et al.</i> 2013; Fayed <i>et al.</i> 2014) |
| ΦJoe | <i>S. venezuelae</i>  | (Fogg <i>et al.</i> 2017)                            |

### OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue profundizar en la caracterización de genes que formen parte de las rutas biomoleculares que regulan los procesos de diferenciación y MCP en *Streptomyces*, incluyendo las fases pre-esporulantes (“transición MI/MII”) no contempladas en el ciclo de desarrollo tradicional. Para ello, se hicieron mutantes en genes que codifican los transcritos y proteínas que han sido detectados como diferencialmente expresados en las fases de MI, MII y MCP (Manteca *et al.* 2010b; Yague *et al.* 2013b). Tras la obtención de 8 mutantes, nos hemos centrado en la caracterización de la cepa mutada en el gen *SCO2730* (chaperona de cobre, *copZ*). Uno de los fenotipos de este mutante, el retraso en la germinación, fue lo que nos llevó a necesitar plásmidos integrativos que no afectaran a este proceso.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Crear mutantes en genes diferencialmente expresados en las fases de MI, MII, MCP y caracterizar sus fenotipos.
2. Diseñar y construir plásmidos integrativos que no causen ningún efecto en el fenotipo de *S. coelicolor*.
3. Analizar la función de CopZ (*SCO2730*), chaperona de cobre, y de CopA (*SCO2731*), ATPasa tipo P<sub>1</sub> transportadora de cobre.
4. Estudiar el efecto del cobre en la germinación, la diferenciación y la producción de metabolitos secundarios, y establecer un modelo que correlacione la concentración de cobre citosólico con la diferenciación, fisiológica y morfológica de *S. coelicolor*.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## **II.1. Obtención, validación y análisis fenotípico de mutantes insercionales en *S. coelicolor***

### **II.1.1. Obtención de mutantes insercionales en *S. coelicolor***

Con base en resultados de trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Manteca *et al.* 2010b; Yague *et al.* 2013b), se seleccionaron genes con expresión diferencial en las distintas fases del ciclo de vida de *Streptomyces*: primer micelio (MI, 12 horas), segundo micelio (MII) vegetativo (24 y 48 horas) y reproductivo (72 horas). Los genes seleccionados (Tabla 4) además de tener diferencias significativas en la abundancia de sus transcritos (Yague *et al.* 2013b) están conservados en el género *Streptomyces*.

A partir de la cepa *S. coelicolor* M145 (Kieser *et al.* 2000) se generaron mutantes en los genes nombrados en la Tabla 4. Se empleó la metodología desarrollada por Fernández-Martínez *et al.* (2011). En primer lugar, se solicitaron los cósmidos con la inserción del transposón Tn5062 en los genes de interés (Tabla 4) al grupo del Prof. Paul Dyson (Universidad de Swansea). La información sobre estos cósmidos está en la base de datos de *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Para introducirlos en *Streptomyces* hubo que transferirlos primeramente a una cepa de *E. coli* conjugativa y no metilante, ya que los recibimos clonados en la cepa *E. coli* JM109 (Tabla 5).

**Tabla 4. Genes interrumpidos en *S. coelicolor* por inserción del transposón Tn5062.**

Los detalles del cósmido y la posición exacta de la inserción del transposón pueden consultarse en <http://strepdb.streptomyces.org.uk>. MI, primer micelio, 12 h; MII<sub>24</sub>, segundo micelio, 24 h; MII<sub>48</sub>, segundo micelio, 48 h; MII<sub>72</sub>, segundo micelio, 72 h. Abundancia de transcritos en cada fase del ciclo de vida expresada como log<sub>2</sub> MII/MI. Datos de abundancia relativa tomados de Yagüe *et al.* (2013b); las diferencias de abundancia de todos los transcritos son significativas (p-valor menor a 0,05).

| Gen     | Cósmido        | Función                                      | Log <sub>2</sub><br>MII <sub>24</sub> /MI | Log <sub>2</sub><br>MII <sub>48</sub> /MI | Log <sub>2</sub><br>MII <sub>72</sub> /MI |
|---------|----------------|--|---|---|---|
| SCO2263 | 1G2.2.G10      | Proteína hipotética                          | 1,6                                       | 1,6                                       | 5.10 <sup>-3</sup>                        |
| SCO2730 | C46.2.D06      | Chaperona de cobre, CopZ                     | -2,4                                      | -1,9                                      | 1.10 <sup>-6</sup>                        |
| SCO2805 | 2StC13.1.F09   | Proteína hipotética conservada               | 3,6                                       | 3,4                                       | 1.10 <sup>-2</sup>                        |
| SCO2908 | E19A-Rep.1.G12 | Proteína hipotética                          | 2,1                                       | 2,0                                       | 4.10 <sup>-3</sup>                        |
| SCO3134 | SCE66.2.F11    | Sistema de dos componentes                   | 3,0                                       | 3,2                                       | 4.10 <sup>-2</sup>                        |
| SCO3367 | SCE94.2.E09    | Regulador transcripcional de la familia TetR | -1,6                                      | -1,2                                      | 2.10 <sup>-4</sup>                        |
| SCO4793 | SCD63A.1.F08   | Proteína secretada de la familia NPL/P60     | 3,8                                       | 3,9                                       | 3.10 <sup>-4</sup>                        |
| SCO6743 | 5F2A.2.A08     | Proteína transcripcional accesoria           | -1,2                                      | -0,9                                      | 4.10 <sup>-3</sup>                        |

Una vez recibidos los cósmidos, las cepas que los portaban se inocularon en medio LB + glucosa (Tabla 6) suplementado con apramicina (100 µg/mL), resistencia que tienen los cósmidos, a 37 °C con agitación de 250 rpm toda la noche. Para extraer los cósmidos se utilizó el kit *GenElute HP Plasmid Miniprep* (Sigma®). La elución del ADN se hizo en 50 µL de agua destilada estéril. Con 20 µL del ADN extraído, se transformaron células electrocompetentes de la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta transformación se llevó a cabo en cubetas de

electroporación de 0,2 cm, usando el programa *Ec1* (1 pulso de 1,8 kV) del electroporador *Micropulser* (Bio-Rad®) con constante de tiempo esperada entre 3,80 y 5,40 ms. Se utilizó la cepa ET12567/pUZ8002 por estar mutada en la metilación del ADN (*dam<sup>-</sup>dcm<sup>-</sup>* véase Tabla 5) (MacNeil *et al.* 1992) e incluir el plásmido pUZ8002 (Tabla 5), que no es transferible pero tiene las funciones que actúan en *trans* para la movilización de cósmidos/plásmidos que tengan un *oriT* (Paget *et al.* 1999).

**Tabla 5. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.**

| Cepa                           | Genotipo  | Origen/Referencia                       |
|--------------------------------|---|---|
| <b><i>Escherichia coli</i></b> |   |   |
| TOP10                          | F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>  | Invitrogen®                             |
| ET12567                        | F- <i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143::Tn10 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsLhisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44 Cm<sup>R</sup></i>   | (MacNeil <i>et al.</i> 1992)            |
| ET12567/pUZ8002                | <i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, oriT-RP4 Cm<sup>R</sup> Kan<sup>R</sup></i>  | (Paget <i>et al.</i> 1999)              |
| JM109/cósmido                  | <i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB<sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>Iq</sup> lacZΔM15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) Apra<sup>R</sup></i> | (Fernández-Martínez <i>et al.</i> 2011) |

Las cepas derivadas de *E. coli* ET12567/pUZ8002 se incubaron a 37 °C en medio sólido (agar al 2%) o líquido 2xTY (Tabla 6). En el caso de las cepas ET12567/pUZ8002/cósmido(Tn5062) los medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos y las concentraciones finales indicados a continuación: cloranfenicol (25 µg/mL) para mantener la mutación en la metilasa *dam* de la cepa ET12567, kanamicina (50 µg/mL) para mantener la selección del plásmido pUZ8002, y apramicina (100 µg/mL) por ser la resistencia que confiere el cósmido.

**Tabla 6. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E. coli*.**

| <b>Medios de cultivo para <i>E. coli</i> (cantidades para 1L)</b>                                 |  |
|---|--|
| <b>LB</b> (Miller 1971)   | <b>2xTY</b> (Sambrook & Russel 2001)                           |
| 5 g NaCl  | 5 g NaCl   |
| 5 g de Extracto de levadura   | 15 g Triptona  |
| 10 g de Triptona  | 10 g Extracto de levadura                                      |
| Para obtener LB enriquecido con glucosa ( <b>LB + glucosa</b> ) añadir 1% de glucosa a la mezcla. | Para obtener medio sólido añadir 1,5 g de agar por cada 100mL. |

La transferencia de los cósmidos desde las cepas ET12567/pUZ8002/cósmido(Tn5062) hacia *S. coelicolor* M145 (cepa Wt) se hizo mediante conjugación. Para la conjugación se siguió el protocolo descrito por Kieser *et al.* (2000), con la siguiente modificación: se utilizó un inóculo de la cepa donadora crecido toda la noche, en lugar de un inóculo preparado el día de la conjugación con D.O. a 600 nm de 0,4 a 0,6. Más concretamente, para la conjugación se utilizaron 5 mL de un cultivo de 10 mL (medio LB + glucosa con 25 µg/mL cloranfenicol, 50

µg/mL kanamicina, 100 µg/mL apramicina). Los 5mL restantes se utilizaron para preservar las cepas. Para esto, se centrifugó el cultivo, se eliminó el medio de cultivo y las células (*pellet*) se resuspendieron en glicerol al 30%. Se hicieron alícuotas de 500 µL que se guardaron a -80 °C.

### **II.1.2. Validación de los mutantes de *S. coelicolor* generados por la inserción con el transposón Tn5062**

Para seleccionar los exconjugantes de *S. coelicolor* con doble sobrecruzamiento, es decir, resistentes a apramicina pero sensibles a kanamicina, se sembraron entre 200 y 500 colonias resultantes de la conjugación haciendo placas réplica en medio sólido GYM (Tabla 7) suplementado con apramicina (25 µg/mL) y en GYM suplementado con kanamicina (50 µg/mL), en ambos casos también se suplementó con ácido nalidíxico (25 µg/mL) para eliminar las células de *E. coli*.

Los clones que crecieron en apramicina pero no en kanamicina, después de al menos tres pases por medios suplementados con estos antibióticos, se sembraron en medio sólido SFM (Tabla 7) suplementado con apramicina (25 µg/mL) y SFM suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Al descartar crecimiento en el medio con kanamicina, luego de 3 días de incubación a 30 °C, los cultivos de *S. coelicolor* en SFM con apramicina se dejaron por 4-9 días más a 30 °C. Pasado este tiempo, se procedió a comprobar mediante PCR y, posteriormente, *Southern Blot* los clones aparentemente positivos.

**Tabla 7. Medios de cultivo utilizados en este trabajo para el crecimiento de *Streptomyces*.**

| Medio de cultivo para cepas de <i>Streptomyces</i> (cantidades para 1L)  |   |
|--|---|
| <p><b>R5A sin sacarosa</b> (Fernández <i>et al.</i> 1998)</p> <p>0,25 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><br/>                     10,12 g MgCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O<br/>                     10 g Glucosa<br/>                     0,1 g Difco casaminoácidos<br/>                     200 µL (10x) Oligoelementos<br/>                     5 g Extracto de levadura<br/>                     21 g MOPS<br/>                     Ajustar el pH a 6,8 con KOH de una solución concentrada.<br/>                     20 g Agar</p>   | <p><b>GYM</b> (Novella <i>et al.</i> 1992)</p> <p>5 g Glucosa<br/>                     4 g Extracto de levadura<br/>                     5 g Extracto de malta<br/>                     0,5 g MgSO<sub>4</sub>* 7H<sub>2</sub>O<br/>                     20 g Agar<br/>                     Después de esterilizar y antes de repartir en placas, suplementar con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (también estéril) para una concentración final de 0,25 g/L.</p>  |
| <p><b>R2</b> (Kieser <i>et al.</i> 2000)</p> <p>128,8 g Sacarosa<br/>                     0,313 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><br/>                     12,7 g MgCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O<br/>                     12,5 g Glucosa<br/>                     0,125 g Difco Casaminoácidos</p> <p>Repartir 80 mL en botellas con 2,75 g de agar y se autoclavan.</p> <p>Después de autoclavar el medio, suplementar con:</p> <p>1,25 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 %)<br/>                     10 mL CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O (3,68 %)<br/>                     1,875 mL L-proline (20%)<br/>                     12,5 mL Tampón TES (5,73%) Ajustar pH a 7,2<br/>                     0,25 mL oligoelementos<br/>                     0,625 ml NAOH (1N) (sin autoclavar)</p> <p><b>Medio R2YE:</b> añadir a cada botella 6,25 mL de Extracto de levadura Difco al 10 %.</p> | <p><b>MM glucosa</b> (Kieser <i>et al.</i> 2000)</p> <p>0,5 g L-Asparagina<br/>                     0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><br/>                     0,2 g MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O<br/>                     0,01 g FeSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O<br/>                     10 g Glucosa (añadir después de autoclavar el medio)<br/>                     10 g Agar<br/>                     Ajustar pH a 7-7,2<br/>                     Después de autoclavar añadir 2 mL de glucosa al 50% por cada 100 mL de medio MM. La glucosa se esteriliza por filtración.</p> <p><b>TSA</b> (Kieser <i>et al.</i> 2000)</p> <p>30 g <b>TSB:</b> 17 g/L Peptona de caseína<br/>                     2,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><br/>                     Glucosa 2,5 g/L<br/>                     Cloruro de sodio 5 g/L<br/>                     Peptona de soja 3 g/L<br/>                     pH final 7,3</p> <p>20g Agar</p> |

|  |   |
|--|---|
| <p><b>SFM</b> (Kieser <i>et al.</i> 2000)<br/>                 20 g Harina de soja<br/>                 20 g Manitol<br/>                 20 g Agar</p>  | <p><b>ONA comercial:</b> Agar nutritivo de OXOID<br/> <b>ONA suave:</b> mezclar misma cantidad de medio ONA comercial fundido con medio ONA preparado sin agar.<br/> <b>ONA</b> (para 1 L):<br/>                 1 g Extracto de carne<br/>                 1 g Extracto de levadura<br/>                 5 g Peptona<br/>                 5 g NaCl<br/>                 Ajustar el pH a 7,4.</p> |
| <p><b>ME</b> (Sánchez &amp; Braña 1996)<br/>                 21 g MOPS<br/>                 5 g Glucosa<br/>                 0,5 g Extracto de levadura<br/>                 0,5 g Extracto de carne<br/>                 1 g NZ amina<br/>                 Ajustar el pH a 7 y añadir agar al 2%.</p> |   |

### a) Comprobación mediante amplificación por PCR

A partir de muestras de cultivos de 7-12 días, en función de lo que tardara en crecer y esporular cada cepa, se extrajo el ADN cromosómico de los clones considerados positivos hasta el momento utilizando el kit GenElute™ *Bacterial Genome DNA* (Sigma). Para ello, se inoculó en 5 mL de medio TSB (Tabla 7) cada cepa a comprobar y se incubó toda la noche a 30 °C y con agitación de 200 rpm. Se centrifugaron 1,5 mL del cultivo durante 2 min a 12000-16000 xg y se eliminó completamente el medio de cultivo. Con el *pellet* obtenido se siguió el protocolo indicado en el kit.

La sensibilidad/resistencia a kanamicina y apramicina se confirmó mediante amplificación por PCR de los genes de resistencia a estos antibióticos. Para ello, se utilizaron dos parejas de cebadores:

KanF 5' GATGGCTTTCTTGCCGCC 3'

KanR 5' TCGGTCATTTCGAACCCC 3'

ApraF 5' CGGGGTACCCTCACGGTAACTGATGCC 3'

ApraR 5' ATTTAATGCGGATGTTGCG 3'

Las reacciones de PCR se prepararon en 20  $\mu$ L de volumen final, de acuerdo a las indicaciones para la polimerasa de ADN utilizada, BIOTAQ™ *DNA Polymerase* (Bioline). El ciclo de PCR empleado fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de: 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, y 72 °C por 25 s; y un paso de extensión final a 72 °C por 5 min. Se consideraron positivos aquellos clones en los que amplificó el gen de apramicina (1400 pb) y no el de kanamicina (902 pb). Como controles positivos se utilizaron clones con resistencia, previamente confirmada, a estos antibióticos. Como controles negativos se usaron el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor* y agua de grado PCR.

### **b) Comprobación de mutantes mediante *Southern Blot***

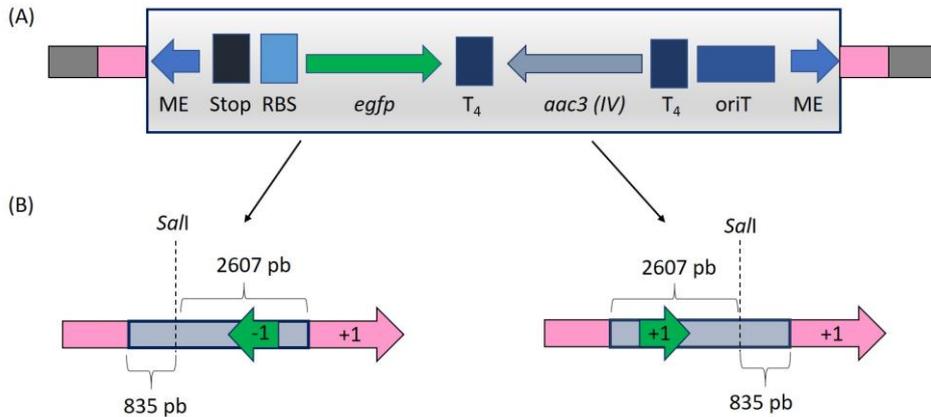
Para acabar de confirmar la interrupción de los genes de interés en los clones que resultaron positivos de la PCR anterior, se realizaron análisis por *Southern Blot*. Para esto, se siguió el protocolo descrito por Green & Sambrook (2012), utilizando el ADN cromosómico de los clones positivos y el ADN del cósmido correspondiente a cada uno de ellos (como referencia), ambos digeridos con la enzima *Sall*.

Para extraer el ADN de los cósmidos a partir de las cepas de *E. coli JM109* que los portaban, se utilizó el kit *GenElute HP Plasmid Miniprep* (Sigma®), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se hizo en 50  $\mu$ L de agua destilada estéril. El ADN cromosómico que se digirió para usar en el *Southern Blot* se extrajo por *Salting Out*, protocolo que se mostrará al final de este apartado. El método de

*Salting Out*, permite obtener más cantidad que la que se puede obtener por el kit GenElute™ *Bacterial Genome DNA* (Sigma) descrito arriba.

En la hibridación por *Southern Blot* se utilizó como sonda el transposón Tn5062 (3442 pb) marcado con digoxigenina, obtenido de la digestión del plásmido pQM5062 (Bishop *et al.* 2004) con la enzima *PvuII*. Para determinar los tamaños de las bandas esperadas de cada hibridación, se buscó en la base de datos *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) la información relativa a los cósmidos: coordenadas en el genoma de *S. coelicolor*, orientación (5' a 3' ó 3' a 5'), y sentido con respecto al gen donde está la inserción (p. ej. -1/+1). Se estimaron los fragmentos del cósmido digerido con *Sall* utilizando la plataforma *NEBcutter V2.0*, y se localizó el fragmento que incluía la posición de inicio del cósmido. Para calcular el tamaño de las bandas esperadas en cada *Southern Blot* se sumó a los valores obtenidos 835 ó 2607 pb (Fig. 11), según correspondiera dependiendo de la orientación del transposón, ya que la digestión del transposón con *Sall* deja fragmentos de estos tamaños hacia cada lado del corte con la enzima.

Los clones que resultaron positivos para la inserción en los análisis por *Southern Blot*, se conservaron en forma de esporas en glicerol al 30% y congelados a -80 °C, al igual que la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. Las esporas de las cepas mutantes se obtuvieron de cultivos, en medio sólido SFM con apramicina (25 µg/mL), provenientes de una colonia aislada.



**Figura 11. Esquema de la estructura del transposón Tn5062 y su inserción en el gen mutado.** (A) Transposón Tn5062, adaptado de Bishop *et al.* (2004). En gris se muestra la región cromosómica de *S. coelicolor*; en rosa el gen interrumpido; en verde el gen *egfp*. ME: *Mosaic End*. Stop: terminador de la traducción. RBS: sitio de unión al ribosoma. *aac3(IV)*: gen de resistencia a apramicina. T<sub>4</sub>: terminador transcripcional. *oriT*: origen de transferencia. (B) Posibles orientaciones del transposón, en azul. Se toma el gen *egfp*, verde, como referencia de orientación con respecto al gen mutado (rosa). El tamaño de los fragmentos que se generan tras la digestión con *Sall* depende de la orientación del transposón y del sitio de corte en el cromosoma de *S. coelicolor*.

### II.1.3. Búsqueda de fenotipos en los mutantes de *S. coelicolor* obtenidos

Las esporas de las cepas silvestre y mutantes de *S. coelicolor* M145, se obtuvieron a partir de cultivos en medio sólido SFM con incubación a 30 °C durante 7-12 días. Pasado este tiempo, los cultivos de *S. coelicolor* comúnmente tienen un color grisáceo en la superficie debido al pigmento que se produce en las esporas. No obstante, en algunos casos, debido a las mutaciones generadas, las esporas maduras carecen de pigmento o incluso éstas no llegan a formarse. En los clones de mutantes que no tenían la coloración característica de la

esporulación, se confirmó que había esporas mediante la observación de una muestra de cultivo en el microscopio óptico.

Para obtener suspensiones de esporas frescas, se raspó con una torunda estéril la superficie del cultivo tras añadir 8-10 mL de agua destilada estéril. La concentración de esporas en estas suspensiones se cuantificó midiendo la D.O. a 600 nm y utilizando una recta patrón para esporas de *S. coelicolor*. Para los análisis fenotípicos, se inocularon  $1.10^7$  esporas frescas (es decir, no congeladas ni almacenadas a 4 °C por más de 10-12 días) en placas de Petri (8,5 cm de diámetro) con 25 mL de medio sólido GYM cubierto con discos de celofán (películas de acetato de celulosa) estériles.

Los análisis preliminares de los fenotipos de los mutantes se hicieron como se detalla a continuación:

- El ciclo de desarrollo se analizó en medio sólido. Las muestras de cultivos se recogieron y se procesaron para microscopía en las diferentes fases del ciclo de vida de *Streptomyces*: germinación (7-8 h), MI (15-16 h), MII temprano (24 h), MII (48 h), MII tardío (63 h), esporulación (72h); como se ha descrito previamente (Manteca *et al.* 2006). Las células se tiñeron con yoduro de propidio y SYTO-9 (LIVE/DEAD *BacLight Bacterial Viability Kit*, Invitrogen®, L-13152). Estas muestras se observaron en el microscopio láser confocal LEICA® TCS-SP2-AOBS, utilizando longitudes de onda de 488 nm y 568 nm para la excitación y de 530 nm (verde) o 640 nm (rojo) para la emisión (Manteca *et al.* 2006).

- La producción de antibióticos se analizó en medio líquido. Matraces lisos de 100 mL de capacidad conteniendo 20 mL de medio R5A sin sacarosa (Fernández *et al.* 1998) que se inoculó a una concentración final de  $1.10^7$  esporas/mL. Estos cultivos se incubaron a 30 °C y 200 r.p.m. (Manteca *et al.* 2008a). En estos experimentos preliminares, se determinó la producción de undecilprodigiosina y actinorrodina mediante la observación del cambio de color del cultivo a rojo y azul, respectivamente (Bystrykh *et al.* 1996a).

Tal como se detallará más adelante, en el caso del mutante con los fenotipos más destacados (cepa *SCO2730::Tn5062*) se hicieron análisis fenotípicos mucho más exhaustivos.

## **II.2. Construcción de los plásmidos pNG1-4 y caracterización de los fenotipos que generan al integrarse en el cromosoma de *Streptomyces***

### **II.2.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo**

En el estudio de los fenotipos generados por plásmidos integrativos basados en  $\Phi$ BT1, además de *S. coelicolor* M145, se emplearon las cepas: *S. griseus* NBRC 13350 (anteriormente IFO 13350), *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. lividans* 1326 (Tabla 8). Las esporas de *S. lividans* 1326 y *S. griseus* NBRC 13350, al igual que las de *S. coelicolor* M145, se obtuvieron a partir de cultivos en medio sólido SFM. Mientras que, las esporas de *S. clavuligerus* ATCC 27064 se obtuvieron de cultivos en ME (Tabla 7) porque esta cepa no esporula bien en medio SFM. En el caso de *S. coelicolor* M145, también se obtuvieron esporas de medio

sólido GYM. Todas las cepas de las distintas especies de *Streptomyces* se incubaron a 30 °C.

**Tabla 8. Cepas de *Streptomyces* utilizadas en este trabajo.**

| Cepa                              | Observaciones                                | Origen/Referencia                 |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>S. coelicolor</i> M145         | SCP1- SCP2                                   | (Kieser <i>et al.</i> 2000)       |
| <i>S. griseus</i> NBRC 13350      | Anteriormente <i>S. griseus</i><br>IFO 13350 | (Ohnishi <i>et al.</i> 2008)      |
| <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 |  | (Song <i>et al.</i> 2010)         |
| <i>S. lividans</i> 1326           |  | (Cruz-Morales <i>et al.</i> 2013) |

Para los análisis de germinación, los cultivos sólidos de todas las cepas se realizaron tal como se describió en la sección 1.3 para *S. coelicolor*: se inocularon  $1.10^7$  esporas frescas de *Streptomyces* en medio sólido cubierto con discos de celofán estériles. Se utilizó medio sólido GYM en el caso de *S. coelicolor*, *S. griseus* y *S. lividans*, y medio sólido TSA (Tabla 7) para *S. clavuligerus*, debido a que esta última cepa germina muy lento en medio GYM. Para todas las cepas, se utilizaron además MM con glucosa y R2YE (Tabla 7). En el caso de los cultivos de las cepas portando el plásmido pMS82 o sus derivados, se suplementó el medio con higromicina, a una concentración final de 200 µg/ml.

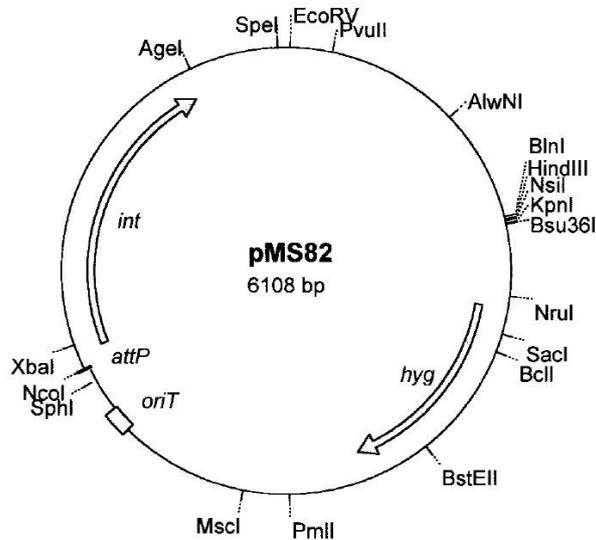
Los cultivos en medio líquido se hicieron en medio R5A sin sacarosa (Tabla 7). Estos cultivos se prepararon en 50 mL de medio, utilizando matraces de 250 mL sin indentaciones, y se inocularon con  $1.10^7$  esporas/mL a partir de suspensiones de esporas frescas. La incubación fue a 30 °C con 200 r.p.m. de agitación.

Las cepas derivadas de *E. coli* TOP10 y *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Tabla 5), crecieron en medio 2xTY sólido (con agar al 2%) o líquido, y también en medio líquido LB + glucosa (Tabla 6). Todos estos medios se suplementaron con los antibióticos necesarios en función de la cepa bacteriana/plásmidos a las concentraciones finales indicadas a continuación: cloranfenicol (25 µg/mL), ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), higromicina (100 µg/mL).

Las cepas de *E. coli* y de *Streptomyces*, se conservaron en glicerol al 30% a - 80 °C. En el caso de *Streptomyces* las células que se almacenaron congeladas eran esporas.

### II.2.2. Estudio del sitio de integración de $\phi$ BT1

Con el fin de confirmar que la integración de pMS82 (Fig. 12) siempre ocurre en el mismo gen, se diseñaron dos cebadores. Uno de ellos hibrida en el extremo 5' de *SCO4848*, específicamente a 33 pb corriente arriba de la ORF *SCO4848*. El otro *primer* reconoce una región de ADN que flanquea el sitio *attP* en pMS82 (pMS82R, hibrida a 368 pb corriente abajo del *attP* de pMS82). Con estos cebadores se amplifica un fragmento de 617 pb sólo si pMS82 o alguno de sus plásmidos derivados están integrados en el sitio *attB* de *SCO4848*.



**Figura 12. Plásmido pMS82.** Tomado de Gregory *et al.* (2003).

### II.2.3. Análisis de la transcripción de los genes *SCO4848* y *SCO4849*

#### a) Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir de muestras de cultivos de 24 h, crecidos en medio sólido GYM con celofán, de las cepas: *S. coelicolor* M145 (cepa Wt), *S. coelicolor* M145[pMS82] (cepa pMS82), y *S. coelicolor* M145 [pNG1] (cepa pNG1). También se realizó la extracción de ARN total a partir de muestras de cultivos de 72 h de la cepa Wt, crecidos en medio sólido GYM con celofán. En el momento de su recogida, las muestras se trataron con *RNAprotect™ Bacteria Reagent* (Qiagen), para proteger el ARN de la degradación e inhibir la síntesis de nuevos transcritos. El tratamiento consistió en resuspender la cantidad de micelio recogida en el doble de su peso/volumen de *RNAprotect™*, mezclar con el vórtex y dejar a temperatura ambiente 5 min. Centrifugar a 12.000 xg por 5 min, decantar el sobrenadante y

eliminar los restos de éste secando sobre papel. Las muestras ya tratadas se guardaron a -80 °C hasta el momento de la extracción.

El ARN total se obtuvo utilizando el kit *RNeasy midi* (Qiagen®) e incluyendo la extracción con fenol. Para la eliminación del ADN cromosómico se hicieron dos tipos de tratamientos: el primero, con *DNase I (RNase-Free DNase Set Qiagen®)*, realizado en columna durante la extracción del ARN, y el segundo, con *Turbo DNase (TURBO DNA-free™, Ambion®)*, aplicado al ARN en solución al finalizar la extracción. La integridad del ARN se verificó en un Bioanalizador 2100 (Agilent®) y su concentración se determinó en un equipo Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific®).

### **b) Análisis de expresión génica mediante transcripción inversa (RT-PCR)**

El análisis de transcripción inversa (RT-PCR) se llevó a cabo con el sistema *SuperScript™ III One-Step RT-PCR Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®). Este sistema, incluye en una misma reacción una enzima retrotranscriptasa, para obtener ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, y una polimerasa de ADN, que utiliza como molde el ADNc generado para amplificar el producto esperado. Para esto, se utilizaron 200 ng de ARN total como molde. En los controles positivos se usó ADN cromosómico de la cepa Wt como molde. En los controles negativos, se utilizó ARN de la cepa Wt con la polimerasa de ADN *Taq Platinum* que incluye el kit de RT-PCR empleado.

**b.1) Comprobación de la transcripción acoplada de los genes *SCO4848* y *SCO4849***

Para comprobar la transcripción acoplada de los genes *SCO4848* y *SCO4849*, se utilizaron las muestras de ARN de cultivos de 72 h y los cebadores:

RT4848F 5' GGATCCGGACAGCGTGCG 3'

RT4849R 5' CAGCGGCCGGACGACCT 3'

Los cebadores RT4848F y RT4849R, hibridan en las posiciones -15 de la ORF *SCO4848* y 285 de la ORF *SCO4849*, respectivamente. Si los dos genes se transcriben juntos, se amplifica un producto de 623 pb. El programa utilizado para la RT-PCR fue el siguiente: transcripción inversa a 55 °C por 30 minutos; desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; *touchdown* en 10 ciclos, durante los cuales la temperatura de hibridación se redujo 1 °C en cada ciclo (94 °C por 15 s, 65 °C (-1 °C/ciclo) por 30 s y 68 °C por 35 s); 35 ciclos (94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s, y 68 °C por 35 s); extensión final a 68 °C por 5 min.

**b.2) Análisis de la transcripción del gen *SCO4849***

Para analizar la transcripción del gen *SCO4849* (amplicón de 297 pb), se utilizó el ARN de la cepa Wt obtenido a las 24 h y los cebadores RT4849F/RT4849R, que hibridan en las posiciones 1 y 285 de la ORF *SCO4849*, respectivamente.

RT4849F 5' ATGGTGGTCGTCTTCGTGCT 3'

RT4849R 5' CAGCGGCCGGACGACCT 3'

Las condiciones de la RT-PCR fueron las siguientes: síntesis de ADN complementario (ADNc) a 60 °C por 30 min; desnaturalización a 94

°C por 2 min; amplificación por PCR en 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 65 °C por 30 s y 68 °C por 15 s; extensión final a 68 °C por 5 min.

#### II.2.4. Construcciones génicas realizadas con ADN sintético

La síntesis de secuencias se subcontrató a *GeneCust Europe* (<http://www.genecust.com/en/index.php>). De esta forma se obtuvo el gen *SCO4848* (253 pb) con mutaciones silenciosas en el sitio *attB* (número de acceso en base de datos del NCBI, KR150757) y la secuencia *P<sub>ermE</sub>\*+RBS+MCS+fd-ter* (638 pb; número de acceso en base de datos del NCBI, KR131846). Las secuencias se recibieron clonadas en el plásmido pBluescript II SK<sup>+</sup> (Tabla 9), que tiene resistencia a ampicilina, junto con los ficheros de su secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias se comprobaron usando los programas *Sequence Scanner* v1.0, BioEdit y Vector NTI. El liófilo recibido se resuspendió en 40 µL de agua destilada y usando 2 µL de una dilución 1/10 se transformaron células de *E. coli* TOP10 siguiendo el protocolo descrito a continuación.

#### Protocolo de transformación en células competentes químicas de *E. coli* TOP10

1. Descongelar en hielo una alícuota (100 µL) de células competentes.
2. Añadir el ADN y dejar la mezcla en hielo durante 30 min.
3. Incubar a 42 °C durante 90 s. Dejar en hielo por 2 min.
4. Agregar 400-600 µL de medio LB + glucosa, a temperatura ambiente.
5. Incubar durante 45 min-1 h a 37 °C con agitación de 250 rpm.
6. Sembrar, 100-300 µL por placa, en medio sólido 2xTY suplementado con el antibiótico apropiado. Incubar a 37 °C toda la noche.

Las cepas de *E. coli* transformadas con pBluescript II SK<sup>+</sup>/SCO4848 y pBluescript II SK<sup>+</sup>/*P<sub>ermE</sub>*\*+RBS+MCS+*fd-ter*, se sembraron en medio sólido 2xTY suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Se seleccionó una colonia aislada de cada transformación y se inoculó en 100 mL de medio líquido LB + glucosa suplementado con ampicilina (100 µg/mL). A partir de este cultivo, se extrajo ADN plasmídico siguiendo un protocolo para extracción a gran escala (cultivos de volumen ≥ 100 mL), *maxiprep*. A continuación de la Tabla 9, se describe el protocolo exacto de *maxiprep* que se utilizó en este trabajo, basado en el método de lisis alcalina (Bimboim & Doly 1979).

**Tabla 9. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

| Plásmido                                      | Observaciones  | Origen/referencia            |
|---|--|------------------------------|
| pBluescript II SK+                            | Sitio de clonación múltiple, Amp <sup>R</sup>                                      | <i>GeneCust Europe</i>       |
| pUC57   | Vector de clonación, Amp <sup>R</sup>  | <i>GeneCust Europe</i>       |
| pCR <sup>TM</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> | Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR <i>Cloning Kit</i> , Km <sup>R</sup> | Invitrogen <sup>®</sup>      |
| pMS82   | Vector de clonación, Hyg <sup>R</sup>  | (Gregory <i>et al.</i> 2003) |

Protocolo de *maxiprep* (basado en el método de lisis alcalina)

1. Inocular una colonia aislada o 100-200µL de un inóculo en 100mL de medio LB + glucosa ó 2xTY suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Incubar a 37 °C durante 14-20 horas con agitación.
2. Centrifugar por 5 min a 8.500 rpm y 4 °C. Eliminar el sobrenadante.

3. Resuspender el *pellet* en 3,6 mL de TEG. Añadir 100  $\mu$ L de lisozima (50 mg/mL).
4. Añadir 8 mL de solución fresca de NaOH-SDS (2 volúmenes). Mezclar por inversión. Dejar 10 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 4 mL de solución III (fría). Agitar rápida y fuertemente, dejar 10 min en hielo.
6. Centrifugar 10 min a 8000 rpm y 4 °C. Filtrar el sobrenadante a través de un algodón hidrófilo y transferir a un tubo nuevo.
7. Agregar 0,6 volúmenes de isopropanol y mezclar por inversión. Dejar 10 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar por 15 min a 6.000 rpm y temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
9. Lavar el *pellet* con 5 mL de etanol al 70%, centrifugando por 5 min. Quitar el etanol con cuidado.
10. Resuspender en 600  $\mu$ L de tampón TE y pasar a un tubo de 1,5 mL (se puede dejar a 4 °C hasta el día siguiente).
11. Agregar 4  $\mu$ L de RNasa (10  $\mu$ g/mL) e incubar por 1 hora a 37 °C.
12. Añadir un volumen de fenol:cloroformo (50:50). Mezclar por inversión durante 1 min y centrifugar 5 min a 13.200 rpm.
13. Transferir la fase orgánica a un nuevo tubo y añadir 1 volumen de cloroformo. Mezclar por inversión 1 min y centrifugar 5 min a 13.200rpm.
14. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo (de 2 mL). Precipitar el ADN: añadir 60  $\mu$ L (1/10 volúmenes) de acetato sódico 3M (pH 5,2) y etanol frío (100%) hasta llenar el tubo (2-3 volúmenes).
15. Agitar hasta que se vea blanco, dejar 10 min o más tiempo a -20 °C (se puede dejar toda la noche).
16. Centrifugar 10 min a 14.000rpm y descartar el sobrenadante.

17. Lavar el precipitado con 1 mL de etanol (70%), centrifugar por 1-2 min.  
Retirar el etanol con cuidado y resuspender en agua destilada estéril (volumen en función del *pellet*).

|  |  |
|--|--|
| Solución NaOH-SDS (preparar al momento de usar): NaOH 0,2 N y SDS 1%   | Solución TEG (para 100mL):<br>2,5 mL TrisHCl pH 8 25 mM<br>2 mL EDTA pH 8 10 mM<br>9 g Glucosa |
| Solución III: Acetato potásico 3 M pH 4,8 (para 100mL)<br>Marcar 60 mL en una botella<br>Pesar 29,5 g de acetato de potasio<br>Añadir agua destilada estéril hasta la marca<br>Añadir 11,5 mL de ácido acético glacial<br>Añadir 28,5 mL de agua destilada estéril |  |

### II.2.5. Construcción del plásmido integrativo pNG1

El fragmento P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849 se obtuvo en tres pasos:

1. A partir del genoma de la cepa silvestre de *S. coelicolor*, se amplificó la región promotora de SCO4848 (P<sub>SCO4848</sub>) (423 pb) utilizando los cebadores PSCO4848F/ PSCO4848R, estos incluyen sitios de restricción *Hind*III y *Nde*I en sus extremos 5' y 3', respectivamente.

PSCO4848F 5' GGAAGCTTGCGAACAGCATCTTCAGGG 3'

PSCO4848R 5' AACATATGGGTTTCAGTATCGCCGCAC 3'

La banda del amplicón se cortó de un gel de agarosa (0,8%) y se purificó el ADN a partir de la misma con el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel®). Este ADN se clonó en pCR™-Blunt II-TOPO® (pTOPO-P<sub>SCO4848</sub>). Para hacer este tipo de clonación, en todos los casos se preparó la reacción: 1 µL de pCR™-Blunt II-TOPO®, 1 µL de *Salt Solution* (incluida con este

vector de clonación), la cantidad de ADN requerida en función de la concentración (no más de 4  $\mu$ L) y, en caso de ser necesario, se añadió agua hasta completar un volumen final de 6  $\mu$ L. Con esta reacción se transformaron células competentes químicas de *E. coli* TOP10, siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.2.4. Se hicieron 18 *minipreps* siguiendo el protocolo detallado al final de este apartado, y con uno de los clones positivos se extrajo el ADN del plásmido mediante el protocolo de *maxiprep*. El ADN clonado se secuenció por el método de Sanger, confirmando que no había mutaciones/artefactos. Este ADN plasmídico se conservó a -20 °C para su uso posterior.

2. En el segundo paso para obtener  $P_{SCO4848}+SCO4849$ , se amplificó la ORF del gen *SCO4849* (1422 pb) con los cebadores SCO4849F/SCO4849R, que se muestran a continuación e incluyen los sitios de restricción *Nde*I y *Nsi*I (subrayados) en los extremos 5' y 3', respectivamente.

SCO4849F 5' GGCCATATGGCGACGAGGACGTCACGGA 3'

SCO4849R 5' AATGCATGGGGGATGACGAAGGTGATG 3'

Se clonó en pCR™-Blunt II-TOPO®, se hizo transformación química en *E. coli* TOP10 y con 24 colonias aisladas de la transformación se hicieron *minipreps*. Se seleccionaron los clones positivos en los que el extremo 5' del gen *SCO4849* (con sitio de restricción *Nde*I) estuviera orientado hacia el lado *Hind*III del vector pCR™-Blunt II-TOPO® (pTOPO-*SCO4849*). El ADN clonado se secuenció por el método de Sanger, confirmando que no había mutaciones/artefactos.

3. En el tercer paso para conseguir el fragmento P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849, se liberó P<sub>SCO4848</sub> a partir de pTOPO-P<sub>SCO4848</sub> utilizando *Hind*III y *Nde*I y se clonó en pTOPO-SCO4849 digerido con las mismas enzimas. Se preparó una reacción de ligación con proporción 4:1, 200 ng de inserto para 50 ng de vector, añadiendo 1 µL de ligasa de ADN (T4 DNA ligase, Invitrogen) y en un volumen final de 10 µL. Esta ligación se introdujo por transformación química en *E. coli* TOP10, se hicieron 18 *minipreps* y de uno de los clones positivos se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico llevando a cabo el protocolo de *maxiprep*. De esta forma se obtuvo pTOPO-P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849.

El fragmento P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849 (1845 pb) se liberó a partir de pTOPO-P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849 por digestión con *Hind*III y *Nsi*I, y fue religado en pMS82 (Gregory *et al.* 2003) digerido con las mismas enzimas, generando pNG1. El plásmido se secuenció por el método de Sanger.

Se intentó obtener un derivado de pMS82 que incluyera P<sub>SCO4848</sub>+SCO4848+SCO4849, clonando el gen *SCO4848* sintetizado en el plásmido pNG1, ambos digeridos con *Nde*I, pero la construcción fue inestable.

### Protocolo de *miniprep* (basado en protocolo de Holmes & Quigley (1981))

1. Inocular colonias aisladas en 2-3 mL de medio LB + glucosa o 2xTY suplementado con el antibiótico de selección apropiado.
2. Incubar durante 8-20 horas a 37 °C y con agitación de 250 rpm.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 min para precipitar las células. Retirar el sobrenadante y eliminar restos sobre papel secante.

4. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de STET y 8  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg/mL). Agitar durante 30 segundos en vórtex.
5. Sumergir en agua hirviendo durante 40 segundos.
6. Centrifugar inmediatamente por 10 minutos a 14.000 rpm. Eliminar el *pellet* viscoso con un palillo estéril.
7. Añadir 20  $\mu\text{L}$  (1/10 volúmenes) de acetato sódico 3M y 120  $\mu\text{L}$  (0,6 volúmenes) de isopropanol. Mezclar por inversión.
8. Dejar precipitar 10 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante. Dejar secar durante 10 minutos.
10. Cuidar que esté seco y resuspender en 20  $\mu\text{L}$  de TE o agua destilada estéril.

STET (concentraciones finales):

Sacarosa 8%, TrisHCl 10 mM, EDTA 50 mM pH 8 y Tritón X100 0,5%

### II.2.6. Construcción del plásmido integrativo pNG2

El plásmido pNG1 se digirió con la enzima *NdeI*, y los extremos de una sola hebra se digirieron con la nucleasa S1 (*S1 Nuclease*, Thermo Scientific®). El tratamiento con esta nucleasa se llevó a cabo en tres pasos. Primero, se preparó la mezcla de reacción (1  $\mu\text{g}$  de ADN del plásmido pNG1 digerido con *NdeI*, 6  $\mu\text{L}$  5X *Reaction Buffer for S1 Nuclease*, 0,5  $\mu\text{L}$  *S1 Nuclease* y agua libre de nucleasas) hasta completar 30  $\mu\text{L}$  de volumen final. Segundo, la reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Y tercero, se detuvo la reacción añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5M y calentando a 70 °C durante 10 min. Tras este tratamiento, se religó el plásmido utilizando una ligasa de ADN (*T4 DNA ligase*, Invitrogen®) para generar el plásmido pNG1' sin el sitio de

restricción *NdeI*. El fragmento sintetizado *P<sub>ermE</sub>\*+RBS+MCS+fd-ter* se digirió con *EcoRV-XbaI* y se clonó en pNG1' digerido con *EcoRV-SpeI* (*XbaI* y *SpeI* son enzimas compatibles). Para la ligación, se calcularon los volúmenes de inserto (*P<sub>ermE</sub>\*+RBS+MCS+fd-ter*) y de vector (pNG1') necesarios para tener 200 ng del primero y 50 ng del segundo, en una ligación de volumen final 20 µL, añadiendo 1 µL de ligasa de ADN (T4 *DNA ligase*, Invitrogen) y completando con agua hasta el volumen final antes indicado. Todas las ligaciones que se hicieron en este trabajo utilizando la ligasa T4 *DNA ligase* mantuvieron la proporción 4:1 de inserto a vector, y se prepararon en volumen final de 10 µL ó 20 µL. Con la ligación antes mencionada, se transformaron células de *E. coli* TOP10. Se hicieron *minipreps* de 24 colonias y se seleccionó un clon positivo para aislar su ADN plasmídico (*maxiprep*) y conservarlo a -20 °C. De esta forma, se generó el plásmido pNG2.

### II.2.7. Construcción del plásmido integrativo pNG3

El gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina se amplificó a partir del plásmido pBR322 (Fermentas®) utilizando los cebadores BlaF y BlaR. Estos cebadores incluyen en sus secuencias un sitio de corte *AvrII* y *HindIII* (subrayados), respectivamente.

BlaF 5' AAACCTAGGAAATATGTATCCGCTCATG 3'

BlaR 5' GGGAAGCTTAGGGATTTTGGTCATGAG 3'

Para la amplificación por PCR se utilizó la polimerasa de ADN *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific®), y como ADN molde el plásmido pBR322. El programa de PCR se ajustó de la siguiente forma: desnaturalización a 98 °C por 30 s; 30 ciclos de 98 °C

por 30s, gradiente de temperatura de 45 a 52 °C por 30 s, 72 °C durante 1,2 min; extensión final a 72 °C por 10 min. El producto amplificado (1039 pb) se purificó a partir de un gel de agarosa (0,8%) con el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel®). El gen *bla* se clonó en pCR™-BluntII-TOPO®, se hizo transformación química en *E. coli* TOP10 y, de la forma descrita para otras construcciones, se obtuvo ADN plasmídico por *maxiprep* de un clon positivo. Se comprobó la ausencia de mutaciones mediante secuenciación por el método de Sanger, y a partir de este plásmido se liberó el gen *bla* mediante digestión con *HindIII*/*AvrII*. Una vez liberado, se clonó en pNG1 digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pNG3.

#### **II.2.8. Construcción del plásmido integrativo pNG4**

El gen *bla* (1039 pb) se liberó a partir del plásmido pCR™-Blunt II-TOPO, en el que lo habíamos clonado (véase apartado anterior), con *HindIII*/*AvrII* y se clonó en pNG2 (8762 pb) digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pNG4.

#### **II.2.9. Análisis fenotípico de los plásmidos pNG1-4 integrados en el cromosoma de *S. coelicolor***

##### **a) Cuantificación de la germinación de las esporas**

La germinación fue cuantificada siguiendo el protocolo diseñado previamente en nuestro grupo de investigación (de Jong *et al.* 2009). De manera resumida, la germinación se cuantificó en medio sólido con discos de celofán. Se cortaron trozos de estos discos, se tiñeron con

SYTO9/yoduro de propidio y se observaron al microscopio confocal como se indica en la sección 1.3. De cada cepa se analizaron tres réplicas biológicas. El porcentaje de germinación se obtuvo contando un número de esporas  $\geq 100$  en cada réplica. El tiempo de cultivo fue de 4 a 12 h, en función de la especie de *Streptomyces*. Se consideraron como germinadas aquellas esporas cuyo tubo germinativo era visible en el microscopio.

### **b) Cuantificación de la producción de antibióticos**

La producción de actinorrodina y undecilprodigiosina se cuantificó espectrofotométricamente, de acuerdo al protocolo establecido por otros autores (Tsao *et al.* 1985; Bystrykh *et al.* 1996b). Para medir la cantidad total de actinorrodina (intracelular y extracelular), las células se rompieron en su medio de cultivo añadiendo KOH 0,1 N e hirviendo durante 10 minutos. Los restos celulares se descartaron por centrifugación. La actinorrodina se cuantificó espectrofotométricamente con un espectrofotómetro UV/visible (Shimadzu®, Modelo UV-1240), aplicando la ecuación de Lambert-Beer para estimar la concentración ( $\epsilon_{640} = 25.320$ ) (Kieser *et al.* 2000). La undecilprodigiosina se midió después de secar al vacío el cultivo (incluyendo el micelio y el medio de cultivo) seguido por la extracción con metanol, acidificación con HCl (a 0,5 M) y ensayo espectrofotométrico a 530 nm, de nuevo utilizando la relación de Lambert-Beer para estimar la concentración ( $\epsilon_{530} = 100.500$ ) (Kieser *et al.* 2000). En todos los casos se hicieron diluciones para asegurarnos de que las medidas de D.O. se hacían dentro de la región lineal de la relación Lambert-Beer.

### **c) Curvas de crecimiento, cuantificación de proteína**

Se recogieron muestras de cultivos líquidos (0,5 mL incluyendo el medio de cultivo y el micelio) en diferentes etapas del desarrollo de *Streptomyces* y se guardaron a -20 °C hasta que fueron analizadas. Se añadió 0,5 mL de NaOH 1 M a cada muestra (concentración final de NaOH = 0,5 M) y se llevó a ebullición por 10 min. Los restos celulares se removieron por centrifugación, para obtener un extracto con la proteína total (intracelular y extracelular). La proteína fue cuantificada usando el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando albúmina de suero bovino (Sigma®) como estándar.

## **II.3. Estudio del mutante *SCO2730::Tn5062***

### **II.3.1. Análisis fenotípico del mutante *SCO2730::Tn5062***

#### **a) Condiciones de cultivo**

Se hicieron cultivos sólidos y líquidos utilizando los medios y condiciones de cultivo descritas en el apartado II.2.1. Además, se comparó el crecimiento de la cepa mutante con respecto al de la cepa Wt, en medio sólido suplementado con cobre (CuSO<sub>4</sub>) y con un quelante de cobre (ácido batocuproinedisulfónico, BCDA). Se utilizó medio sólido SFM suplementado con 40 y 80 µM de CuSO<sub>4</sub>, y medio sólido SFM suplementado con 1 y 2 mM de BCDA.

**c) Curvas de crecimiento, germinación, y seguimiento del ciclo de desarrollo al microscopio láser confocal**

Se hicieron curvas de crecimiento cuantificando la cantidad de proteína total por mL (véase apartado II.2.9).

La germinación se cuantificó siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.9.

Se analizó la formación de MI, MII, esporulación y muerte celular programada utilizando el microscopio láser confocal, siguiendo la metodología descrita en el apartado II.1.3.

**d) Cuantificación de la producción de antibióticos**

La actinorrodina y la undecilprodigiosina se midieron siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.9.

En el caso del mutante *SCO2730::Tn5062* también se midió la producción de CDA (*calcium dependent antibiotic*). Para ello se adaptó la metodología descrita por Kieser *et al.* (2000). Se utilizaron placas de Petri (13,5 cm de diámetro) con 45,5 mL de medio ONA (Tabla 7) con agar al 1,5%. De cada cepa, se sembraron 5  $\mu$ L de una suspensión de esporas frescas con una concentración de  $10^5$  esporas/mL. Después de una incubación de 2 días a 30 °C, cada placa se cubrió con 9,1 mL de medio ONA “suave” (agar al 0,75%) que contenía: la cepa indicadora *Bacillus subtilis* a una D.O. final de 0,25 y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  a una concentración final de 60 mM. La placa control se cubrió también con 9,1 mL de medio ONA “suave” incluyendo la cepa indicadora, pero sin  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Tras incubar estos cultivos a 30 °C toda la noche, se observaron los halos de

inhibición que produjeron algunas cepas de *Streptomyces* contra *B. subtilis*. Estos halos indican la producción de CDA.

### **II.3.2. Análisis bioinformático de la conservación de los genes *SCO2730 (copZ)* y *SCO2731 (copA)* en el género *Streptomyces***

Los ortólogos de los genes *SCO2730* y *SCO2731* se obtuvieron de la base de datos StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>).

Los ortólogos del gen *SCO2730* que se seleccionaron fueron: *SLI\_3079* (*S. lividans*), *SAV\_5332* (*S. avermitilis*), *SVEN\_2533* (*S. venezuelae*), *SGR\_4828* (*S. griseus*), y *SCLAV\_1906* (*S. clavuligerus*).

Los ortólogos del gen *SCO2731* seleccionados fueron: *SLI\_3080* (*S. lividans*), *SAV\_5331* (*S. avermitilis*), *SVEN\_2534* (*S. venezuelae*), y *SGR\_4827* (*S. griseus*). El ortólogo del gen *SCO2731* de *S. clavuligerus* no está anotado en la base de datos StrepDB, pero está localizado aguas abajo del gen *SCLAV\_1906*.

La similitud de las secuencias de aminoácidos se determinó utilizando el software *Lalign* ([https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)), seleccionando el parámetro *global alignment without end-gap penalty*.

### **II.3.3. Análisis de la transcripción de los genes *SCO2728-SCO2731***

Las muestras de ARN total se extrajeron de cultivos de 48 h de las cepas Wt y mutante *SCO2730::Tn5062* de *S. coelicolor*. Estos cultivos se hicieron en 20 mL de R5A sin sacarosa, utilizando matraces de 100 mL sin indentaciones. La extracción de ARN total y la reacción de RT-

PCR se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.3. En los controles positivos se usó ADN cromosómico de la cepa Wt como molde. Los controles negativos se hicieron con ARN de las cepas Wt y mutante *SCO2730::Tn5062* utilizando la polimerasa de ADN que incluye el sistema de RT-PCR.

**a) Análisis de la transcripción de los genes *SCO2728* y *SCO2729***

Para comprobar la transcripción de los genes *SCO2728* y *SCO2729* a partir de un mismo promotor, se utilizaron los cebadores RT2829F/RT2829R con los que se amplifica un producto de 420 pb.

RT2829F 5' GCGCAGGGAGGTGCGACTAG 3'

RT2829R 5' GCGGACCACCTCGGGGTC 3'

La transcripción inversa fue realizada a 55 °C durante 30 min seguida por una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min. A continuación, se hizo un *touchdown* en 8 ciclos, durante los cuales la temperatura de hibridación se redujo 1 °C en cada ciclo: 94 °C 15 s, 65 °C (-1 °C/ciclo) 30 s, 68 °C 35 s. En los siguientes 35 ciclos (94 °C 15s, 55 °C 30s, y 68 °C 35 s), la temperatura de hibridación fue 55 °C y a continuación el paso de extensión final a 68 °C durante 5 min.

**b) Análisis de la transcripción de los genes *SCO2729* y *SCO2730***

Para comprobar la transcripción de los genes *SCO2729* y *SCO2730* a partir de un mismo promotor se utilizaron los cebadores RT2930F/RT2930R, con los que se amplifica un producto de 480 pb.

RT2930F 5' CGAGGCGACGCGGCTCATC 3'

RT2930R 5' ACGGCCTGTACGGAGGCGA 3'

La transcripción inversa fue realizada a 55 °C durante 30 min seguida por una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min. A continuación, se hizo un *touchdown* en 8 ciclos, durante los cuales la temperatura de hibridación se redujo 1 °C en cada ciclo: 94 °C 15 s, 65 °C (-1 °C/ciclo) 30 s, 68 °C 35 s. En los siguientes 35 ciclos el perfil térmico fue: 94 °C 15s, 58 °C 30 s, 68 °C 35 s, seguidos por un paso de extensión final a 68 °C durante 5 min.

**c) Análisis de la transcripción de los genes *SCO2730* y *SCO2731***

Se hicieron dos RT-PCRs para analizar la transcripción acoplada de los genes *SCO2730* y *SCO2731*. Se utilizaron los cebadores RT3031F/RT3031R y RT3031F1/RT3031R1 para obtener amplicones de 594 pb y 626 pb, respectivamente.

RT3031F 5' GCCCGGCGCACCCATCC 3'

RT3031R 5' TGCCGAGCGAGACCAGCGTG 3'

RT3031F1 5' TCCGTCACCACCGTCTAC 3'

RT3031R1 5' GAGGACGGAGACCAGCAG 3'

La transcripción inversa fue realizada a 55 °C durante 30 min seguida por una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min. A continuación, se hizo un *touchdown* en 8 ciclos, durante los cuales la temperatura de hibridación se redujo 1 °C en cada ciclo: 94 °C 15 s, 65 °C (-1 °C/ciclo) 30 s, 68 °C 35 s. Los siguientes 35 ciclos fueron de: 94 °C

15 s, 58 °C 30 s, 68 °C 35 s. Por último, se hizo un paso de extensión final a 68 °C durante 5 min.

### II.3.4. Complementación del mutante *SCO2730::Tn5062*

Actualmente se sabe que existen tres promotores que afectan la transcripción del gen *SCO2730* (Fig. 13). Los promotores 1 y 2, P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, ubicados corriente arriba de los genes *SCO2728* y *SCO2729*, respectivamente, ambos identificados en el trabajo de Jeong *et al.* (2016). Y el promotor 3 (P<sub>3</sub>) identificado por Dwarakanath *et al.* (2012), y validado después por Jeong *et al.* (2016), que está localizado corriente arriba del gen *SCO2730*, y a su vez modulado por el represor transcripcional CsoR. Además, tal como se detalla en el apartado II.3.2 de resultados, hemos descubierto la existencia de un cuarto promotor dentro de la ORF del gen *SCO2730*.



**Figura 13. Promotores, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>, que regulan la expresión del gen *SCO2730*.** El promotor P<sub>3</sub> a su vez es modulado por el represor CsoR. Basado en datos de Dwarakanath *et al.* (2012) y Jeong *et al.* (2016).

Diseñamos construcciones de complementación incluyendo distintas combinaciones de los promotores P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> (P<sub>4</sub> está incluido en el gen *SCO2730*) y los genes *SCO2730* y *SCO2731*, utilizando el plásmido pNG3 en todos los casos: P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731*,

P<sub>1</sub>SCO2730/2731, P<sub>2</sub>SCO2730/2731, P<sub>3</sub>SCO2730/2731, P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730, P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2731.

**a) Genes sintetizados**

Se subcontrató a *GeneCust Europe* (<http://www.genecust.com/en/index.php>) la síntesis de los siguientes genes (clonados en pUC57), que se usaron como material de partida para hacer las construcciones de complementación:

1. pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*XhoI*-*SpeI*: gen *SCO2730* con las regiones génicas que incluyen los promotores P<sub>1</sub> y P<sub>3</sub> (782 pb). Se añadieron los sitios *EcoRV* y *XhoI-SpeI* en los extremos 5' y 3', respectivamente (Anexo I).
2. pUC57-*XhoI*-SCO2731-*SpeI*: Gen *SCO2731* (2330 pb) flaqueado por los sitios de corte *XhoI* y *SpeI* (Anexo II).
3. pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI*: regiones génicas que incluyen los promotores P<sub>1</sub> y P<sub>3</sub> (466 pb), con los sitios de corte *EcoRV* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente (Anexo III).
4. pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*XhoI*: gen *SCO2730* con las regiones génicas incluyendo los tres promotores (P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730: 919 pb) (Anexo IV).
5. pUC57-*EcoRV*-P<sub>2</sub>SCO2730-*XhoI*: gen *SCO2730* con la región génica incluyendo el promotor P<sub>2</sub> (P<sub>2</sub>SCO2730: 485 pb) (Anexo V).

Las secuencias se recibieron integradas en el plásmido pUC57 (resistencia a ampicilina), junto con los ficheros de su secuenciación por

el método de Sanger. Las secuencias se validaron, y los plásmidos se procesaron siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.4.

**b) Construcción de pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730**

El vector pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*XhoI*-*SpeI* se digirió con las enzimas *EcoRV/SpeI* para liberar el fragmento *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*XhoI*-*SpeI*. Este fragmento se religó en el plásmido pNG3, digerido previamente con *EcoRV/SpeI*, utilizando una ligasa de ADN (*T4 DNA ligase*, Invitrogen®).

**c) Construcción de pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731**

La construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730 se digirió con *XhoI/SpeI* para clonar entre estos dos sitios el inserto *XhoI*-SCO2731-*SpeI*, el cual se obtuvo al digerir con las mismas enzimas la construcción pUC57-*XhoI*-SCO2731-*SpeI*.

**d) Construcción de pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2731**

La construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731 se digirió con *EcoRV/XhoI* para clonar entre estos dos sitios el inserto *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI*, el cual se obtuvo al digerir con las mismas enzimas la construcción pUC57- *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI*.

**e) Construcción de pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731**

La construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731 se digirió con las enzimas *EcoRV/XhoI* para eliminar el fragmento *EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-XhoI* y conservar el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI*. Al mismo tiempo, se digirió con *EcoRV/XhoI* la construcción pUC57-*EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-XhoI* para religar el inserto *EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>P<sub>2</sub>SCO2730-XhoI* en pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI*, obteniendo pNG3-*EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-XhoI-SCO2731-SpeI*.

**f) Construcción de pNG3-P<sub>1</sub>SCO2730/2731**

Se hicieron PCRs para amplificar los fragmentos P<sub>1</sub> y SCO2730, utilizando como molde la construcción pUC57P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>P<sub>2</sub>SCO2730 en ambos casos. De la pareja de cebadores P1F/P1R (amplicón 274 pb) el primer P1F se diseñó con un sitio de corte *EcoRV* (subrayado en la secuencia), y de la pareja 2730F/2730R (amplicón 306 pb) el primer 2730R tiene un sitio *XhoI* (subrayado en la secuencia).

P1F 5' AAGATATCCTCGCTCCTGCCAGGGCG 3'

P1R 5' AGGCGTACGCCGTCGTTCA 3'

2730F 5' GTGAGTGGTCCAGGACCGGA 3'

2730R 5' GGCTCGAGCAGACCCGGCCGACGAGC 3'

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific®). El programa de PCR utilizado para P<sub>1</sub> y SCO2730 fue: desnaturalización a 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 68 °C (-1 °C/ciclo) 30 s, 72 °C 10 s; un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. Las bandas de los amplicones P<sub>1</sub> y SCO2730 se cortaron

de un gel de agarosa (0,8%) y se purificó el ADN a partir de las mismas con el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel®). Este ADN se cuantificó y se utilizaron 15 ng de cada fragmento como molde para la siguiente PCR, donde los cebadores usados fueron P1F y 2730R. Para la PCR se siguió el protocolo de 2 pasos de la polimerasa *Phusion High-Fidelity*, ajustando el programa de la siguiente forma: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 10 s, 72 °C 18 s; extensión final a 72 °C durante 10 min. Se purificó el ADN del amplicón *EcoRV-P<sub>1</sub>SCO2730-XhoI* y se clonó en el plásmido pCR™-Blunt II-TOPO®. El ADN plasmídico de un clon positivo (pTOPO-P<sub>1</sub>SCO2730) se aisló mediante el protocolo de *maxiprep* descrito en el apartado II.2.4, y se secuenció por el método de Sanger con los cebadores universales M13F y M13R.

M13F 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

M13R 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

La secuencia del inserto se confirmó con los programas adecuados (BioEdit, Vector NTI, BLAST de NCBI) y el plásmido se digirió con las enzimas *EcoRV/XhoI* y se obtuvo *EcoRV-P<sub>1</sub>SCO2730-XhoI*. Al mismo tiempo, se digirió pNG3.P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731 con las enzimas *EcoRV/XhoI* para eliminar el fragmento *EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-XhoI* y conservar el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI*. El inserto *EcoRV-P<sub>1</sub>SCO2730-XhoI* se ligó en pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI* digerido con las mismas enzimas.

#### **g) Construcción pNG3-P<sub>2</sub>SCO2730/2731**

La construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731 se digirió con las enzimas *EcoRV/XhoI* para eliminar el fragmento *EcoRV-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*

*XhoI* y conservar el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI*. El vector pUC57-*EcoRV-P<sub>2</sub>SCO2730-XhoI* se digirió con las enzimas *EcoRV/XhoI* para liberar el fragmento *EcoRV-P<sub>2</sub>SCO2730-XhoI*. Este fragmento se religó en el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI-SCO2731-SpeI*, utilizando una ligasa de ADN (*T4 DNA ligase*, Invitrogen®), digerido con las mismas enzimas.

#### h) Construcción pNG3-P<sub>3</sub>SCO2730/2731

Se amplificó por PCR la región que abarca desde el promotor P<sub>3</sub> hasta el fin de la ORF de *SCO2731* (3360 pb en total), utilizando los cebadores P3.2731F (incluye sitio de corte *EcoRV*) y P3.2731R (incluye sitio de corte *SpeI*), utilizando como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor*.

P3.2731F 5' GGGATATCAGGTCGTCCTGTACGAGTG 3'

P3.2731R 5' AAACTAGTCTCGTGCTGTACCTGGTGC 3'

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific®). Para la PCR se ajustó el programa de la siguiente forma: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 57-62 °C 30 s, 72 °C 3,4 min.; extensión final 72 °C 10 min. Se cortó la banda del amplicón obtenido, 3360 pb, de un gel de agarosa (0,8%) y se purificó con el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel®). Este ADN purificado se clonó en el plásmido pCR™-Blunt II-TOPO® y a partir de un clon positivo (pTOPO-P<sub>3</sub>SCO2730/2731) se aisló el ADN plasmídico mediante *maxiprep* (protocolo descrito en el apartado II.2.4). La construcción pTOPO-P<sub>3</sub>SCO2730/2731 se secuenció por el método de Sanger con los

cebadores universales M13F y M13R. Las secuencias obtenidas se revisaron con los programas pertinentes (BioEdit, Vector NTI, BLAST del NCBI). Los plásmidos pTOPO-P<sub>3</sub>SCO2730/2731 y pNG3 se digirieron con *EcoRV* y *SpeI*. Con el inserto *EcoRV*-P<sub>3</sub>SCO2730/2731-*SpeI* y el plásmido *EcoRV*-pNG3-*SpeI* se hizo la ligación, utilizando una ligasa de ADN (T4 DNA ligase, Invitrogen®).

### i) Construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730

La construcción pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730.SCO2731 se digirió con las enzimas *XhoI*/*SpeI* para eliminar *XhoI*-SCO2731-*SpeI*. Los extremos cohesivos de los cortes *XhoI* y *SpeI* se digirieron con una nucleasa de ADN de una sola hebra (S1 Nuclease, Thermo Scientific®), siguiendo el protocolo indicado en el apartado II.2.6, para así religar el plásmido y obtener la construcción pNG3.P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730.

### j) Construcción pNG3.P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2731

Se amplificó por PCR el conjunto de regiones promotoras P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>, con los cebadores P123F (incluye sitio de corte *EcoRV*) y P123R (incluye sitio de corte *XhoI*), utilizando como ADN molde el plásmido pNG3.P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SCO2730.SCO2731.

P123F 5' GGGGGATATCCATTAGGCACCCCAGGCTTT 3'

P123R 5' AACTCGAGTCTGGGCGGTCATGTCGTTA 3'

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific®). El amplicón resultante (793 pb) se

purificó y se clonó el plásmido pCR™-Blunt II-TOPO®. Se aisló el ADN plasmídico de un clon positivo (pTOPO-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>), realizando el protocolo descrito en el apartado II.2.4, y se envió a secuenciar por el método de Sanger con los cebadores universales M13F y M13R. Una vez confirmada la secuencia del inserto, el plásmido se digirió con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*, obteniendo *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI*. En paralelo, la construcción pNG3.P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730/2731 se digirió con las enzimas *EcoRV/XhoI* para eliminar el fragmento *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SCO2730-*XhoI* y conservar el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI*-SCO2731-*SpeI*. El inserto *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI* se ligó en el plásmido pNG3-*EcoRV-XhoI*-SCO2731-*SpeI* digerido con *EcoRV* y *XhoI*.

### II.3.5. Determinación de la concentración de cobre intracelular

#### a) Preparación de muestras para la cuantificación de cobre intracelular en el micelio

Matraces lisos de 250 mL conteniendo 50 mL de medio R5A sin sacarosa se inocularon con esporas frescas para obtener una concentración de  $1.10^7$  esporas/mL. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación (200 r.p.m.) durante el tiempo necesario para obtener la muestra en la fase de crecimiento deseada (germinación, micelio, esporulación). Se utilizó una centrífuga SORVALL ST 16R (Thermo Scientific®) para centrifugar el volumen total de cada cultivo y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 30 mL de tampón de lavado (10 mM TrisHCl pH 7,5, 1 mM EDTA) a temperatura ambiente. Se centrifugó y se repitió el paso anterior, hasta hacer 4 lavados. Se centrifugó a 4 °C con 10 mL de tampón de ruptura (10 mM TrisHCl pH

7,5); a partir de este paso las muestras se mantuvieron en hielo. Se resuspendió el *pellet* en tampón de ruptura (en una cantidad variable entre 0,5 y 1 mL, en función de la cantidad de *pellet*). Se rompieron las células en la *fastprep* (FastPrep®-24, MP™), dando 6 pulsos de 20 s a 6,5 de velocidad y dejando las muestras 1 min en hielo entre un pulso y otro. Se centrifugó durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se guardaron dos alícuotas de cada muestra a -20 °C, una de 50-100 µL para hacer la cuantificación de proteína por el método de Bradford, y la otra con el resto del volumen para cuantificar el cobre intracelular total. Las muestras se prepararon por triplicado, procesando tres matraces/réplicas biológicas independientes.

### **b) Preparación de muestras para la medida de cobre en esporas**

Se hizo una suspensión de esporas en agua destilada a partir de cultivos sólidos esporulados en medio SFM (Tabla 7). Se filtraron 2,5 mL de la suspensión de esporas utilizando puntas de pipeta p5000 y algodón hirofóbico, para eliminar restos de micelio. Se centrifugó (microcentrífuga MICRO STAR 17, VWR®) 1mL de la suspensión filtrada a 12.000 xg durante 10 min y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de tampón de lavado (10 mM TrisHCl pH 7,5 + 1 mM EDTA). Se hicieron 4 lavados y un último lavado con 1mL de agua destilada estéril en lugar de tampón de lavado. Con el *pellet* obtenido se llevaron a cabo distintos pasos en función de su uso posterior. En todos los casos, se prepararon tres muestras/réplicas biológicas independientes a partir de tres placas esporuladas.

**b.1) Muestras de esporas para cuantificación de cobre total**

El *pellet* obtenido del lavado se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se determinó la concentración de esporas en cada muestra, buscando que estuviera en el orden o por encima de  $10^5$  esporas/mL.

**b.2) Muestras para cuantificación de cobre en esporas individuales (*single cell*)**

Para los análisis de cobre intracelular en esporas individuales (*single cell*), el *pellet* obtenido del lavado con agua se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se pasó a un tubo de 1,5 mL tarado (la tara se hizo después de mantener el tubo 2 horas a 70 °C). Se centrifugó a 12.000  $xg$  por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* se dejó secar a 70 °C durante 6 horas, se pesó en una balanza de precisión y se determinó el peso seco de cada muestra restando el peso del tubo.

**c) Cuantificación de cobre intracelular total (en esporas y micelio) y el cobre en esporas individuales (*single cell*)**

La determinación del cobre citosólico se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la profesora María Montes (Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo). Todas las medidas se realizaron mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para la medida de cobre total en esporas, se hizo una digestión ácida de las muestras. Para ello se resuspendieron las muestras (de las cuales se había estimado el peso seco, véase apartado II.3.5) en HNO<sub>3</sub> concentrado (65% grado Suprapur<sup>®</sup>, Merck Millipore) y se incubaron a 70 °C durante 1 hora. Posteriormente se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de grado HPLC al 30% (Sigma<sup>®</sup>) y se incubó durante otras 3 horas a la misma temperatura. La solución resultante se diluyó con agua y se midió el contenido de cobre por ICP-MS. Los datos se normalizaron con el peso seco de las esporas. En el caso de las esporas, no se normalizó la muestra por proteína, ya que la extracción proteica mediante la FastPrep<sup>®</sup>-24, MP<sup>™</sup> (descrita en el apartado II.3.5 para el micelio), no permitió romper eficientemente las esporas (datos no mostrados).

En el caso de las muestras de micelio, los extractos celulares obtenidos mediante la FastPrep<sup>®</sup>-24, MP<sup>™</sup> (véase apartado II.3.5), se diluyeron con metanol de grado HPLC al 10% (Sigma<sup>®</sup>) y se midió el contenido de cobre por ICP-MS. Los valores obtenidos de estas medidas se normalizaron con la concentración de proteína de las muestras, previamente cuantificada.

Las medidas de ICP-MS de los extractos de esporas y de micelio, se hicieron en un sistema ICP-MS de triple cuadrupolo iCAP<sup>™</sup>-TQ (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) ajustado al modo *quad* y con helio como gas de colisión. Para los análisis de numerosas muestras, se añadió al ICP un nebulizador de tipo “microniebla” y una cámara de pulverización ciclónica, ambos de ESI *Elemental Service & Instruments* GmbH (Alemania), y también un equipo para procesar las muestras de forma automática ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies<sup>®</sup>).

Para las medidas de cobre en esporas individuales (*single cell*), el equipo se ajustó con un nebulizador de tipo “microflujo” (*EnyaMist nebulizer* de Burgener Research Inc.) y con una cámara de pulverización de autodesarrollo. Los detalles de esta preparación y las condiciones empleadas pueden consultarse en Rodríguez *et al.* (2017). Las suspensiones de esporas a una concentración de  $1.10^5$  esporas/mL y resuspendidas en agua destilada estéril, se bombearon a una velocidad de flujo baja,  $10\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando una bomba de jeringa SP101i ajustada con una jeringa Hamilton de 1 mL. Los datos se registraron en el modo de análisis *time-resolved* ajustando el tiempo de permanencia a 1 ms y el tiempo de adquisición de cada ejecución fue generalmente de 3 min. Las calibraciones externas se realizaron con un estándar de cobre con calidad suficiente para su uso en ICP-MS (1000 mg/mL, CertiPur® de Merck).

### **II.3.6. Análisis de expresión del gen *SCO2730* y de genes relacionados con su función**

Se diseñaron experimentos de PCR cuantitativa (qPCR), en los que se utilizaron los cebadores presentados en la Tabla 10, para estudiar la expresión de los genes *SCO1045*, *SCO1046*, *SCO2730*, *SCO2731*, y *SCO4136*, en las cepas mutante *SCO2730::Tn5062* y Wt, así como también de la cepa Wt en distintas condiciones (cultivos suplementados con 40 y  $80\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ).

### **a) Cultivos y extracción de ARN**

Se analizó la fase de germinación (10 horas) en cultivos líquidos (R5A sin sacarosa) de las esporas de la cepa mutante *SCO2730::Tn5062* y la cepa Wt en medio R5A líquido sin sacarosa suplementado con 40 y 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Los cultivos se hicieron en matraces lisos de 250 mL conteniendo 50 mL de medio, que se inocularon con esporas frescas para obtener una concentración de  $1 \cdot 10^7$  esporas/mL y se incubaron a 30 °C con agitación (200 r.p.m.) durante 10 horas. Se procesaron dos réplicas biológicas de cada cepa. El volumen total de cada cultivo (50 mL) se centrifugó a 8.500 r.p.m. y 2 °C por 10 min, se eliminó completamente el medio de cultivo y las células se resuspendieron en 2 volúmenes de *RNAprotect™ Bacteria Reagent* (Qiagen), el tratamiento de esta suspensión se realizó como se describe en el apartado II.2.3. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su uso.

La extracción y purificación de ARN total se llevó a cabo como se indica en el apartado II.2.3.

### **b) Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa (RT-PCR)**

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ : 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT *Buffer*; 0,8  $\mu\text{L}$  de 25X dNTP *Mix* (100mM); 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT *Random Primers*; 1  $\mu\text{L}$  MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*; 1  $\mu\text{g}$  de ARN molde; y  $\text{H}_2\text{O}$  para PCR libre de DNasa-RNasa (Sigma®) hasta completar 20  $\mu\text{L}$ . El programa de PCR utilizado para la transcripción inversa fue: 25 °C 10 min, 37 °C 2

horas, 85 °C 5 min. El ADNc obtenido (reacciones de transcripción inversa) se guardó a -20 °C hasta que se utilizó para las PCRs cuantitativas.

**Tabla 10. Cebadores utilizados en los análisis de PCR cuantitativa (qPCR).**

| Cebador | Secuencia de 5' a 3' |
|---------|----------------------|
| q1045F  | GCATGAGCTGCGGTCCTACT |
| q1045R  | CCGGTGTCGTGTTGGACG   |
| q1046F  | ATGACCACCAGTACGACCAG |
| q1046R  | CTTCTCCGTCGCGTAGTTGA |
| q2730F  | CACACCCGACGAGGAGTAAC |
| q2730R  | TGGAGGCGACGGCCTGTA   |
| q2731F  | CGAAGTCGAGCTGCTCATC  |
| q2731R  | TCTCGGTCGCGTAGTTCAC  |
| q4136F  | GGATACCACAAGCAGAAGGC |
| q4136R  | AGCGCGAAGGACTGGAGG   |
| q4758F  | ATCACCGACCGGATGCCCTT |
| q4758R  | GCCGAGCCCCGCTTCTTC   |

**c) PCR cuantitativa (qPCR)**

Las qPCRs se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems®). La composición de las reacciones fue: 100 ng de ADNc, 10 µL de SYBR *Green* PCR *Master Mix* (Applied Biosystems®), 300 nM de *cebadores* y H<sub>2</sub>O para PCR libre de DNasa (Sigma®) hasta completar 20 µL de volumen final. Se analizaron dos

réplicas biológicas y a su vez de cada una de ellas se incluyeron tres réplicas metodológicas. En las reacciones control se emplearon agua y ARN como molde para verificar la ausencia de contaminación con ADN en el ARN original y la formación de dímeros de *cebadores*. El programa empleado fue el siguiente: un paso inicial a 50 °C durante 2 min; 95 °C 10 min; 40 ciclos de 95 °C 15 s, 60 °C 1min; y un perfil de disociación final (95 °C 15s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s) para confirmar la ausencia de dímeros de cebadores. Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001). Como control interno para cuantificar la expresión relativa de los genes estudiados se utilizó el gen *SCO4758* (cebadores q4758F y q4758R en Tabla 10) (Li *et al.* 2015). *SCO4758* se expresa constitutivamente en las condiciones empleadas en este trabajo (Yague *et al.* 2013b).

### II.3.7. RNAseq y análisis bioinformáticos

#### a) Cultivos y muestras analizadas

Se analizó la fase de germinación (10 horas) en cultivos líquidos (R5A sin sacarosa) de las esporas de la cepa *SCO2730::Tn5062*, las esporas de la cepa silvestre obtenidas en medio SFM (Wt) y las esporas de la cepa silvestre obtenidas en medio SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu). Los cultivos se hicieron en matraces lisos de 250 mL conteniendo 50 mL de medio R5A sin sacarosa. Se inocularon con esporas frescas para obtener una concentración de  $1.10^7$  esporas/mL y se incubaron a 30 °C con agitación (200 r.p.m.). Se procesaron dos réplicas biológicas de cada cepa. Con el volumen total de cada cultivo (50 mL) se siguió el mismo protocolo que se describe en el apartado

3.6.1. Con las muestras conservadas a -80 °C, después del tratamiento con *RNAprotect™ Bacteria Reagent* (Qiagen), se realizó la extracción de ARN como se indica en el apartado 2.3.

**b) *RNAseq***

La secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-Generation Sequencing*) se subcontrató a StabVida ([www.stabvida.com](http://www.stabvida.com)). El ARN se extrajo siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.1, a partir de muestras que fueron congeladas a -80 °C después de ser tratadas con *RNAprotect Cell Reagent* (Qiagen). Posterior a la confirmación de que las muestras de ARN total cumplían los requisitos de integridad (RIN  $\geq$  8) y cantidad (2 a 5  $\mu$ g) necesarios, se enviaron a StabVida (Caparica, Portugal). El ARN ribosomal se eliminó con el kit *Ribo-Zero rRNA Removal (Bacteria)* de Illumina®, y para la construcción de la genoteca de ADNc se utilizó el kit *TruSeq Stranded mRNA Library Preparation* (Illumina®). El ADN se secuenció en la plataforma Illumina HiSeq 2500 mediante secuenciación de lecturas acopladas (*paired-end sequencing*) de 100 pb (al menos 10 millones de lecturas por muestra). Los datos sin procesar están disponibles en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (acceso GSE111126). El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se llevó a cabo en el sistema operativo Linux utilizando el *software*: FastQC (Andrews 2010) para verificar la calidad de las secuencias, Cutadapt (Martin 2011) para eliminar secuencias que interfieren con el análisis, Bowtie2 para alinear las secuencias obtenidas con el genoma de *S. coelicolor*, y Cuffdiff (Trapnell *et al.* 2012) para los análisis de expresión diferencial. Las variaciones en abundancia de los transcritos con q-valor menor a 0,05 se consideraron significativas.

# RESULTADOS



### III.1. Mutantes por inserción en *S. coelicolor*

Este trabajo se comenzó desarrollando el objetivo de profundizar en la caracterización de las rutas biomoleculares que regulan los procesos de diferenciación y MCP en *Streptomyces*, incluyendo las fases pre-esporulantes (transición MI/MII) no consideradas en el ciclo de desarrollo tradicional. Se inició con la construcción de cepas mutantes en los genes: *SCO2263*, *SCO2730*, *SCO2805*, *SCO2908*, *SCO3134*, *SCO3367*, y *SCO6743*. Los fenotipos observados en estos mutantes, con respecto a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145, se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11. Fenotipos observados en cepas de *S. coelicolor* mutadas en genes de interés.**

| Gen mutado en <i>S. coelicolor</i> | Inserción      | Fenotipo   |
|------------------------------------|----------------|--|
| <i>SCO2263</i>                     | 1G2.2.G10      | Hifas tabicadas en tiempos tardíos (fase de MII)   |
| <i>SCO2730</i>                     | C46.2.D06      | Retraso en la germinación, retraso en el crecimiento y en la esporulación, adelanto y mayor producción de antibióticos |
| <i>SCO2805</i>                     | 2StC13.1.F09   | Adelanto en la germinación   |
| <i>SCO2908</i>                     | E19A-Rep.1.G12 | Algo de retraso en la germinación  |
| <i>SCO3134</i>                     | SCE66.2.F11    | Esporulación adelantada  |
| <i>SCO3367</i>                     | SCE94.2.E09    | Esporulación retrasada   |
| <i>SCO6743</i>                     | 5F2A.2.A08     | Esporulación adelantada  |

En función de la relevancia de los fenotipos observados, decidimos centrarnos en el estudio de la cepa mutada en el gen *SCO2730*. En el mutante *SCO2730::Tn5062* se observó un evidente retraso en la germinación, en el crecimiento y en la esporulación. Mientras que, la diferenciación fisiológica, y la producción de antibióticos están adelantadas en esta cepa. Además, la producción de antibióticos es mayor que en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. Estos fenotipos se detallarán más adelante.

### **III.2. Nuevos plásmidos integrativos basados en $\Phi$ BT1**

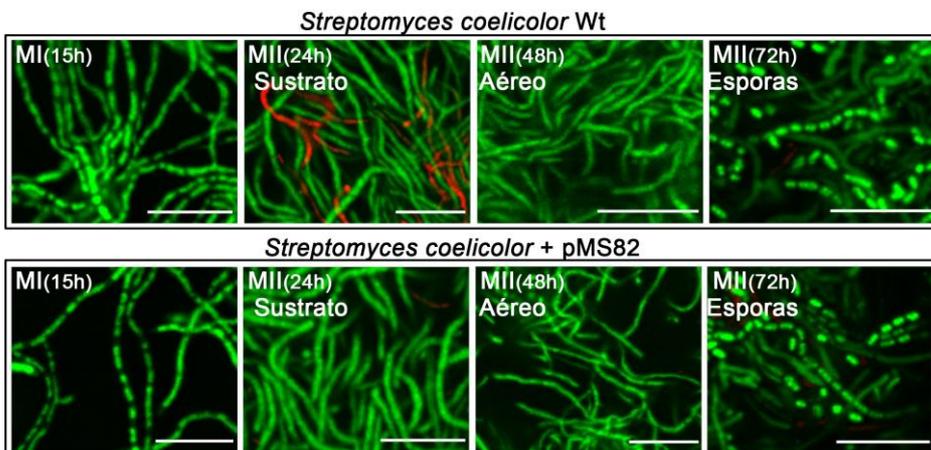
Los resultados que se detallan a continuación han sido publicados en la revista *Applied Microbiology and Biotechnology* en el año 2016 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).

#### **III.2.1. Fenotipo causado por la integración de pMS82 en el genoma de *S. coelicolor***

Para ser capaces de profundizar en el estudio del mutante *SCO2730::Tn5062*, y de otros mutantes hechos en el laboratorio, fue necesario buscar plásmidos integrativos que tuvieran fenotipo neutro al integrarse en el cromosoma de *S. coelicolor*. Descartamos el uso de plásmidos integrativos basados en el fago  $\phi$ C31 debido a que algunos autores (Combes 2000) han identificado sitios pseudo-*attB* o secundarios en los que puede ocurrir la integración del fago, y esto puede generar mutaciones que producen diferentes fenotipos.

Gregory *et al.* (2003) desarrollaron una serie de plásmidos integrativos basados en el sistema del fago  $\phi$ BT1, entre los que se encuentra pMS82. Estos autores demostraron que la integración en el

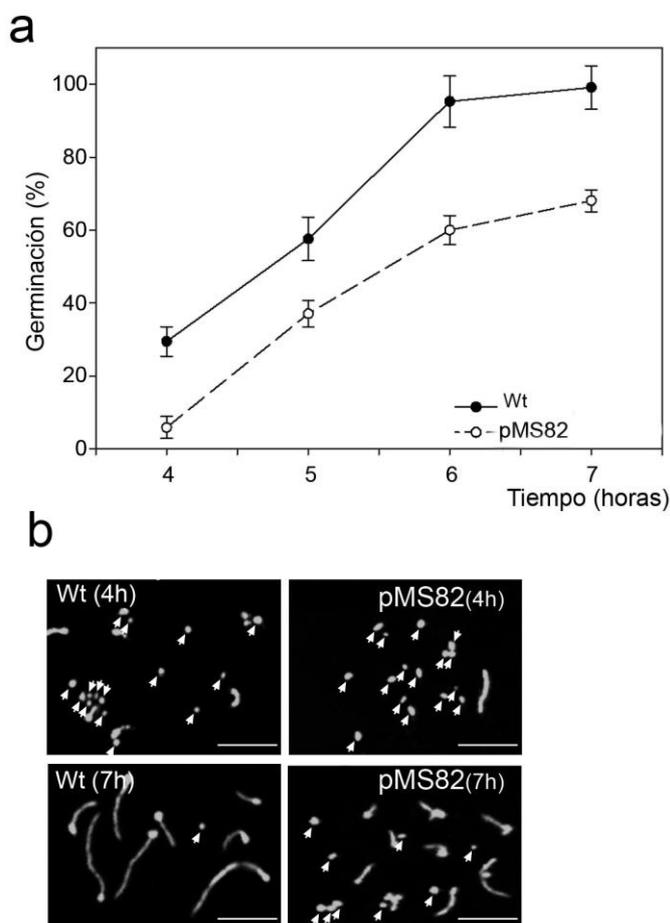
gen *SCO4848*, su sitio *attB* en *S. coelicolor*, producía una versión modificada del gen que consideraron funcional y que, por tanto, generaría un fenotipo neutro. No obstante, en ese trabajo los autores no estudiaron en detalle el efecto de la integración del plásmido sobre el desarrollo. Por este motivo, antes de utilizar el plásmido pMS82 en las construcciones de complementación de nuestros mutantes, decidimos analizar como afectaba la integración del plásmido a la diferenciación en *S. coelicolor*. Para ello, comparamos el fenotipo de *S. coelicolor* M145 (cepa Wt) con el de *S. coelicolor* M145 [pMS82] (cepa pMS82). Realizamos un análisis fenotípico en cultivos sólidos en medio GYM, en los tiempos correspondientes a las fases clave del desarrollo: germinación (7-8 h), primer micelio compartimentado (MI, 15 h), segundo micelio multinucleado (MII) sin cubiertas hidrofóbicas (sustrato, 24 h) y con cubiertas hidrofóbicas (aéreo, 48 y 63 h), y en la esporulación (72 h) (Fig. 14).



**Figura 14.** Diferenciación de las cepas silvestre y pMS82 de *S. coelicolor* en cultivos sólidos (medio GYM). Imágenes de microscopía láser confocal de muestras teñidas con SYTO9 (verde) y yoduro de propidio (rojo). MI(15h), primer micelio compartimentado. MII(24h) y MII(48h) segundo micelio, multinucleado. MII(72h), hifas esporulantes.

Tal como se describirá más abajo (apartado 2.3) el efecto de la integración de pMS82 y los plásmidos derivados de éste, no alteraron la producción de antibiótico.

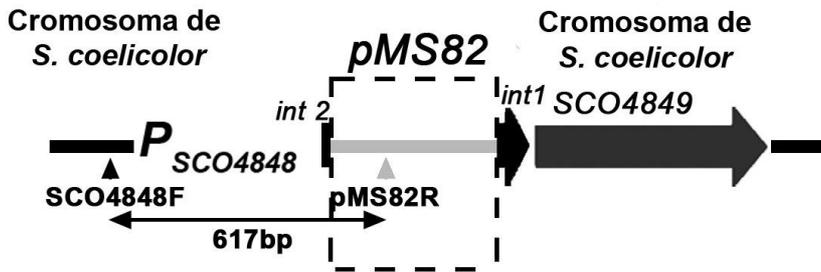
La única diferencia fenotípica que observamos entre las cepas *S. coelicolor* M145 [pMS82] y *S. coelicolor* M145 fue un retraso en la germinación de las esporas (Fig. 15a,b).



**Figura 15. Efecto de la integración de pMS82 en la germinación de *S. coelicolor*.** (A) Porcentaje de germinación (promedio  $\pm$  D.E.) en medio sólido GYM de *S. coelicolor* M145 (Wt) y *S. coelicolor* M145[pMS82] (pMS82). (B) Imágenes de microscopía confocal de cultivos de 4 y 7 h, en medio sólido GYM, de las cepas Wt y pMS82. Las puntas de flecha indican esporas no germinadas.

### III.2.2. Integración de $\Phi$ BT1 en el cromosoma de *S. coelicolor*

El sitio de integración (*attB*) de los plásmidos  $\Phi$ BT1 en el cromosoma de *S. coelicolor*, está en el gen *SCO4848* (Gregory *et al.* 2003). Hasta el momento, no hay estudios donde se describa la existencia de sitios *attB*- $\Phi$ BT1 alternativos en *Streptomyces*. Debido al fenotipo observado en la cepa *S. coelicolor* M145 [pMS82], decidimos analizar en más detalle el sitio de integración  $\Phi$ BT1 en el cromosoma de *S. coelicolor* mediante PCR. Para ello, se diseñó una pareja de cebadores que hibridan en el extremo 5' del gen *SCO4848*, donde se localiza el *attB* del cromosoma y en la región que flanquea el sitio *attP* en pMS82 (Fig. 16) Estos cebadores amplifican un fragmento de 617 pb, sólo si pMS82 o alguno de los plásmidos derivados de éste se han integrado en el sitio *attB* de *SCO4848* (Fig. 17a).



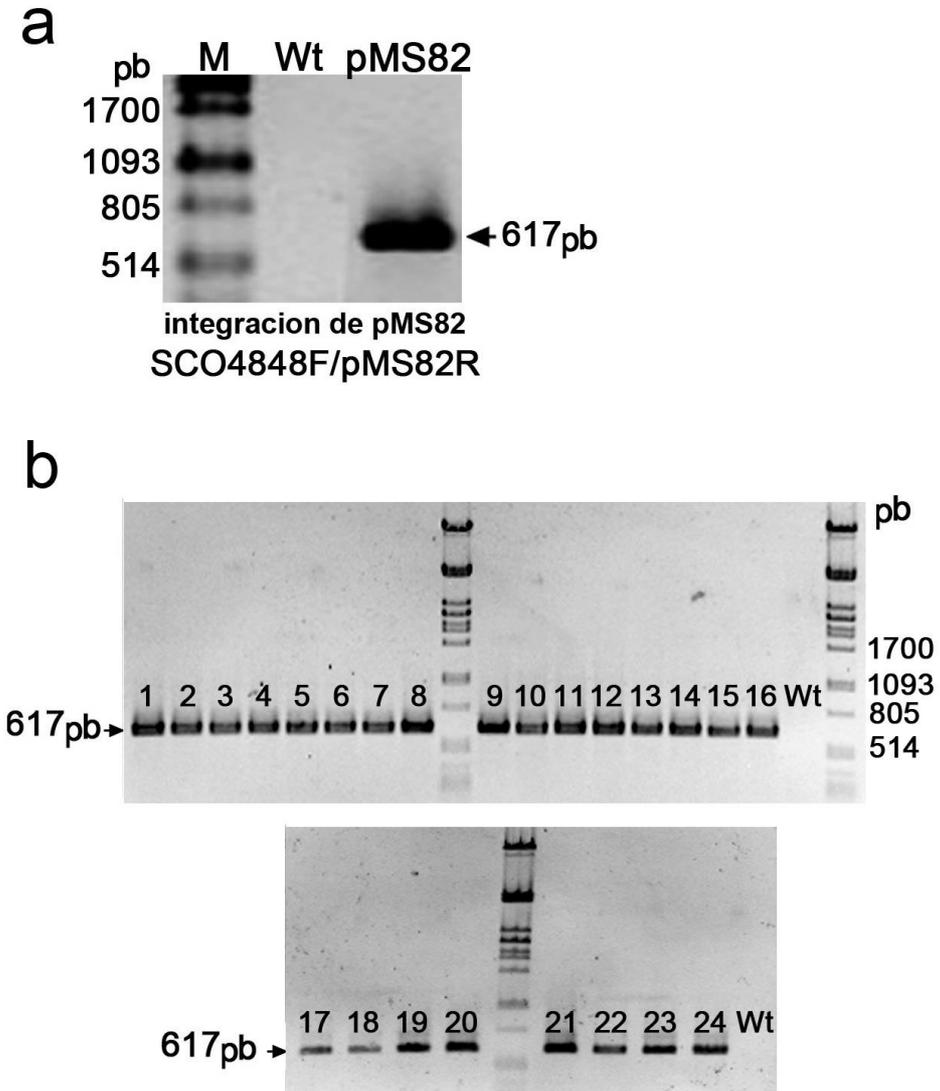
**Figura 16.** Esquema de la integración de pMS82 en el cromosoma de *S. coelicolor*. Se muestran los cebadores SCO4848F y pMS82R, diseñados para la confirmación de la integración en *SCO4848*. Los fragmentos del gen *SCO4848*, generados por la integración del plásmido, se señalan como *int1* e *int2*.

En 24 experimentos independientes hechos en nuestro laboratorio, utilizando el plásmido pMS82 o los vectores pNG1-4

basados en pMS82 creados en esta tesis (apartado 2.3), la integración ocurrió siempre en el sitio *attB* de *SCO4848* (Fig. 17b). Esto apunta a que el fago  $\Phi$ BT1 tiene su único sitio de integración en *S. coelicolor* dentro del gen *SCO4848*, o al menos, que la frecuencia de integración en otros sitios del cromosoma es muy baja, lo cual es básico para construir un plásmido integrativo que no afecte el fenotipo de *Streptomyces*.

La integración de los plásmidos  $\Phi$ BT1 modifica el gen *SCO4848* al interrumpirlo en su extremo 5'. El gen *SCO4848* codifica una proteína integral de membrana, que contiene dos dominios transmembrana (Fig. 18) (Gregory *et al.* 2003). Según Gregory *et al.* (2003), la integración genera una ORF modificada (*SCO4848int1* en la Fig. 16), la cual seguiría expresando un posible péptido señal y un producto funcional (Fig. 18). No obstante, la ORF *SCO4848int1* y la región promotora de *SCO4848* están separados por el plásmido integrado (Fig. 16), haciendo que la transcripción de *SCO4848int1* sea poco probable.

Corriente abajo del gen *SCO4848*, se ubica el gen *SCO4849* (Fig. 19a) que codifica una proteína integral de membrana. Dada la proximidad de los dos marcos de lectura, quisimos comprobar si la inserción de pMS82 también afectaba a la expresión de *SCO4849*. Se analizó la expresión acoplada de ambos genes mediante RT-PCR, utilizando ARN de un cultivo de 72 horas en medio sólido GYM y la pareja de cebadores RT4848F/RT4849R, que amplifican un fragmento de 623 pb (Fig. 19a) en el caso de que ambos genes se expresen en un mismo transcrito policistrónico.



**Figura 17.** PCR para confirmar la inserción de plásmidos basados en  $\Phi$ BT1 en el sitio *attB-SCO4848* de *S. coelicolor*. En los análisis de PCR se utilizaron los cebadores SCO4848F y pMS82R. Como control negativo se utilizó la cepa Wt de *S. coelicolor* M145.

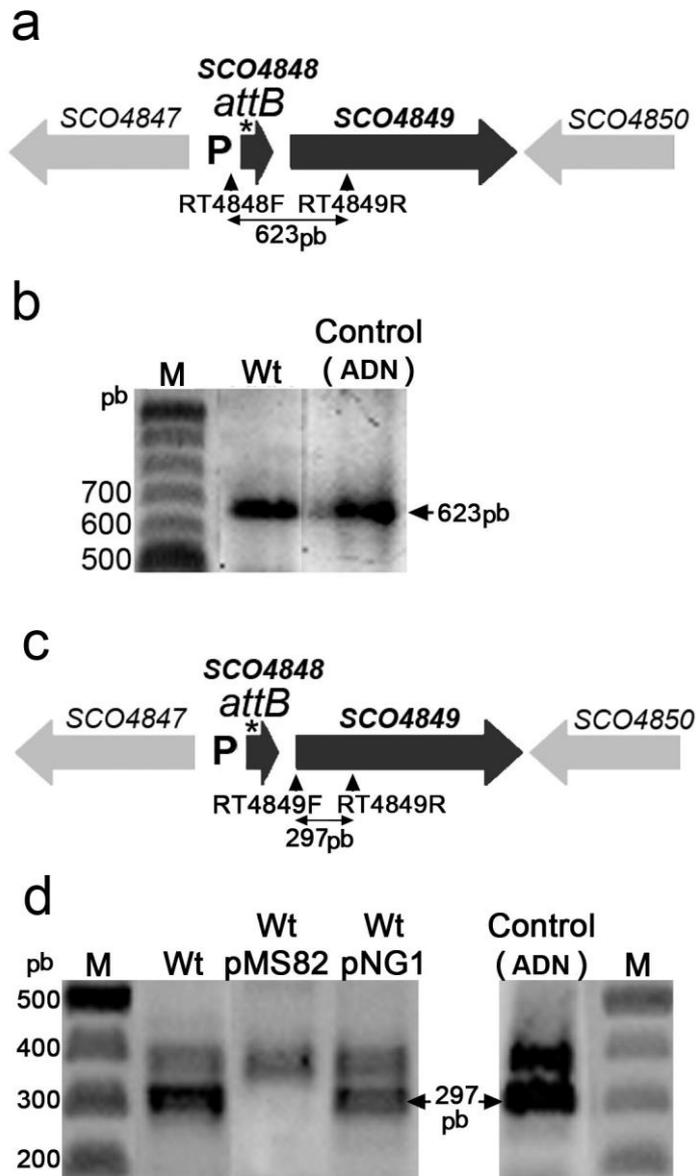
## Resultados

---

|                    |             |                    |   |                          |            |
|--------------------|-------------|--------------------|---|--------------------------|------------|
|                    |             | Transmembrana      | Transmembrana                                     |                          |            |
| <b>SCO4848</b>     | MKLSRP      | VSWFLAFGVWSWIIWITF | VKNLVKDGSGLAFEDGDPT                               | AYFWVHLLAIVSFVLGTVVGVIGL | RGVRALRRTS |
| <b>SCO4848int1</b> | MKGDMPRSWMA | DLRFLLGTLVLSFFWITF | VKNLVKDGSGLAFEDGDPT                               | AYFWVHLLAIVSFVLGTVVGVIGL | RGVRALRRTS |
| <b>SCO4848int2</b> | MKLSRP      | VSWFLAFGVWSWIIWIT  | VQREQPSTRNVCPETTTQHPKRLKPRPAPAQLQVDGFSFPLHNPASGSL |                          |            |

**Figura 18. Comparación de la secuencia de la proteína SCO4848 con sus versiones alternativas (SCO4848int1 y SCO4848int2).** Se indican los dominios transmembrana de estas proteínas. En gris se muestran los aminoácidos mutados; en negro los aminoácidos nativos.

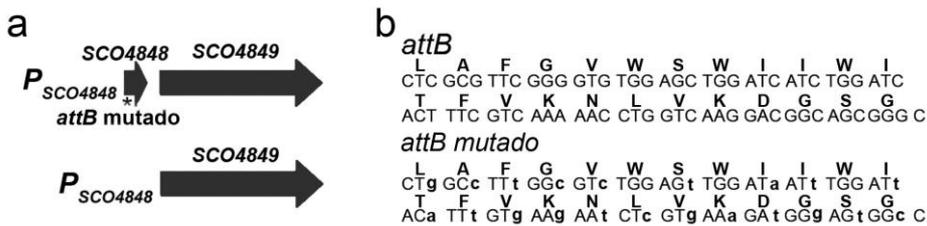
Como se observa en la Fig. 19b, a partir del RNA de la cepa Wt se obtuvo amplificación, lo que demuestra que *SCO4848* se transcribe junto con *SCO4849* en *S. coelicolor*. Por lo tanto, la integración de los plásmidos  $\Phi$ BT1 en *SCO4848* también afecta a la expresión de *SCO4849*. Confirmamos esta hipótesis, también mediante RT-PCR, pero esta vez utilizando los cebadores RT4849F y RT489R (Fig. 19c) y, ARN de cultivos de 24 h (en medio sólido GYM) de las cepas *S. coelicolor* M145 (Wt), *S. coelicolor* M145 [pMS82], y *S. coelicolor* M145 [pNG1] (pNG1 es una variante de pMS82 creada en esta tesis, apartado 2.3). En esta PCR se obtuvo más de un amplicón. Sin embargo, el amplicón buscado (297 pb) se observó en la cepa Wt de *S. coelicolor* M145 y en la cepa portando el plásmido pNG1 (cepa pNG1, ésta se describirá en detalle en el siguiente apartado) pero no en la cepa *S. coelicolor* M145 [pMS82] como se esperaba (Fig. 19d).



**Figura 19. Análisis transcripcional de los genes *SCO4848* y *SCO4849*.** (a) Esquema de la región cromosómica alrededor de *SCO4848*. Se indica la ubicación de los cebadores RT4848F/RT4849R. (b) RT-PCR, con oligos RT4848F/RT4849R, que demuestra la co-transcripción de *SCO4848* y *SCO4849*. (c) Esquema de la región cromosómica alrededor de *SCO4849*, se indica la ubicación de los cebadores RT4849F/RT4849R. (d) RT-PCR que muestra la alteración de la transcripción de *SCO4849* en la cepa *S. coelicolor*[pMS82].

### III.2.3. Construcción de plásmidos integrativos basados en $\Phi$ BT1 que restauran la expresión del gen *SCO4849*

Para crear los plásmidos integrativos basados en  $\Phi$ BT1 que restauraran la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849*, decidimos sintetizar dos secuencias (Fig. 20a). La primera, un fragmento de 423 pb ubicado en dirección 5' del ATG del gen *SCO4848*, con longitud suficiente como para incluir la región promotora del gen *SCO4848* ( $P_{SCO4848}$ ), seguido por las ORFs de los genes *SCO4848* y *SCO4849* (1604 pb en total) ( $P_{SCO4848}+SCO4848+SCO4849$ ). La segunda secuencia de 1852 pb, se diseñó incluyendo la región promotora de *SCO4848* y la ORF del gen *SCO4849* ( $P_{SCO4848}+SCO4849$ ). Con el propósito de evitar la recombinación del sitio *attB*-*SCO4848* de la construcción que incluye el gen *SCO4848* con el sitio *attP* del plásmido, cambiamos el último nucleótido de cada codón en *SCO4848* generando mutaciones silenciosas (Fig 20b).



**Figura 20. Diseño de secuencias a incluir en plásmidos integrativos basados en  $\Phi$ BT1.** (a) Construcciones genéticas para restaurar la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849*. Con \* se señala el sitio de integración, *attB*. (b) Secuencia del sitio *attB* y del *attB* mutado que incluye mutaciones sinónimas.

Introdujimos las secuencias *P<sub>SCO4848</sub>+SCO4848+SCO4849* y *P<sub>SCO4848</sub>+SCO4849* en el plásmido pMS82. Sin embargo, solo la segunda fue estable, dando lugar al plásmido pNG1 (Fig. 21; número de acceso en base de datos del NCBI, KR131848). La introducción de *P<sub>SCO4848</sub>+SCO4848+SCO4849* causó reorganizaciones y deleciones en el plásmido pMS82 (Fig. 22) indicando que, aunque el sitio *attB* estuviera mutado, seguía habiendo recombinación entre el sitio *attP* y sitio *attB* mutado introducido en el plásmido.

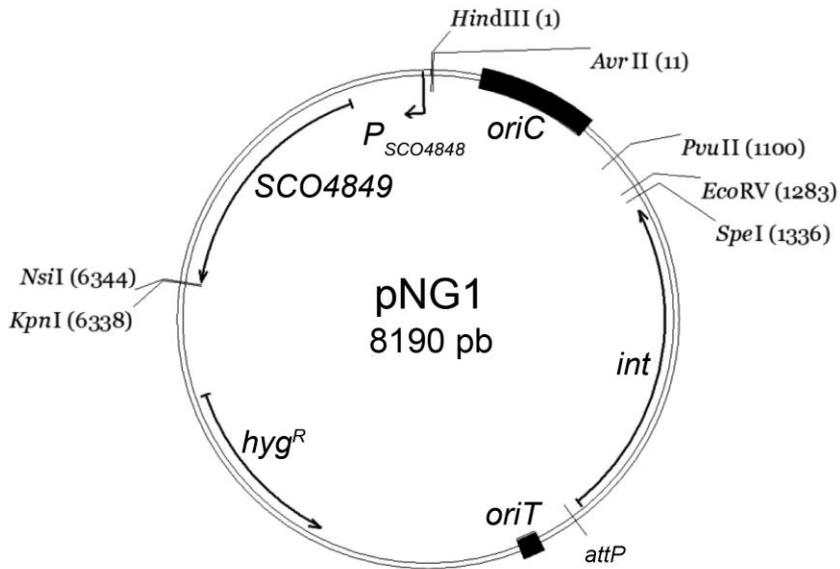
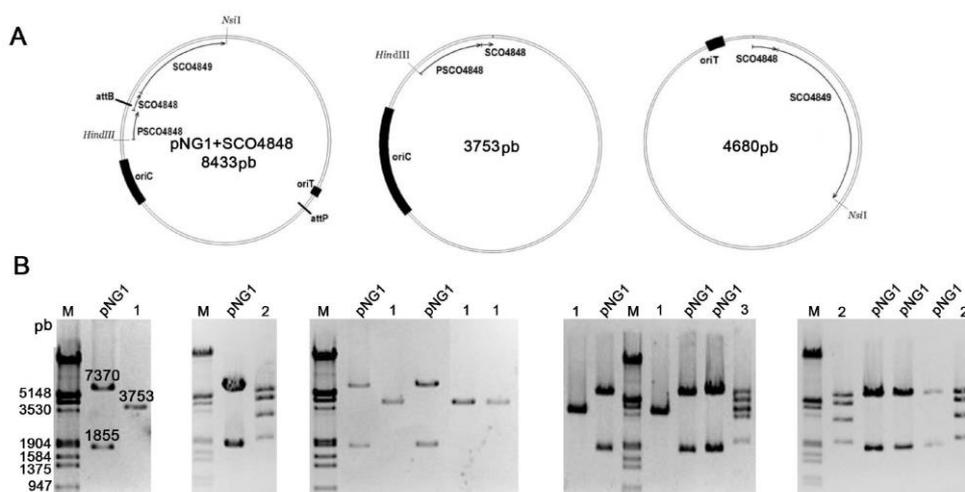


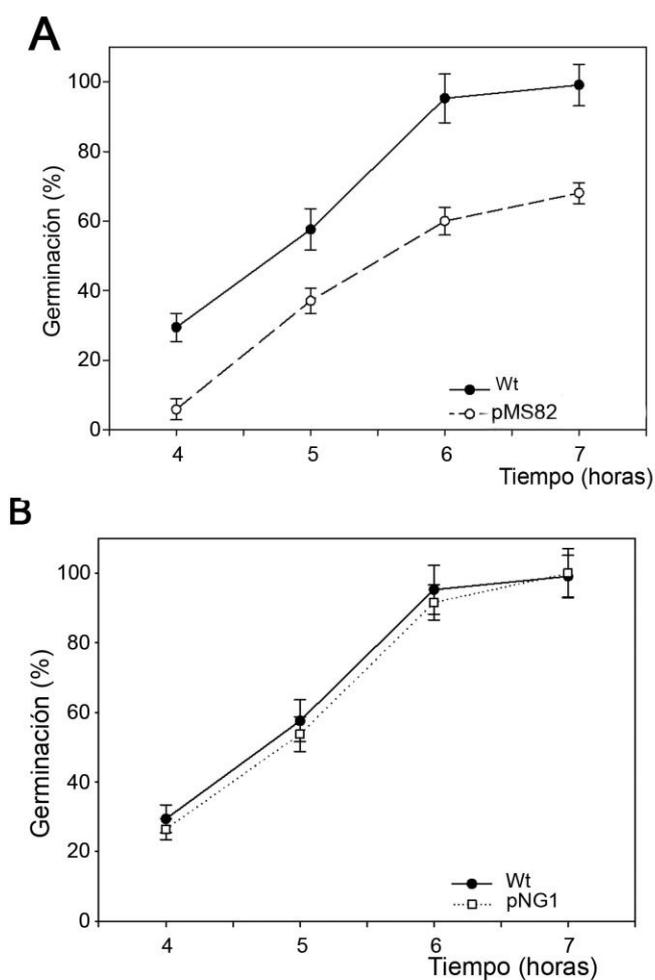
Figura 21. Plásmido integrativo pNG1 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).



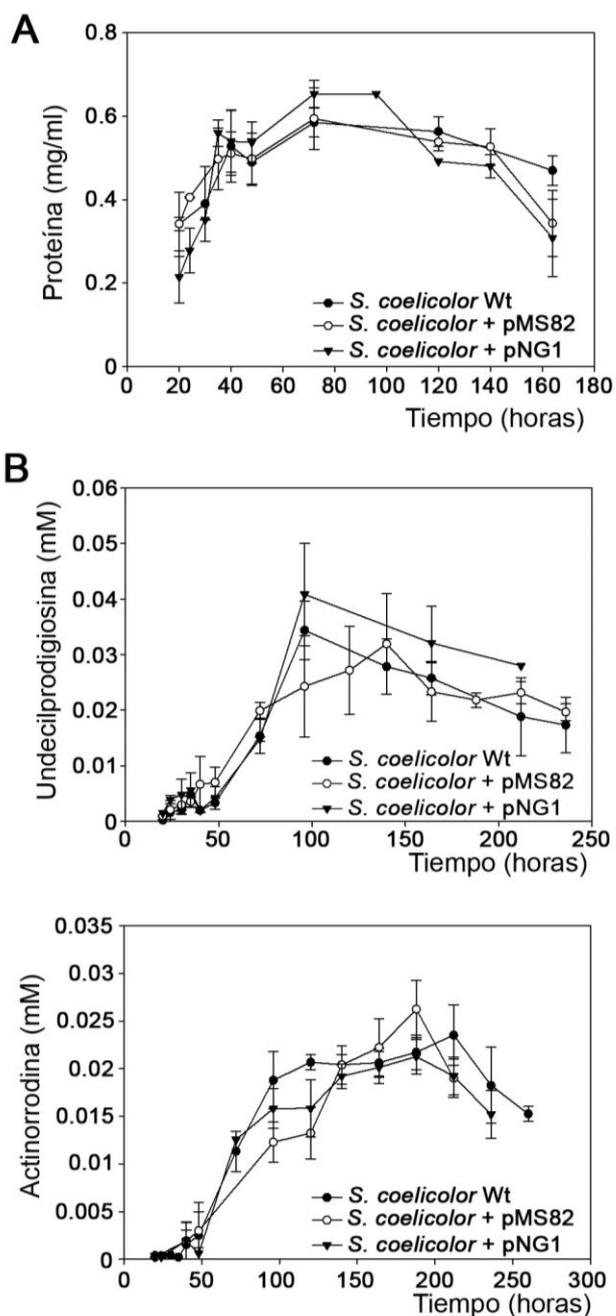
**Figura 22. Construcción de pMS82 modificado con  $P_{SCO4848}+SCO4848+SCO4849$ .** (A) Esquema de pNG1 + gen *SCO4848* sintetizado con mutaciones sinónimas (número de acceso KR150757), y los dos vectores, uno sin origen de replicación, formados por la recombinación entre los sitios *attB* mutado y *attP*. (B) ADN plasmídico de transformantes de la ligación pNG1 + gen *SCO4848*, digerido con *HindIII/NsiI*, permitiendo diferenciar pNG1 (7370 y 1855 pb); pNG1 con *SCO4848* (7370 y 2108 pb), forma no estable y no detectada; y la forma truncada generada por la recombinación de los sitios *attB* y *attP* (3753 pb) que mantiene el origen de replicación, clon 1. Se observaron otras dos reorganizaciones de pNG1 (clones 2 y 3) con menor frecuencia. M: marcador de peso molecular.

La integración de pNG1 ( $pMS82+P_{SCO4848}+SCO4849$ ) en el cromosoma de la cepa silvestre complementó el fenotipo de retraso en la germinación (Fig. 23) que produce la integración de plásmidos  $\Phi BT1$ . Para confirmar que pNG1 tiene un efecto neutro en el fenotipo de *S. coelicolor*, analizamos el crecimiento y la producción de antibióticos, undecilprodigiosina y actinorrodina, en cultivos líquidos en medio R5A sin sacarosa de las cepas *S. coelicolor* M145 (Wt), *S. coelicolor* M145 [pMS82] (pMS82), y *S. coelicolor* M145 [pNG1] (pNG1) (Fig. 24). También estudiamos las fases del desarrollo en medio sólido GYM (Fig.

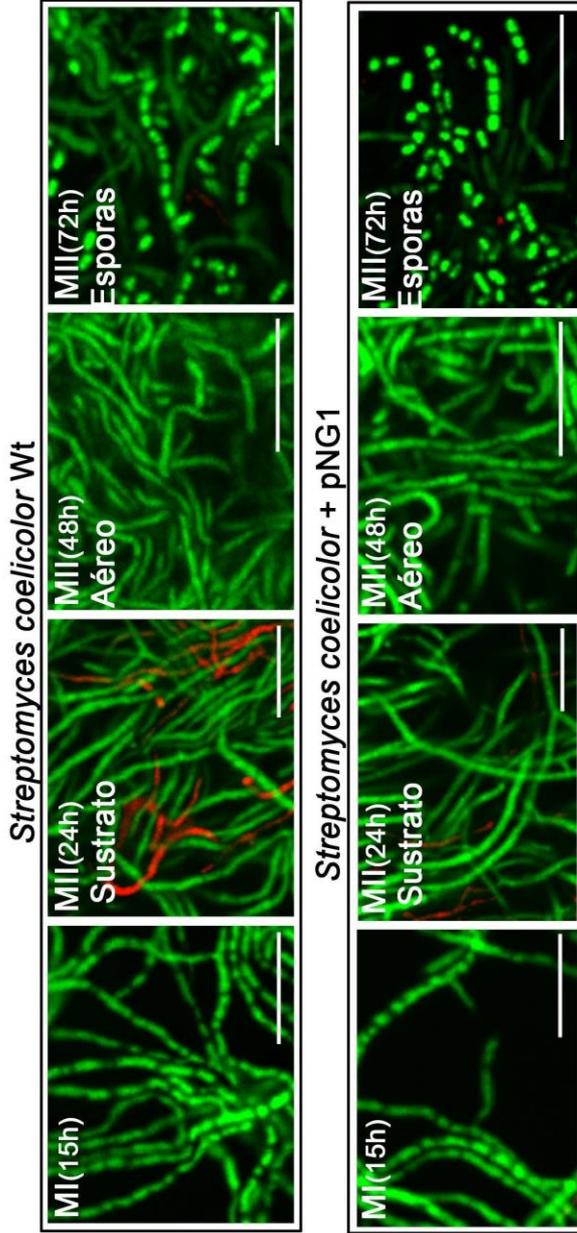
25), como se describe en el apartado 2.1. En la cepa pNG1 también se comprobó, mediante RT-PCR, la restauración de la expresión de *SCO4849* (Fig. 19d). Estos resultados demuestran que, el fenotipo observado en *S. coelicolor* a causa de la integración de los plásmidos  $\Phi$ BT1 en el gen *SCO4848*, se debe a la alteración en la expresión del gen *SCO4849*.



**Figura 23. Restauración de la germinación en la cepa *S. coelicolor*[pNG1].** Se representa el porcentaje de germinación (promedio  $\pm$  D.E.) de las cepas *S. coelicolor* M145 (Wt), *S. coelicolor* M145 [pMS82] (pMS82) y *S. coelicolor* M145 [pNG1] (pNG1), en medio sólido GYM.



**Figura 24. Crecimiento y producción de antibióticos en *S. coelicolor* con y sin plásmido integrativo.** Datos obtenidos de cultivos de *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor*[pMS82] y *S. coelicolor*[pNG1] en medio líquido R5A sin sacarosa. (a) Curva de crecimiento. (b) Producción de undecilprodigiosina y actinorrodina.



**Figura 25. Diferenciación de las cepas silvestre y pNG1 de *S. coelicolor* en cultivos sólidos (medio GYM).** Imágenes de microscopía láser onfocal de muestras de cultivos teñidas con SYTO9 (verde) y yoduro de propidio (rojo). MI(15h), primer micelio, compartimentado. MII(24h) y MII(48h), segundo micelio, multinucleado. MIII(72h), cadenas de esporas.

Para facilitar los procesos de ingeniería genética en *S. coelicolor*, diseñamos tres plásmidos basados en pNG1:

- Plásmido pNG2 (Fig. 26; número de acceso en base de datos del NCBI, KR131849). Se diseñó para facilitar la expresión de genes heterólogos. Se añadió a pNG1: el promotor fuerte y constitutivo *P<sub>ermE\*</sub>* (Bibb *et al.* 1994), el RBS del gen *tuf-1* (Vijgenboom *et al.* 1994), un sitio de clonación múltiple que incluye enzimas de restricción con un sitio único de corte en el plásmido, y el terminador del fago *fd* (Gentz *et al.* 1981).

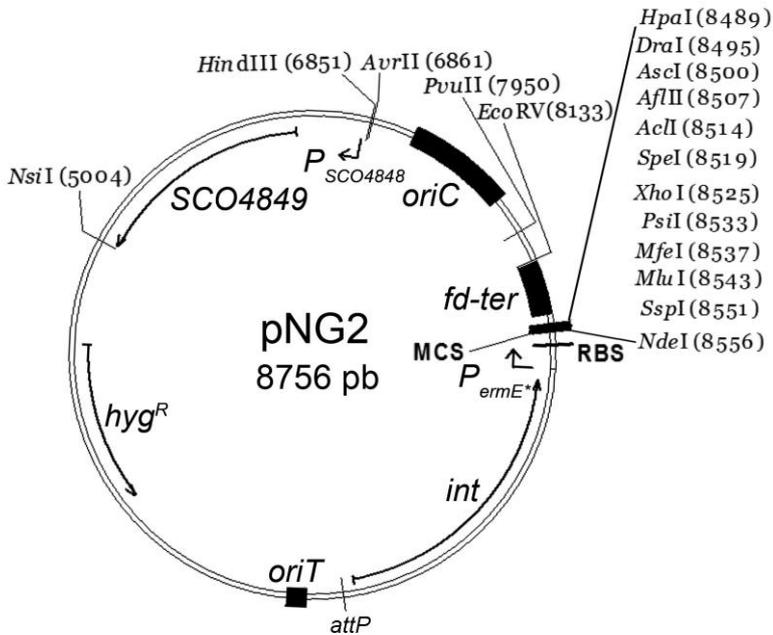


Figura 26. Plásmido integrativo pNG2 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).

- Plásmido pNG3 (Fig. 27; número de acceso en base de datos del NCBI, KR131850). Es el plásmido pNG1 con el gen *bla*, que confiere resistencia a ampicilina, para mejorar la selección en células de *E. coli*, ya que la resistencia a higromicina no funciona bien en esta bacteria.

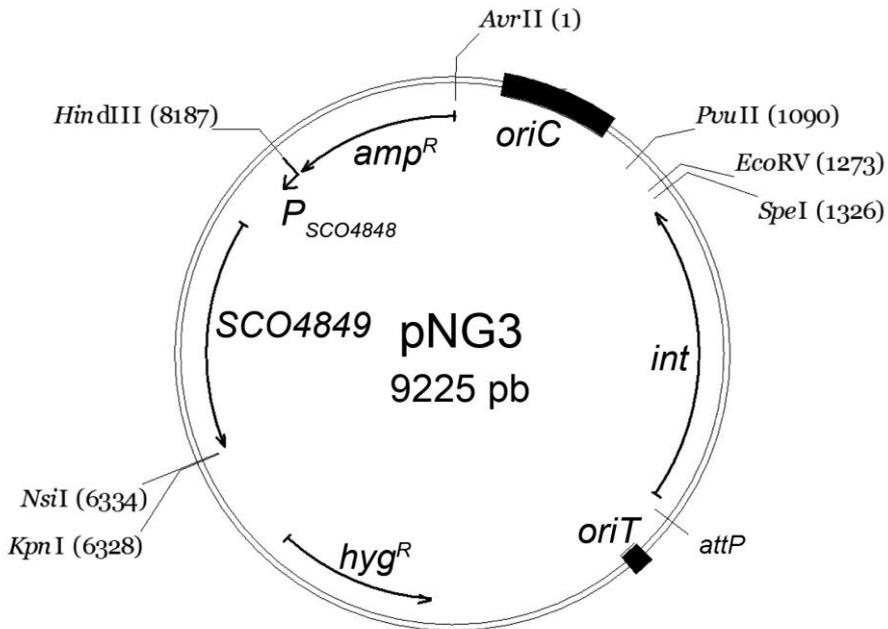


Figura 27. Plásmido integrativo pNG3 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).

- Plásmido pNG4 (Fig. 28; número de acceso en base de datos del NCBI, KR131851). Se construyó a partir de pNG2, introduciendo la resistencia a ampicilina (gen *bla*).

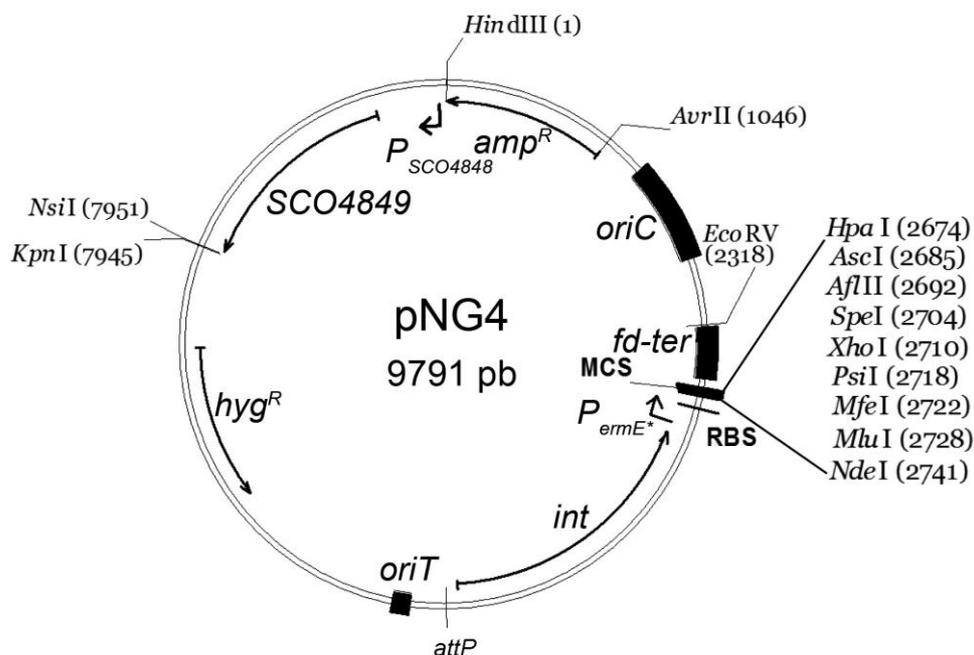
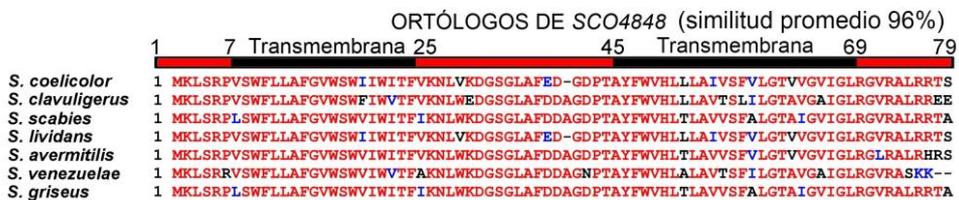


Figura 28. Plásmido integrativo pNG4 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).

#### III.2.4. Integración de los plásmidos con el sitio de integración $\Phi$ BT1 en otros estreptomicetos

Al comparar las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas SCO4848 y SCO4849 de *S. coelicolor* con las de sus ortólogos en otras especies (*S. clavuligerus*, *S. scabies*, *S. lividans*, *S. avermitilis*, *S. venezuelae*, y *S. griseus*) confirmamos que estos genes están conservados en el género *Streptomyces*. En promedio, el porcentaje de similitud entre el producto de *SCO4848* y el de sus ortólogos es del 96% (Fig. 29). En cuanto al producto del gen *SCO4849*, el promedio de similitud es del 96% en su dominio metalofosfatasa y del 86% en su dominio transmembrana (Fig. 30).

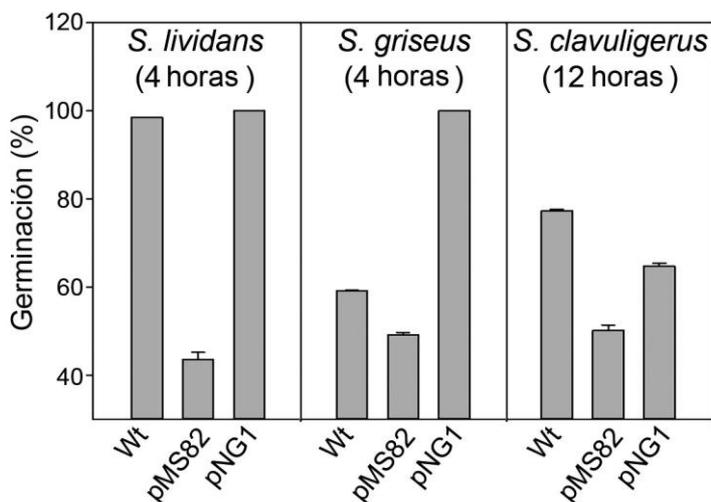
A continuación, analizamos el efecto de la integración de los vectores  $\Phi$ BT1 en *S. lividans*, *S. griseus* y *S. clavuligerus* (Fig. 31). Las cepas silvestres de *S. lividans* y *S. griseus* germinan mucho más rápido que la de *S. coelicolor*. las dos primeras alcanzaron el 100% y 59,2% de germinación, respectivamente, a las 4 h, tiempo en el cual la germinación de *S. coelicolor* fue del 30% en medio GYM sólido. En la cepa silvestre de *S. clavuligerus* la germinación fue más lenta que en *S. coelicolor*, 77% a las 12 h en *S. clavuligerus* en comparación con 100% de germinación en *S. coelicolor* para ese tiempo.



**Figura 29. Alineamiento de la secuencia de SCO4848 de *S. coelicolor* y sus ortólogos en otros estreptomicetos.** Se indican las posibles regiones transmembrana.

Nuestros resultados demuestran que, la integración de pMS82 retrasa la germinación en las tres especies utilizadas. La ORF del gen *SCO4849*, incluido en pNG1, complementa este fenotipo en *S. lividans* y en *S. clavuligerus* pero no en *S. griseus* (100% de germinación en la cepa pNG1 comparado con 59,2% en la cepa Wt, en *S. griseus*) (Fig. 31). Esto indica que el efecto de *SCO4849* en la germinación es más fuerte que el retraso generado por la mutación (por integración del plásmido) de su ortólogo en *S. griseus*.

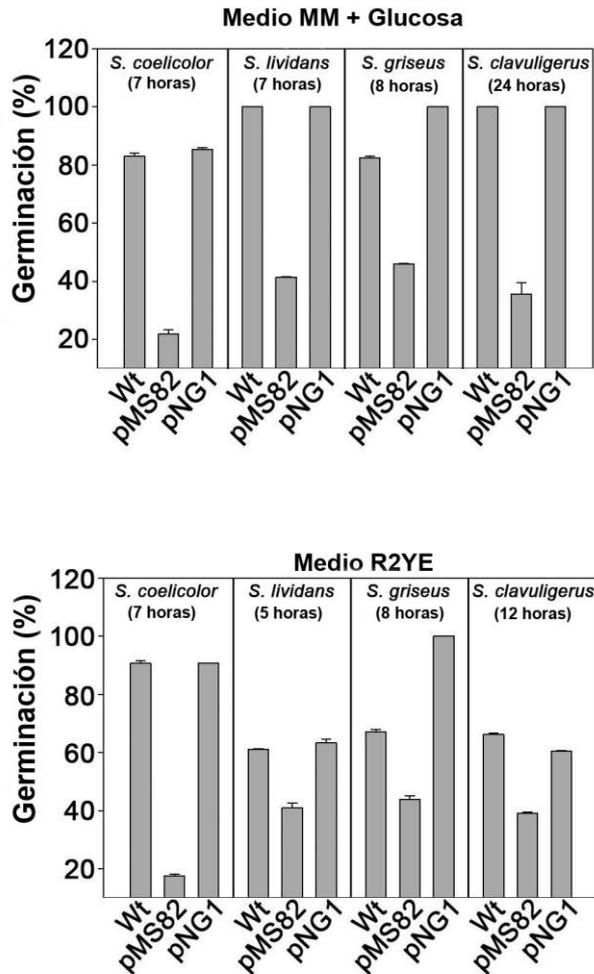




**Figura 31. Germinación en *S. lividans*, *S. griseus* y *S. clavuligerus* con y sin pMS82 o pNG1.** Se muestran los porcentajes de germinación (promedio  $\pm$  D.E.) en medio sólido GYM en el caso de *S. lividans* y *S. griseus*, y en medio sólido TSA para *S. clavuligerus*.

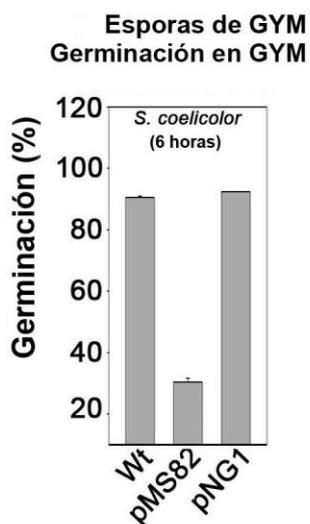
Decidimos analizar la germinación en otros medios de cultivo para comprobar si el fenotipo observado era dependiente del medio utilizado. Utilizamos R2YE y MM con glucosa, observándose que el tiempo de germinación de las esporas depende del medio de cultivo utilizado (Fig. 32). En todos los medios empleados observamos el retraso en la germinación de la cepa *S. coelicolor* M145 [pMS82] (pMS82) con respecto a la cepa *S. coelicolor* M145 (Wt), producido por la integración del plásmido basado en  $\Phi$ BT1. Cabe destacar que, la germinación de *S. coelicolor* en medios de cultivo sólido ocurre en un período de tiempo corto, comenzando a las 4 h de incubación y acabando en aproximadamente 7 h, por lo que pequeñas alteraciones en el cultivo pueden incrementar la variabilidad en los porcentajes de germinación obtenidos en un tiempo concreto de este proceso. Por ello

decidimos hacer todas las medidas de germinación en experimentos simultáneos. De esta forma la variabilidad generada en los tiempos de recogida y de siembra, es la misma para todos los cultivos.



**Figura 32. Relación entre la germinación de las esporas y el medio de cultivo en el que germinan.** Porcentaje de germinación (promedio de tres réplicas  $\pm$  D.E.) de *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. griseus*, y *S. clavuligerus* con y sin pMS82 o PNG1 en medio sólido MM con glucosa y R2YE.

Evaluamos también el efecto, en *S. coelicolor*, del medio utilizado para obtener las esporas, comparando la germinación entre esporas obtenidas de medios sólidos SFM y GYM (Fig. 33). En ambos casos, la germinación se retrasó en la cepa *S. coelicolor* M145 [pMS82] (pMS82). Las diferencias en los porcentajes de germinación entre las esporas de distintas procedencias no fueron significativas.



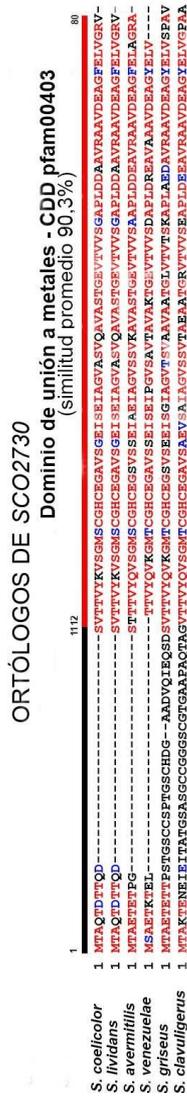
**Figura 33. Relación entre la germinación de las esporas y el medio de cultivo del que se han obtenido.** Porcentaje de germinación de esporas de la cepa silvestre de *S. coelicolor* obtenidas de cultivos en medio GYM y germinadas en medio sólido GYM.

### III.3. Función de los genes *SCO2730* (*copZ*) y *SCO2731* (*copA*)

#### III.3.1. Conservación de los genes *SCO2730* (*copZ*) y *SCO2731* (*copA*) en el género *Streptomyces*

La similitud promedio entre la proteína codificada por el gen *SCO2730* y sus ortólogos en *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans*, *S. clavuligerus* y *S. venezuelae*, es del 90,3% (Fig. 34). En el caso del gen

SCO2731 la similitud promedio es del 80,6% (Fig. 35). El ortólogo del gen *SCO2731* de *S. clavuligerus* no está registrado en la base de datos *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>), pero está localizado corriente abajo del gen *SCLAV\_1906*, ortólogo de *SCO2730* (Fig. 35). Por tanto, puede decirse que los genes *SCO2730/2731* están muy conservados dentro del género *Streptomyces*.



**Figura 34. Alineamiento de la secuencia de SCO2730 de *S. coelicolor* y sus ortólogos en otros estreptomicetos.** Se indica el dominio de unión a metales (dominio pfam00403 en la base de datos *Conserved Domain Database*, CDD).

ORTÓLOGOS DE SCO2731  
(similitud promedio 80,6 %)

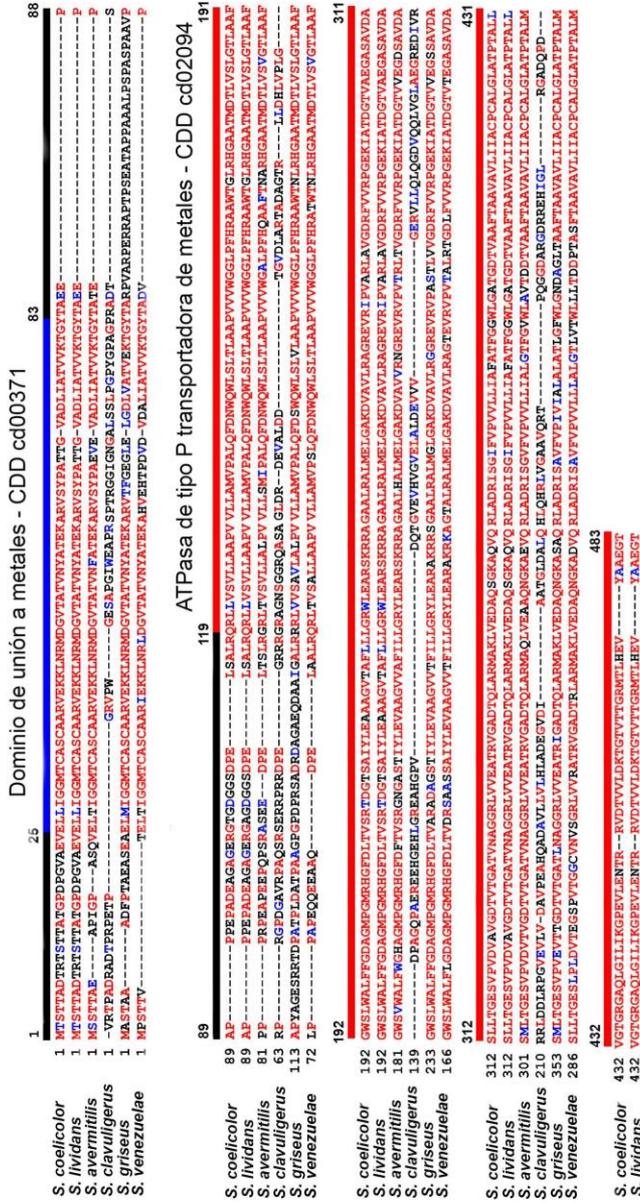


Figura 35. Alineamiento de la secuencia de SCO2731 de *S. coelicolor* y sus ortólogos en otros estreptomicetos. Se señalan el dominio de unión a metales y el dominio ATPasa de tipo P transportador de metales, en la base de datos *Conserved Domain Database* (CDD) dominios cd00371 y cd02094, respectivamente.

Al hacer la comparación entre los ortólogos de *SCO2730*, dedujimos que probablemente el ORF de *SCO2730* comienza en la posición 66 (ATG, Met) en lugar de en el codón GTG (Val) como está anotado en la base de datos *StrepDB*, ya que estos primeros 66 aminoácidos no están presentes en ninguno de los ortólogos de *SCO2730* analizados. En los genomas de todos los *Streptomyces* que analizamos, los ortólogos de *SCO2730/2731* están juntos. No obstante, la sintenia *SCO2728-SCO2731* solo está presente en *S. coelicolor* y en *S. lividans* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>).

### **III.3.2. Efectos de la interrupción del gen *SCO2730* (*copZ*) en la germinación y la producción de antibiótico**

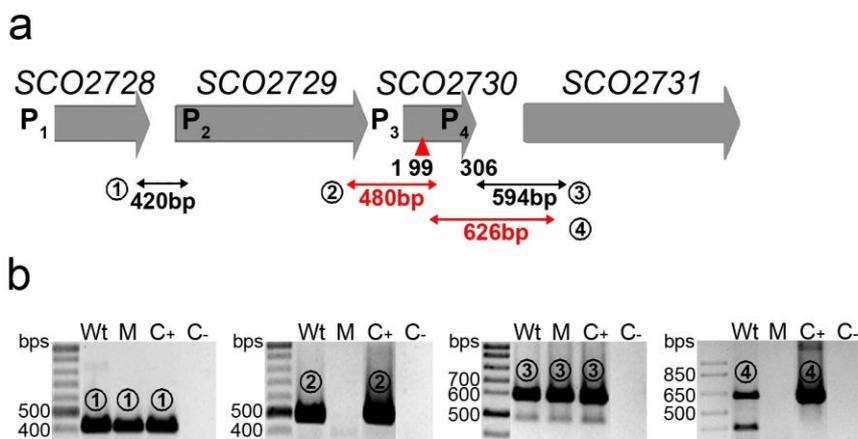
Para estudiar la función del gen *SCO2730* (*copZ*), éste fue interrumpido mediante la inserción del transposón Tn5062. Para ello utilizamos el cósmido C46.2.D06 de la librería de cósmidos creada por Fernández-Martínez *et al.* (2011). Una vez obtenido el mutante *SCO2730::Tn5062*, se comprobó por PCR y *Southern Blot* que la inserción era la correcta.

#### **a) Análisis de la transcripción de los genes *SCO2730* y *SCO2731* en el mutante en *SCO2730* (*copZ*)**

Dwarakanath *et al.* (2012) propusieron que el gen *SCO2730* (*copZ*), al igual que el gen *SCO1045* (*copZ*), forma parte de un operón de tipo *copZA*. Aunque estos autores identificaron un promotor para el gen *SCO2730*, no profundizaron en los análisis de expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731*. Para comprobar la posible transcripción de los

genes *SCO2730* (*copZ*) y *SCO2731* (*copA*) a partir de un mismo promotor, realizamos análisis de RT-PCR utilizando las parejas de cebadores RT3031F/RT3031R (594 pb) y RT3031F1/RT3031R1 (626 pb). Para estos análisis, se usó ARN de muestras de cultivos de 48 h en medio líquido (20 mL) R5A sin sacarosa.

Demostramos que los genes *SCO2730* (*copZ*) y *SCO2731* (*copA*) se transcriben juntos en el genoma de la cepa silvestre de *S. coelicolor* (amplicones 3 y 4 en la Fig. 36). Por tanto, es de esperar que la expresión del gen *SCO2731* esté afectada en el mutante *SCO2730::Tn5062*, tal como se demostró mediante RT-PCR (amplicón 4 en Fig. 36b). No obstante, utilizando la misma técnica, obtuvimos el amplicón 3 en la cepa mutante (Fig. 36b). Estos resultados indican que *SCO2731* también se expresa a partir de un promotor propio (promotor 4 en Fig. 36a), ubicado entre los cebadores directos (RT3031F y RT3031F1) utilizados en las RT-PCRs de los amplicones 3 y 4. También confirmamos que los genes localizados corriente arriba de *SCO2730* comparten transcrito: *SCO2728* con *SCO2729* (amplicón 1 en Fig. 36a,b) y *SCO2729* con *SCO2730* (amplicón 2 en Fig. 36). Esto sugiere que los 4 genes (*SCO2728-SCO2731*) podrían transcribirse como un único transcrito policistrónico (Fig. 36).



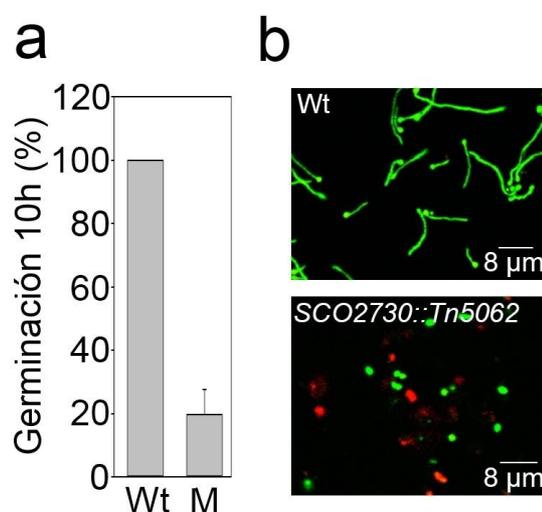
**Figura 36. Análisis transcripcional del entorno genético de *SCO2730*(*copZ*).** (a) Esquema de los genes ubicados alrededor de *SCO2730*. Se indican las posiciones de los promotores conocidos, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, y P<sub>3</sub>, y del promotor identificado en este trabajo, P<sub>4</sub>. Se muestran los tamaños de los amplicones esperados de la transcripción acoplada entre genes adyacentes. El triángulo rojo indica la ubicación de la inserción del transposón Tn5062 utilizada para construir el mutante *SCO2730::Tn5062*. Los amplicones en rojo no amplificaron en el mutante. (b) RT-PCRs que demuestran la transcripción acoplada entre los genes *SCO2728/2729*, *SCO2729/2730*, y *SCO2730/2731*. M, mutante en el gen *SCO2730*. C+, control positivo. C-, control negativo.

### b) Análisis del ciclo de vida en el mutante en *SCO2730* (*copZ*)

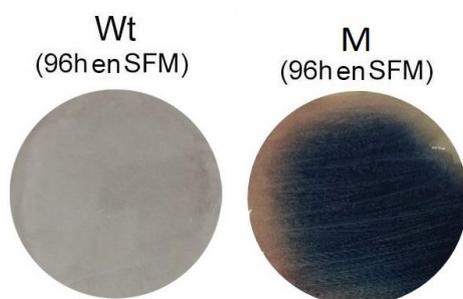
Cuando se analizó el ciclo de vida del mutante *SCO2730::Tn5062* (en medio sólido R5A sin sacarosa), encontramos un evidente retraso en la germinación de las esporas, mayor cantidad de esporas muertas que de esporas vivas y una esporulación tardía (Fig. 37 y 38).

La germinación de la cepa mutada en el gen *SCO2730* (*copZ*) se analizó en medio R5A sin sacarosa, tanto sólido como líquido. En ambos casos se observó el retraso en la germinación. No obstante, la germinación se cuantificó en medio sólido, dada la facilidad de observar

las esporas individuales en estas condiciones (Fig. 37b). La germinación disminuyó notablemente en las esporas del mutante con respecto a la cepa silvestre ( $19,5 \pm 8\%$  en el mutante vs.  $100\%$  en el Wt, a las 8h) (Fig. 37a).



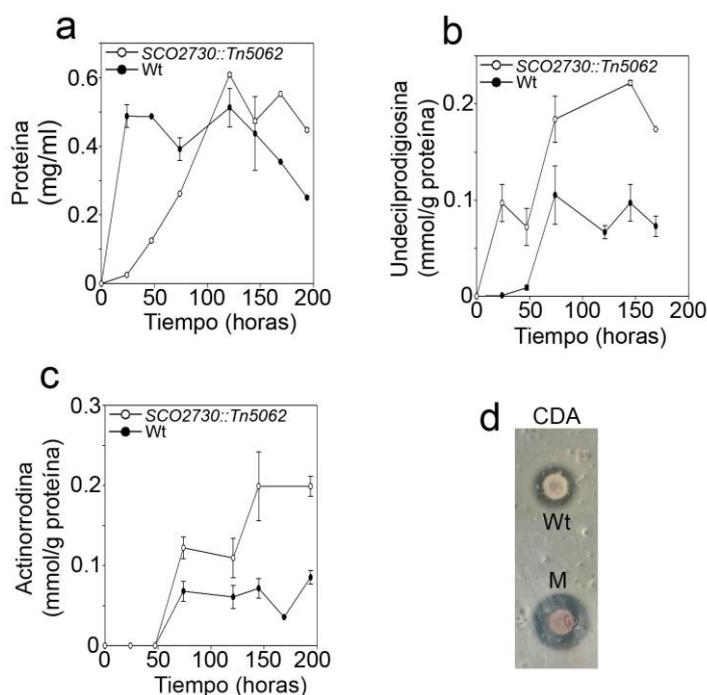
**Figura 37. Retraso en la germinación de las esporas en el mutante en *SCO2730* (*copZ*) en medio sólido R5A sin sacarosa.** (a) Porcentaje de germinación (promedio de tres réplicas  $\pm$  D.E.) en cultivos de 8 h de las cepas silvestre y mutante *SCO2730::Tn5062* de *S. coelicolor* M145. (b) Imágenes de microscopía confocal de muestras de cultivos de 8 h. Las muestras se tiñeron con SYTO9 (verde) y yoduro de propidio (rojo).



**Figura 38. Retraso en la esporulación del mutante en *SCO2730* (*copZ*) en medio sólido SFM.** Cultivos de 96 horas de las cepas silvestre (Wt) y mutante *SCO2730::Tn5062* (M) en medio sólido SFM.

### c) Análisis del crecimiento y la producción de antibióticos en el mutante en *SCO2730 (copZ)*

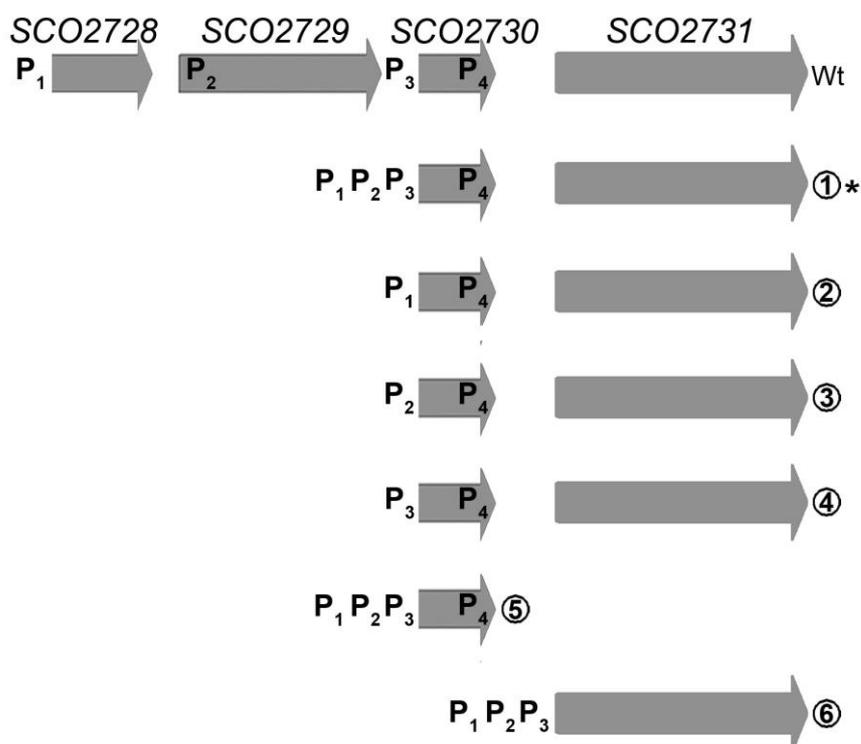
El crecimiento (en medio líquido R5A sin sacarosa) está muy retrasado en el mutante *SCO2730::Tn5062* comparado con la cepa silvestre (Fig. 39a). La producción de undecilprodigiosina y actinorrodina se duplica en la cepa mutante a las 24 h, con respecto a la cepa silvestre (Fig. 39b,c). Sorprendentemente, el mutante produce undecilprodigiosina desde la germinación, lo que indica que en esta cepa el metabolismo secundario está permanentemente activo (Fig. 39b). En cuanto a la producción del antibiótico dependiente de calcio (CDA), la producción es ligeramente mayor en el mutante *SCO2730::Tn5062* que en la cepa silvestre (Fig. 39d).



**Figura 39. Curva de crecimiento y análisis de la producción de antibióticos en el mutante en *SCO2730 (copZ)* en medio líquido R5A sin sacarosa. (a) Curva de crecimiento. (b) Producción de undecilprodigiosina. (c) Producción de actinorrodina. (d) Producción de CDA.**

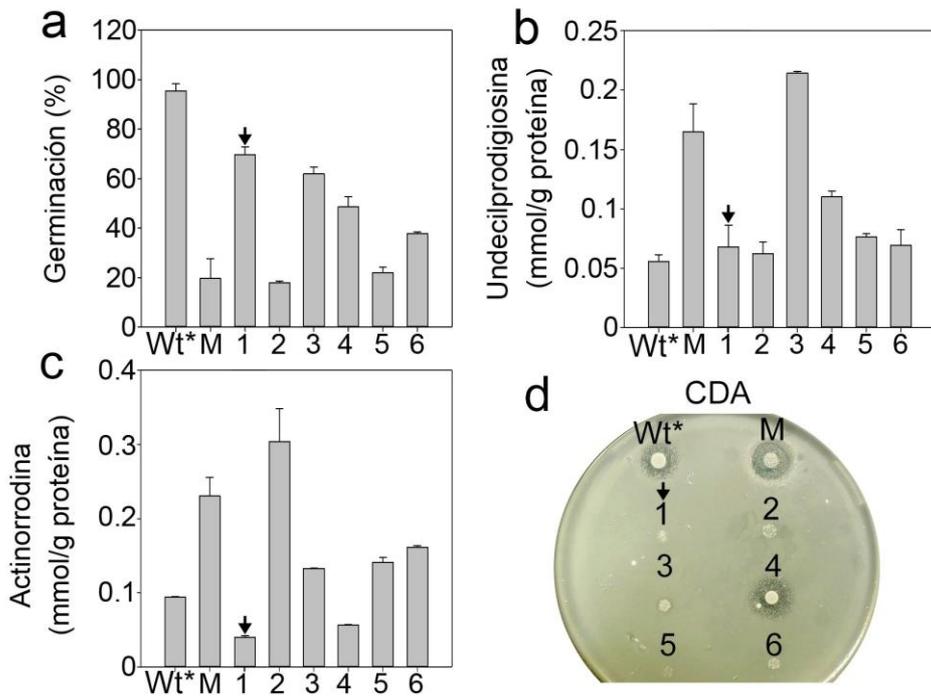
### III.3.3. Relación entre el fenotipo del mutante *SCO2730::Tn5062* y la expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731*

A continuación, procedimos a la identificación del gen (o los genes) responsable(s) de los fenotipos observados. Para ello, complementamos el mutante *SCO2730::Tn5062* con diferentes combinaciones de los tres promotores ubicados aguas arriba de *SCO2730* y con diferentes combinaciones de las ORFs de los genes *SCO2730* y *SCO2731* (Fig. 40). Para las complementaciones utilizamos el plásmido pNG3 (Gonzalez-Quinonez *et al.* 2016).



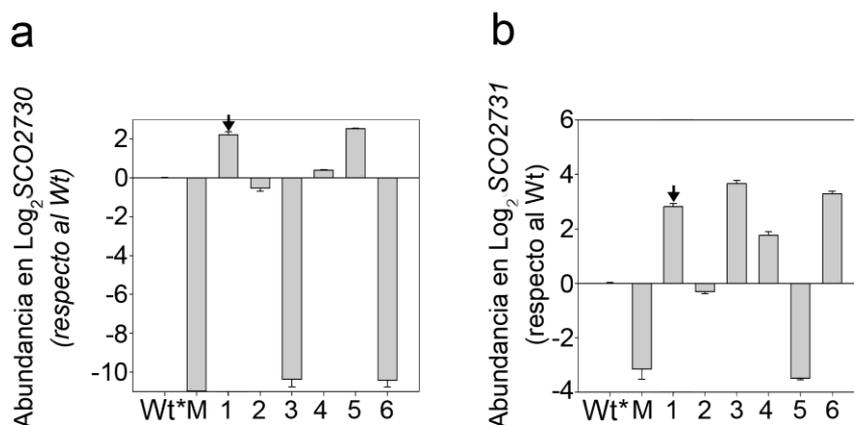
**Figura 40. Construcciones para la complementación del mutante en *SCO2730* (*copZ*).** Wt, cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. (1), construcción  $P_1 P_2 P_3$ .*SCO2730*.*SCO2731*, se señala con \* por ser la única cepa que restauró casi por completo el fenotipo de la cepa silvestre. (2)  $P_1$ .*SCO2730*.*SCO2731*. (3)  $P_2$ .*SCO2730*.*SCO2731*. (4)  $P_3$ .*SCO2730*.*SCO2731*. (5)  $P_1 P_2 P_3$ .*SCO2730*. (6)  $P_1 P_2 P_3$ .*SCO2731*. Todas las construcciones se clonaron en el vector pNG3.

La única cepa que complementó los fenotipos en germinación y producción de acinorrodina, undecilprodigiosina y CDA fue la cepa número 1, en la que introdujimos los tres promotores junto con los genes *SCO2730* y *SCO2731* (Fig. 40 y 41). No obstante, la complementación fue parcial, ya que no se restauró por completo el fenotipo de la cepa silvestre. El resto de las cepas tuvieron efecto sólo en la complementación de alguno de los fenotipos (Fig. 41).



**Figura 41. Germinación y producción de antibióticos en cepas de complementación del mutante en *SCO2730* (*copZ*).** Wt\*, *S. coelicolor*[pNG3]. M, mutante *SCO2730*:Tn5062. Cepas numeradas del 1 al 6 son las indicadas en la Fig. 38. (a) Porcentaje de germinación (promedio de tres réplicas  $\pm$  D.E.) en cultivos (8 h) en medio R5A sin sacarosa. (b) Producción de undecilprodigiosina en cultivos de 145 h en medio R5A sin sacarosa. (c) Producción de actinorrodina en cultivos de 145 h en medio R5A sin sacarosa. (d) Producción de antibiótico dependiente de calcio (CDA).

Posteriormente se analizó la expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731* en todas las cepas de complementación del mutante (Fig. 40), además de en el mutante *SCO2730:Tn5062* y en la cepa Wt. Se utilizaron las parejas de cebadores q2730F/q2730R y q2731F/q2731R (Tabla 10, apartado II.3.6) y muestras de ADNc obtenidas a partir de cultivos de 10 h en medio R5A sin sacarosa. Se comprobó que la expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731* no se restauró en ninguna de las cepas de complementación (Fig. 42) lo que sugiere la existencia de una regulación distinta a los tres promotores considerados en este trabajo.



**Figura 42. Análisis de expresión de *SCO2730* y *SCO2731* en cepas de complementación del mutante en *SCO2730* (*copZ*).** Datos obtenidos mediante qPCR, con ADNc de cultivos de 10 h en medio líquido R5A sin sacarosa. Wt\*, *S. coelicolor*[pNG3]. M, mutante *SCO2730:Tn5062*. Cepas numeradas del 1 al 6 son las indicadas en la Fig. 38 (a) Abundancia de transcritos del gen *SCO2730* en log<sub>2</sub> (cepa/wt) ± D.E. (b) Abundancia de transcritos del gen *SCO2731* en log<sub>2</sub> (cepa/wt) ± D.E.

Cabe destacar que, el gen *SCO2731* se sobreexpresó en todas las cepas que complementaron la germinación, cepas 1, 3, 4 y 6 (Fig. 40, 41a y 42b). Este gen codifica un posible transportador de cobre de tipo

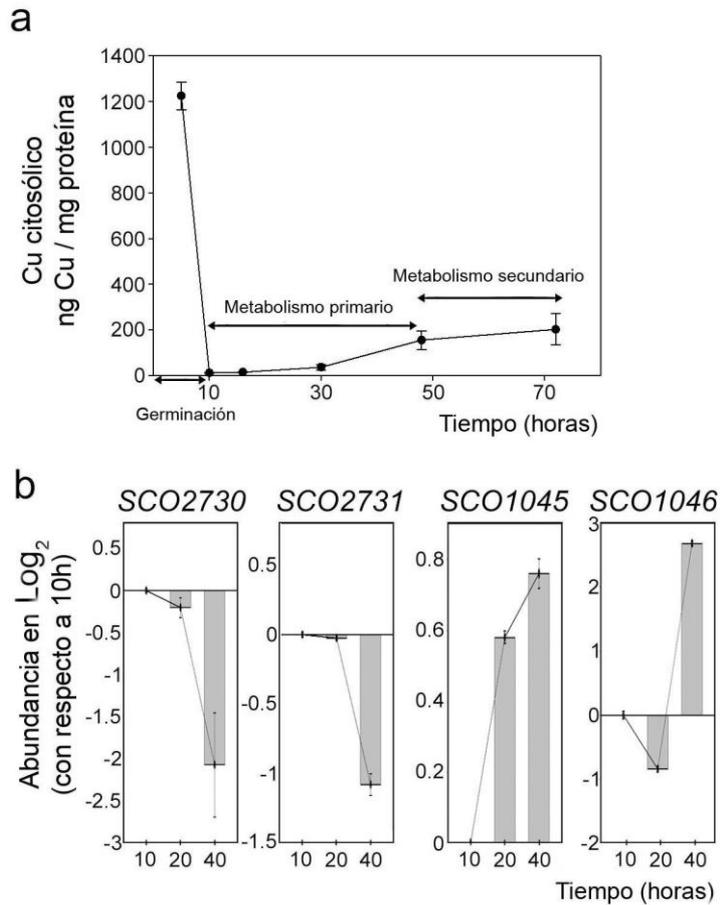
CopA que, tal como se discutirá más adelante, reduce los altos niveles de cobre en el citosol de la cepa mutante responsables del fenotipo observado.

### **III.3.4. Papel de las proteínas SCO2730 (CopZ) y SCO2731 (CopA) en la secreción de cobre durante la germinación**

Como se ha mencionado anteriormente, el gen *SCO2731* codifica un posible transportador de cobre de tipo CopA (ATPasa P<sub>1</sub>) el cual se ha postulado que exporta el cobre recibido por la chaperona de cobre de tipo CopZ codificada por el gen *SCO2730* (Dwarakanath *et al.* 2012). En vista de las posibles funciones de estos genes, decidimos analizar la concentración de cobre citosólico (Fig. 43a) y también la expresión (Fig. 43b) de los dos sistemas de secreción de cobre predichos en *S. coelicolor* (*SCO2730/2731* y *SCO1045/1046*) (Dwarakanath *et al.* 2012), durante la germinación y el desarrollo. Los análisis de expresión se llevaron a cabo mediante la técnica de qPCR, utilizando los cebadores indicados en la Tabla 10 (apartado II.3.6) y ADNc provenientes de muestras de cultivos de 10 h en medio R5A sin sacarosa.

El cobre citosólico disminuyó rápidamente durante la germinación (Fig. 43a). A las 10 horas observamos los máximos niveles de expresión de los genes *SCO2730/2731* (Fig. 43b), coincidiendo con los niveles más bajos de cobre citosólico (Fig. 43a) y con los menores niveles de expresión del gen *SCO1045* (Fig. 43b). Estos resultados indican que, el sistema chaperona/transportador *SCO2730/2731* tiene un papel fundamental en el transporte de cobre durante la germinación de *S. coelicolor*, mientras que el sistema *SCO1045/1046* parece tener una

función en la regulación de los niveles citosólicos de cobre durante los estadios posteriores del desarrollo.

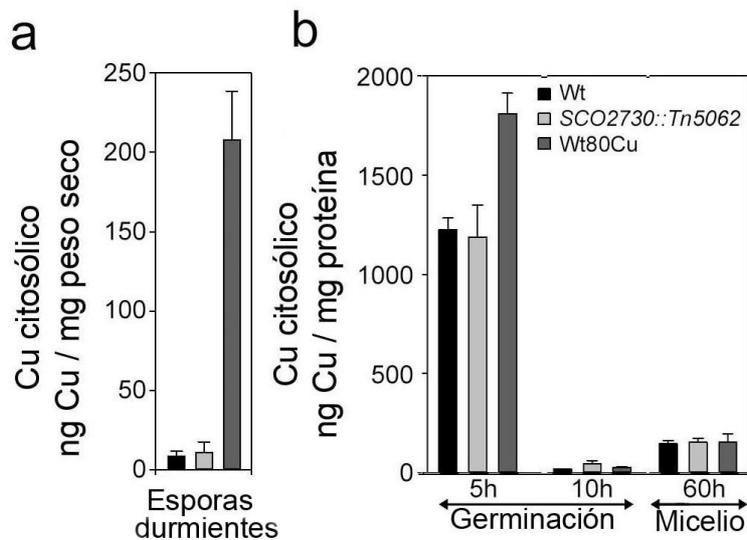


**Figura 43. Relación entre el cobre citosólico, la germinación y la expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731* en medio líquido R5A sin sacarosa.** (a) Concentración de cobre citosólico en la cepa silvestre de *S. coelicolor*. (b) Datos de expresión génica (qPCR) de los genes *SCO2730*, *SCO2731*, *SCO1045*, y *SCO1046* en cultivos de 10, 20 y 40 h. Los valores de abundancia se expresan como  $\log_2$  (tiempo/10h)  $\pm$  D.E. en relación a los datos de 10 horas.

Posteriormente, analizamos la concentración de cobre citosólico en esporas durmientes, esporas germinadas y micelio del mutante *SCO2730::Tn5062* y la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. Dentro de la

cepa silvestre, analizamos dos tipos de esporas: las obtenidas de cultivos sólidos en SFM (esporas Wt) y las obtenidas de cultivos sólidos en SFM suplementado con  $80 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (esporas Wt80Cu). La germinación se realizó en medio líquido (R5A sin sacarosa).

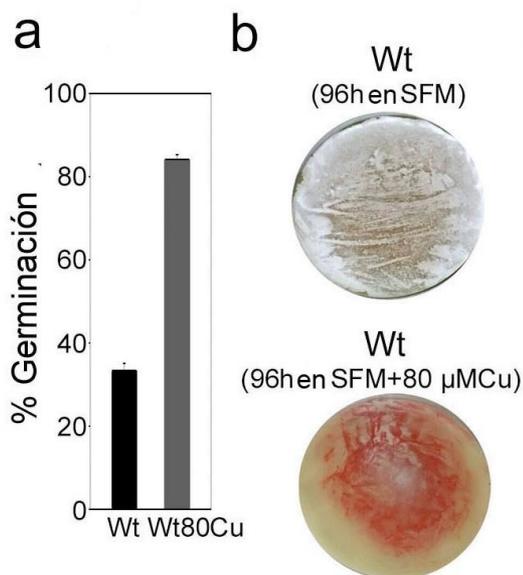
La concentración de cobre citosólico fue similar en las esporas durmientes del mutante *SCO2730::Tn5062* y las esporas durmientes de la cepa Wt ( $11 \pm 6$  y  $8,5 \pm 3$  ng Cu/mg peso seco, respectivamente), pero fue considerablemente más alta en las esporas Wt80Cu ( $208 \pm 30$  ng Cu/mg peso seco; 24 veces la concentración de cobre de las esporas Wt) (Fig. 44a).



**Figura 44. Concentración de cobre citosólico en esporas durmientes, esporas germinadas y micelio de las cepas silvestre (Wt), mutante *SCO2730::Tn5062*, y cepa silvestre obtenida de un medio con  $80 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu) en medio líquido R5A sin sacarosa. (a) Cobre citosólico en esporas durmientes. (b) Concentración de cobre en esporas en fase de germinación (5 y 10 horas) y en el micelio (60 h).**

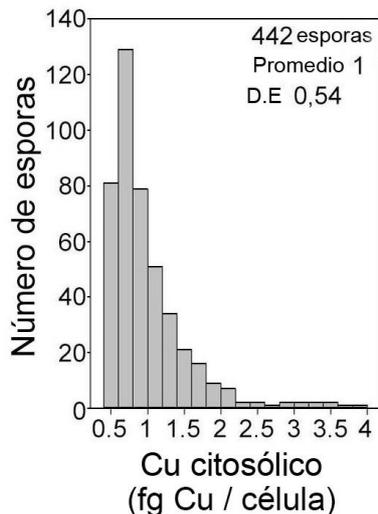
En los cultivos de las cepas Wt y Wt80Cu, la concentración de cobre citosólico disminuyó notablemente durante la germinación. En la cepa Wt, la concentración de cobre a las 10 horas fue 66 veces menor que la de las 5 horas, y en la cepa Wt80Cu este factor de disminución fue de 70 veces (Fig. 44b). Sin embargo, tal descenso fue menos acentuado en el mutante *SCO2730::Tn5062*, donde la concentración de cobre intracelular fue 26 veces menor a las 10 horas que a las 5 horas (Fig. 44b).

El contenido de cobre citosólico fue similar en el micelio del mutante *SCO2730::Tn5062* ( $153 \pm 20$  ng Cu/mg proteína) y los de la cepa silvestre, tanto en los cultivos inoculados con esporas Wt como en los inoculados con esporas Wt80Cu ( $145,7 \pm 18$  y  $155,4 \pm 41$  ng Cu/mg proteína, respectivamente) (Fig. 44b). Curiosamente, la germinación de las esporas Wt80Cu fue más rápida que la de las esporas Wt (Fig. 45a). Por otra parte, la esporulación de la cepa Wt se retrasó en medio SFM suplementado con  $80 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , con respecto a su esporulación en SFM sin cobre añadido (Fig. 45b), confirmando que el cobre afecta la regulación de la esporulación en *Streptomyces*, como ya habían demostrado otros autores (Ueda *et al.* 1997; Keijser *et al.* 2000).



**Figura 45. Fenotipo y contenido de cobre citosólico en esporas de *S. coelicolor* procedentes de medio SFM + 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .** (a) Porcentaje de germinación (promedio  $\pm$  D.E.) en muestras de cultivos de 6 h en medio sólido R5A sin sacarosa. (b) Esporulación de la cepa Wt en medio sólido SFM y SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .

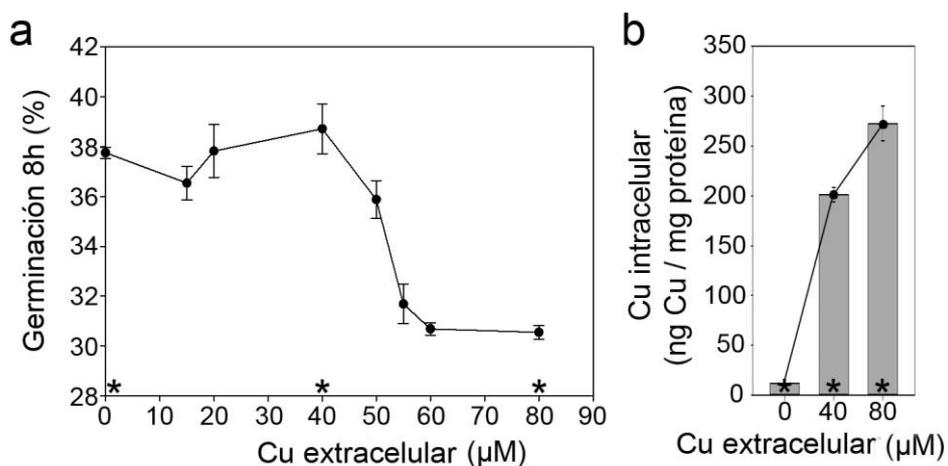
Con el fin de ampliar nuestro entendimiento sobre la relación entre el cobre y la germinación de las esporas, evaluamos el contenido de cobre citosólico en esporas individuales (Fig. 46). El cobre citosólico de las esporas del mutante *SCO2730::Tn5062* y del Wt no alcanzó el umbral de sensibilidad del equipo utilizado, por lo que no pudimos determinarlo. Sin embargo, logramos cuantificar el cobre citosólico en las esporas Wt80Cu (Fig. 46). La concentración de cobre citosólico dentro de la población de esporas Wt80Cu tenía una gran variabilidad, donde la menor concentración de cobre registrada fue 0,51 fg Cu/espora y la mayor fue 3,83 fg Cu/espora (Fig. 46).



**Figura 46. Contenido de cobre citosólico en esporas de *S. coelicolor* obtenidas de medio SFM + 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .** Concentración de cobre citosólico en esporas individuales de la cepa Wt crecida en 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .

### III.3.5. Función del cobre citosólico en la germinación de las esporas

Los resultados anteriores demuestran el efecto de los genes *SCO2730* y *SCO2731* en el control de la concentración de cobre citosólico y en la germinación. El paso siguiente que nos planteamos, fue estudiar el efecto del cobre en la germinación de las esporas. La germinación se retrasó en cultivos en medio R5A sin sacarosa suplementados con cobre, en concentraciones superiores a 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 47a). Tal como era de esperar, el cobre citosólico aumentó al añadir cobre al medio de cultivo, pero no en una relación 1:1. Un incremento del doble en el cobre extracelular (de 40 a 80  $\mu\text{M}$ ) se correlacionó con un aumento de 1,3 veces en el cobre citosólico (de  $201,3 \pm 7,4$  a  $272,5 \pm 38,8$  ng Cu/mg proteína) (Fig. 47b).

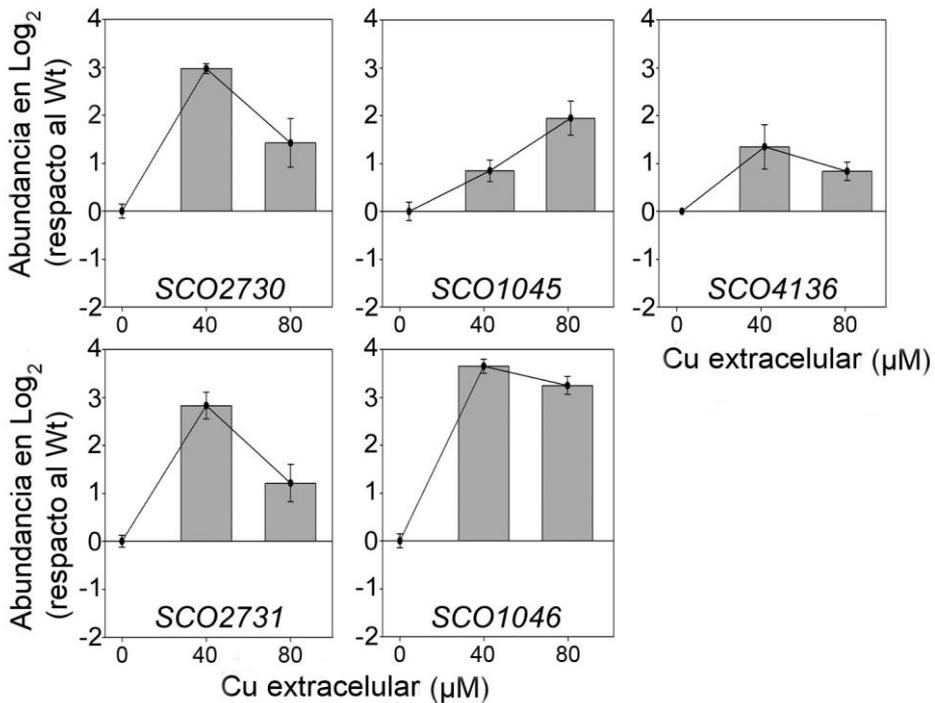


**Figura 47. Efecto de la concentración de cobre extracelular en la germinación y en la concentración de cobre citosólico en medio líquido R5A sin sacarosa.** (a) Porcentaje de germinación (promedio de tres réplicas  $\pm$  D.E.) en cultivos de 8 h, de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. (b) Concentración de cobre citosólico en cultivos de 10 h de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 con 40 y 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  añadido al medio de cultivo.

Con la intención de conocer más acerca del mecanismo biomolecular que regula la concentración de cobre citosólico durante la germinación, comparamos la expresión de los dos sistemas de exporte de cobre identificados en *S. coelicolor* (*SCO2730/2731* y *SCO1045/1046*) (Dwarakanath *et al.* 2012) durante la germinación en cultivos suplementados con cobre (con 40 y 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$ ) (Fig. 48). La máxima expresión del sistema *SCO2730/2731* se alcanzó con los niveles de cobre más bajos, mientras que la máxima expresión del sistema *SCO1045/1046* se alcanzó con los niveles más altos de cobre (Fig. 47b y 48).

También analizamos la expresión, durante la germinación en cultivos suplementados con cobre (con 40 y 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$ ) de *CsoR* (*SCO4136*), el represor transcripcional que modula la expresión de los

genes *SCO2730/2731*, *SCO1045/1046* y la de su propio gen (*Dwarakanath et al.* 2012) (Fig. 48). Encontramos que, la expresión del gen *csor* aumenta cuando la concentración de cobre extracelular es de 40 u 80  $\mu\text{M}$  (Fig. 48) y, por tanto, ha aumentado la concentración de cobre citósolico (Fig. 47b). Esto no es de extrañar, dado que el cobre se une al CsoR impidiendo su interacción con el ADN, lo que permite que se active la expresión de genes antes reprimidos por CsoR, incluyendo el gen *csor* (*Dwarakanath et al.* 2012). A diferencia de los sistemas *SCO2730/2731* y *SCO1045/1046*, la expresión de *csor* fue similar en los cultivos suplementados con 40 y 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 48).



**Figura 48.** Análisis de la expresión (qPCR) de los genes *SCO2730/2731*, *SCO1045/1046* y *SCO4136* en cultivos de 10 h de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145 en medio líquido R5A sin sacarosa suplementados con 0, 40 u 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Abundancia de los transcritos de los genes *SCO2730*, *SCO2731*, *SCO1045*, y *SCO1046* expresada como  $\log_2$  (muestra/0  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ )  $\pm$  D.E.

### **III.3.6. Comparación de los transcriptomas del mutante *SCO2730::Tn5062* y la cepa silvestre de *S. coelicolor* (esporas Wt y Wt80Cu) durante la germinación**

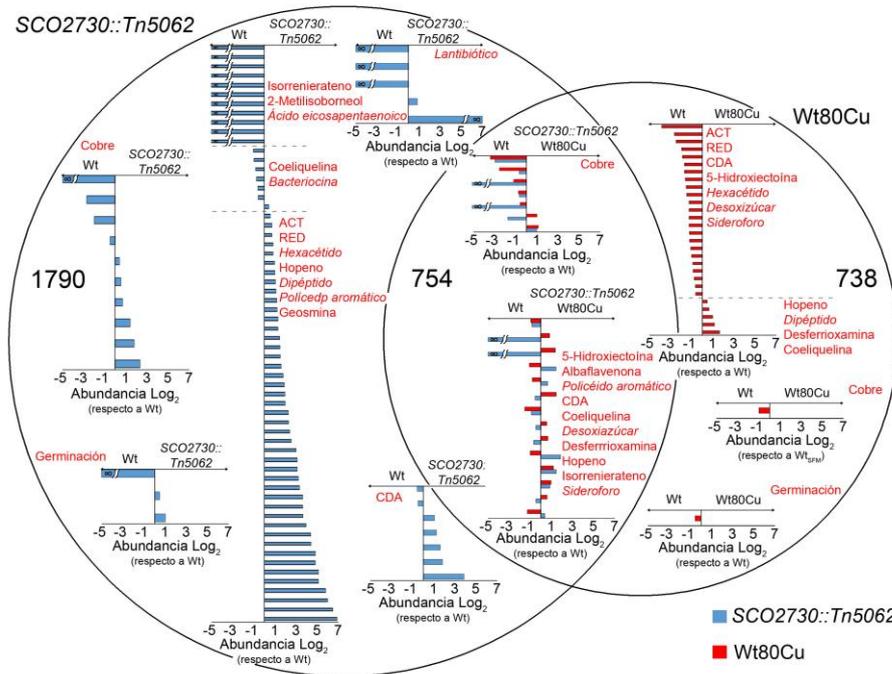
Con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos biomoleculares que regulan los fenotipos observados durante la germinación de las esporas del mutante *SCO2730::Tn5062* (retraso en la germinación) y las esporas de la cepa silvestre obtenidas en medios suplementados con cobre (cepa Wt80Cu, adelanto en la germinación), comparamos los transcriptomas de estas cepas, con el de la cepa silvestre (cepa Wt) durante la germinación (cultivos de 10 horas) en medio R5A sin sacarosa. Los valores de abundancia se normalizaron frente a la cepa silvestre como el  $\log_2(\text{SCO2730::Tn5062 o Wt80Cu} / \text{Wt})$ . Los siguientes transcritos tuvieron diferencias significativas (q-valor menor a 0,05) en las cepas *SCO2730::Tn5062* y Wt80Cu comparados con la cepa silvestre: 1790 en el mutante *SCO2730::Tn5062*, 738 transcritos en la cepa Wt80Cu y 754 mostraron diferencias significativas en ambas cepas (Fig. 49).

#### **a) Diferencias entre los transcriptomas de las cepas *SCO2730::Tn5062* y Wt**

Dentro de los 1790 genes que se expresan diferencialmente en el mutante *SCO2730::Tn5062* con respecto a la cepa Wt, se encuentran genes relacionados con el metabolismo secundario, con la germinación de las esporas y genes que codifican proteínas relacionadas con el cobre (transportadores de cobre, enzimas que usan cobre como

## Resultados

cofactor, proteínas cuyos genes son regulados por cobre) (Fig. 49; Tabla 12).



**Figura 49.** Transcriptomas del mutante en *SCO2730* (*copZ*) y la cepa *Wt80Cu* comparados con la cepa *Wt* en cultivos de 10 h, en medio líquido R5A sin sacarosa. Diagrama de Venn mostrando los genes diferencialmente expresados ( $q$ -valor  $< 0,05$ ) en el mutante *SCO2730::Tn5062* (en azul) y en la cepa silvestre obtenida de un medio con  $80 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (*Wt80Cu*; en rojo) con respecto a la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. La abundancia de los transcritos se muestra como el  $\log_2$  (*SCO2730::Tn5062* o *Wt80Cu* / *Wt*).

**Tabla 12. Valores de abundancia de los transcritos en las cepas Wt80Cu y silvestre de *S. coelicolor* M145 durante la germinación (10 horas) en cultivos en R5A sin sacarosa.** Se muestra la abundancia de los transcritos descritos en resultados. Los valores de abundancia mostrados son significativos (q-valor menor a 0,05). Los datos del transcriptoma completo se encuentran en la Tabla Suplementaria S1.

| <b>Función</b>                    | <b>Número SCO</b> | <b>Descripción</b>  | <b>Abundancia Log<sub>2</sub> (SCO2730::Tn5062 /Wt)</b> |
|-----------------------------------|-------------------|---|---|
| Genes relacionados con cobre      | SCO1046           | Transportador de cobre, CopA  | 1,4   |
|                                   | SCO2731           | Transportador de cobre, CopA  | -2,7  |
|                                   | SCO3440           | Posible oxidasa de de unión al cobre  | 0,7   |
|                                   | SCO4137           | Posiblemente reprimido por CsoR   | -0,5  |
|                                   | SCO4586           | Transportador de tipo ABC implicado en la maduración de una enzima multicobre | 0,5   |
|                                   | SCO7234           | Citocromo c oxidasa   | -2  |
|                                   | SCO7265           | Posiblemente reprimido por CsoR   | a   |
| Genes corriente arriba de SCO2730 | SCO2728           | Posible regulador transcripcional dependiente de zinc                         | 2,4   |
|                                   | SCO2729           | Posible acetiltransferasa   | 2,2   |
| Germinación                       | SCO4002           | <i>NepA</i>   | 1   |
|                                   | SCO3098           | <i>RpfC</i>   | 0,4   |
|                                   | SCO7458           | <i>RpfE</i>   | a   |
| Metabolismo secundario            | SCO0124           | Biosíntesis de ácido eicosapentaenoico  | a   |
|                                   | SCO0126           |   | a   |
|                                   | SCO0127           |   | a   |
|                                   | SCO0129           |   | a   |
|                                   | SCO0186           | Biosíntesis de isorrenierateno  | a   |
|                                   | SCO0187           |   | a   |
|                                   | SCO0188           |   | a   |
|                                   | SCO0189           |   | a   |
|                                   | SCO0190           |   | a   |
| SCO0267                           | Biosíntesis de    | a   |   |

## Resultados

|                |                                     |                              |      |
|----------------|-------------------------------------|------------------------------|------|
| <i>SCO0269</i> | lantibiótico                        | a                            |      |
| <i>SCO0270</i> |                                     | a                            |      |
| <i>SCO0490</i> | Biosíntesis de coeliquelina         | -0,6                         |      |
| <i>SCO0491</i> |                                     | -0,6                         |      |
| <i>SCO0496</i> |                                     | -1                           |      |
| <i>SCO0497</i> |                                     | -1                           |      |
| <i>SCO0499</i> |                                     | -0,8                         |      |
| <i>SCO0756</i> |                                     | Biosíntesis de bacteriocina  | -0,8 |
| <i>SCO1271</i> | Biosíntesis de policétido aromático | 0,8                          |      |
| <i>SCO1909</i> | Posible monooxigenasa               | 1,1                          |      |
| <i>SCO3216</i> | Biosíntesis de CDA                  | -0,6                         |      |
| <i>SCO3217</i> |                                     | 1                            |      |
| <i>SCO3220</i> |                                     | -0,5                         |      |
| <i>SCO3222</i> |                                     | 1,8                          |      |
| <i>SCO3236</i> |                                     | 3,8                          |      |
| <i>SCO3247</i> |                                     | 1,2                          |      |
| <i>SCO3248</i> |                                     | 1,6                          |      |
| <i>SCO3800</i> |                                     | Deshidrogenasa Acil-CoA      | 2    |
| <i>SCO5071</i> |                                     | Biosíntesis de actinorrodina | 3,7  |
| <i>SCO5072</i> | 3                                   |                              |      |
| <i>SCO5073</i> | 1,9                                 |                              |      |
| <i>SCO5074</i> | 2,6                                 |                              |      |
| <i>SCO5075</i> | 1,3                                 |                              |      |
| <i>SCO5076</i> | 0,4                                 |                              |      |
| <i>SCO5078</i> | 1,5                                 |                              |      |
| <i>SCO5080</i> | 2,3                                 |                              |      |
| <i>SCO5082</i> | 1,5                                 |                              |      |
| <i>SCO5083</i> | 4,4                                 |                              |      |
| <i>SCO5084</i> | 3,9                                 |                              |      |
| <i>SCO5085</i> | 3,6                                 |                              |      |
| <i>SCO5086</i> | 3,2                                 |                              |      |
| <i>SCO5087</i> | 2                                   |                              |      |
| <i>SCO5088</i> | 1,8                                 |                              |      |
| <i>SCO5090</i> | 2,3                                 |                              |      |
| <i>SCO5091</i> | 1,1                                 |                              |      |
| <i>SCO5092</i> | 1,2                                 |                              |      |
| <i>SCO5877</i> | Biosíntesis de undecilprodigiosina  |                              | 0,9  |
| <i>SCO5879</i> |                                     |                              | 1,3  |
| <i>SCO5890</i> |                                     | 0,6                          |      |

## Resultados

|  |                |                                  |     |
|--|----------------|----------------------------------|-----|
|  | <i>SCO5895</i> |                                  | 1,5 |
|  | <i>SCO6073</i> | Biosíntesis de geosmina          | 1,9 |
|  | <i>SCO6273</i> | Biosíntesis de hexacétido        | 3,7 |
|  | <i>SCO6274</i> |                                  | 3,1 |
|  | <i>SCO6275</i> |                                  | 4,8 |
|  | <i>SCO6276</i> |                                  | 6   |
|  | <i>SCO6277</i> |                                  | 1,6 |
|  | <i>SCO6278</i> |                                  | 5,1 |
|  | <i>SCO6279</i> |                                  | 5,8 |
|  | <i>SCO6280</i> |                                  | 2,4 |
|  | <i>SCO6281</i> |                                  | 4,8 |
|  | <i>SCO6282</i> |                                  | 6,9 |
|  | <i>SCO6283</i> |                                  | 6,5 |
|  | <i>SCO6284</i> |                                  | 5,1 |
|  | <i>SCO6286</i> |                                  | 3,4 |
|  | <i>SCO6287</i> |                                  | 4,4 |
|  | <i>SCO6288</i> |                                  | 3,1 |
|  | <i>SCO6430</i> | Biosíntesis de dipéptido         | 1,2 |
|  | <i>SCO6431</i> |                                  | 1   |
|  | <i>SCO6432</i> |                                  | 0,9 |
|  | <i>SCO6436</i> |                                  | 0,8 |
|  | <i>SCO6767</i> | Biosíntesis de hopeno            | 1   |
|  | <i>SCO6927</i> | Biosíntesis de lantibiótico      | 0,8 |
|  | <i>SCO6932</i> |                                  | b   |
|  | <i>SCO7700</i> | Biosíntesis de 2-metilisoborneol | b   |
|  | <i>SCO7701</i> |                                  | b   |

<sup>a</sup> Transcritos no detectados en el mutante *SCO2730::Tn5062*

<sup>b</sup> Transcritos no detectados en la cepa Wt

### **a.1) Genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios**

Los genes expresados al alza en el mutante *SCO2730::Tn5062* incluyen genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios conocidos (actinorrodina, undecilprodigiosina, hopeno, geosmina) (Nett *et al.* 2009), y también algunos que pertenecen a *clusters* de biosíntesis de metabolitos aún desconocidos (rutas crípticas) en *S. coelicolor* (hexacétido, dipéptido, policétidos aromáticos) (Nett *et al.* 2009). La mayoría de los genes que participan en la biosíntesis del antibiótico dependiente de calcio (CDA) también estuvieron regulados al alza en el mutante. Estos resultados tienen especial importancia dado que indican que el metabolismo secundario está muy adelantado en el mutante, comenzando a activarse durante la germinación.

Por otro lado, la expresión de los genes relacionados con la síntesis de 2-metilisoborneol, isorrenierateno, coeliquelina, ácido eicosapentaenoico, y bacteriocina está inhibida, con respecto al Wt, en el mutante *SCO2730::Tn5062*. Observamos la misma tendencia en los genes vinculados a la biosíntesis de lantibiótico, un posible metabolito secundario críptico en *S. coelicolor* (Fig. 49) (Tabla 12).

### **a.2) Genes cuya función está relacionada con el cobre**

Dentro de los transcritos regulados al alza en el mutante, también encontramos los de los genes: *SCO1046*, transportador de cobre CopA (Dwarakanath *et al.* 2012); *SCO4136*, regulador transcripcional CsoR (Dwarakanath *et al.* 2012); *SCO4586*, transportador de tipo ABC involucrado en la maduración de una enzima

multicobre (dominio conservado, número de acceso en la base de datos del NCBI: COG1277); y *SCO3440*, oxidasa multicobre (Worrall & Vijgenboom 2010). Al mismo tiempo, otros genes con funciones asociadas al cobre tuvieron menor expresión en el mutante: *SCO4137* y *SCO7265* (dos genes que probablemente están bajo el control transcripcional de CsoR) (Dwarakanath *et al.* 2012), *SCO7234* (subunidad I del complejo citocromo C oxidasa) (Fujimoto *et al.* 2016) y *SCO2731* (ATPasa CopA para el exporte de cobre) (Dwarakanath *et al.* 2012).

Como se comentó anteriormente, el gen *SCO2731* se expresa en el mutante *SCO2730::Tn5062* (amplicón 3 en Fig. 36), a partir del promotor ubicado dentro del ORF de *SCO2730* en dirección 3' a la inserción del transposón Tn5062. Sin embargo, la expresión de *SCO2731* es 6,5 veces menor que en el Wt (Tabla 12).

Curiosamente, los genes situados aguas arriba del gen mutado, como *SCO2728*, potencial regulador transcripcional con un posible dominio de unión al Zn<sup>2+</sup> (número de acceso PRK09514 en la *Conserved Domain Database* del NCBI) y *SCO2729* (potencial acetiltransferasa), están expresados al alza en el mutante (Tabla 12).

### **a.3) Genes relacionados con la germinación**

Los genes con expresión diferencial durante la germinación de las esporas del mutante y del Wt también incluyen tres genes relacionados con la germinación de las esporas: *nepA* (*SCO4002*) (de Jong *et al.* 2009) y *rpfC* (*SCO3098*) (Sexton *et al.* 2015), ambos regulados al alza en el mutante (Tabla 12); *rpfE* (*SCO7458*), que codifica una

hidrolasa de peptidoglicano clave en la germinación (Sexton *et al.* 2015), cuyo transcrito no se detectó en el mutante (Tabla 12), y por tanto, puede que contribuya al retraso en la germinación característico de esta cepa.

### **b) Diferencias entre los transcriptomas de las cepas Wt80Cu y Wt**

Los 738 genes diferencialmente expresados durante la germinación en la cepa Wt80Cu comparado con el Wt, incluyen genes vinculados al metabolismo secundario, y en menor medida, genes que codifican proteínas relacionadas con el cobre (Fig. 49) (Tabla 13).

#### **b.1) Genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios**

En las esporas del Wt80Cu disminuye la expresión de la mayoría de los genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Entre estos genes se encuentran los referentes a la síntesis de actinorrodina, undecilprodigiosina, CDA, 5-hidroxiectoína, hexacétido, desoxiazúcar y sideróforo. Otros genes cuya expresión se reduce en la cepa Wt80Cu son: *SCO6710*, glicosil hidrolasa posiblemente reprimida por CsoR (Dwarakanath *et al.* 2012); y *SCO3571*, homólogo de la proteína receptora de AMP cíclico, cuya mutación disminuye la germinación de las esporas (Derouaux *et al.* 2004).

**Tabla 13. Valores de abundancia de los transcritos en las cepas Wt80Cu y silvestre de *S. coelicolor* M145 durante la germinación (10 horas) en cultivos en R5A sin sacarosa.** Se muestra la abundancia de los transcritos descritos en Resultados. Los valores de abundancia mostrados son significativos (q-valor menor a 0,05); las variaciones no significativas con respecto a la cepa Wt se muestran como n.s. Los datos del transcriptoma completo se encuentran en la Tabla Suplementaria S1.

| Función                      | Número SCO           | Descripción                                      | Abundancia Log <sub>2</sub> (Wt80Cu /Wt) |
|------------------------------|----------------------|--|--|
| Genes relacionados con cobre | SCO2730              | Chaperona de cobre, CopZ                         | n.s.                                     |
|                              | SCO2731              | Transportador de cobre, CopA                     | n.s.                                     |
|                              | SCO1045              | Chaperona de cobre, CopZ                         | n.s.                                     |
|                              | SCO1046              | Transportador de cobre, CopA                     | n.s.                                     |
|                              | SCO6710              | Posible glicosil hidrolasa reprimida por CsoR    | -1                                       |
|                              | SCO4136              | CsoR   | n.s.                                     |
| Germinación                  | SCO3571              | Homólogo de la proteína receptora de AMP cíclico | -0,6                                     |
| Metabolismo secundario       | SCO0381              | Sintasa de desoxiazúcar                          | -1,5                                     |
|                              | SCO0382              |  | -1,3                                     |
|                              | SCO0384              |  | -1,9                                     |
|                              | SCO0385              |  | -1,3                                     |
|                              | SCO0386              |  | -0,9                                     |
|                              | SCO0387              |  | -1,7                                     |
|                              | SCO0388              |  | -1                                       |
|                              | SCO0389              |  | -1,1                                     |
|                              | SCO0395              |  | -2,5                                     |
|                              | SCO0397              |  | -1,6                                     |
|                              | SCO0399              |  | -1,5                                     |
|                              | SCO0493              | Biosíntesis de coeliquelina                      | 0,5                                      |
|                              | SCO1864              | Biosíntesis de 5-hidroxiectoína                  | -0,8                                     |
|                              | SCO1865              |  | -1,2                                     |
|                              | SCO1866              |  | -1,2                                     |
|                              | SCO2783              | Biosíntesis de desferroxiamina                   | 1  |
|                              | SCO2785              |  | 0,6                                      |
|                              | SCO3235              | Biosíntesis de CDA                               | -0,6                                     |
| SCO3774                      | Proteína relacionada | -0,8   |  |

## Resultados

|  |                | con beta-lactamasa          |      |
|--|----------------|-----------------------------|------|
|  | <i>SCO5800</i> | Biosíntesis de sideróforo   | -1,3 |
|  | <i>SCO5881</i> | Biosíntesis de prodigiosina | -0,7 |
|  | <i>SCO6275</i> | Biosíntesis de hexacétido   | -0,9 |
|  | <i>SCO6277</i> |                             | -1,3 |
|  | <i>SCO6279</i> |                             | -1,7 |
|  | <i>SCO6280</i> |                             | -2   |
|  | <i>SCO6282</i> |                             | -3,8 |
|  | <i>SCO6283</i> |                             | -2,6 |
|  | <i>SCO6437</i> | Biosíntesis de dipéptido    | 1,1  |
|  | <i>SCO6770</i> | Biosíntesis de hopeno       | 1,6  |

La expresión de genes implicados en la biosíntesis de hopeno, desferrioxamina, coeliquelina y dipéptido, aumenta ligeramente en las esporas de la cepa Wt80Cu respecto a la cepa silvestre (Tabla 13).

### **b.2) Genes cuya función está relacionada con el cobre**

La variación en la expresión del gen *csor* durante la germinación de las esporas de la cepa Wt80Cu comparada con la cepa Wt no es significativa (Tabla 13). En consecuencia, con niveles de cobre citosólico tan altos como los de esta cepa (Fig. 44a) aún puede haber expresión del represor *csor*. Esto sugiere que hay un mecanismo independiente de CsoR que controla, al menos en parte, la rápida germinación de las esporas de la cepa Wt80Cu (Fig. 45a).

Es especialmente relevante que, la expresión de ninguno de los genes que codifican los dos sistemas transportadores de cobre descritos en *S. coelicolor* (*SCO1045/1046* y *SCO2730/2731*)

(Dwarakanath *et al.* 2012) tuvo diferencias significativas en las esporas del Wt80Cu en comparación con las esporas del Wt (Tabla 13). Esto indica que los niveles de expresión de estos genes en la cepa Wt son suficientes para reducir el cobre citosólico durante la germinación de las esporas en la cepa Wt80Cu (Fig. 44b).

### **c) Genes diferencialmente expresados en las cepas *SCO2730::Tn5062* y Wt80Cu comparados con la cepa Wt**

Dentro de los 754 diferencialmente expresados tanto en las esporas germinativas del mutante *SCO2730::Tn5062* como en las de la cepa Wt80Cu, con respecto a las esporas del Wt, se incluyen genes relacionados con el metabolismo secundario y genes que codifican proteínas con función relacionada al cobre (Fig. 49) (Tabla 14).

Las variaciones en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo secundario, aunque significativas (q-valor menor de 0,05), no fueron especialmente relevantes (ninguno superó el doble de expresión al alza o a la baja,  $\log_2$  ratio en el intervalo -1/+1) (Tabla 14).

**Tabla 14. Valores de abundancia de transcritos con diferencias significativas (q-valor menor que 0,05) en las cepas mutante *SCO2730::Tn5062* y *Wt80Cu* comparadas con la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145 durante la germinación (10 horas), en cultivos en R5A sin sacarosa. Se muestra la abundancia de los transcritos descritos en resultados. Los valores de abundancia mostrados son significativos (q-valor menor a 0,05). Los datos del transcriptoma completo se encuentran en la Tabla Suplementaria S1.**

| Función                         | Número SCO     | Descripción                                    | Abundancia Log <sub>2</sub> ( <i>SCO2730::Tn5062</i> /Wt) | Abundancia Log <sub>2</sub> ( <i>Wt80Cu</i> /Wt) |
|---------------------------------|----------------|--|---|--|
| Genes relacionados con el cobre | <i>SCO0164</i> | Posible ATPasa transportadora de cationes      | a   | -1,2   |
|                                 | <i>SCO0860</i> | Posible ATPasa transportadora de cationes      | -0,7  | -0,7   |
|                                 | <i>SCO1044</i> | Posiblemente reprimido por CsoR                | 1   | 1,1  |
|                                 | <i>SCO3280</i> | Posiblemente reprimido por CsoR                | -0,7  | -2,5   |
|                                 | <i>SCO3281</i> | Proteína de almacenamiento de cobre citosólico | -2,9  | -3,3   |
|                                 | <i>SCO6460</i> | Posible ATPasa transportadora de cationes      | -1,7  | 1  |
|                                 | <i>SCO7657</i> | Posible proteína secretada de unión al cobre   | a   | -0,6   |
| Metabolismo secundario          | <i>SCO0185</i> | Biosíntesis de isorrenierateno                 | a   | 1,4  |
|                                 | <i>SCO0191</i> |  | a   | 0,8  |
|                                 | <i>SCO0396</i> | Desoxiazúcar sintasa                           | -0,9  | -1,5   |
|                                 | <i>SCO0494</i> | Biosíntesis de coeliquelina                    | -0,5  | 0,5  |
|                                 | <i>SCO0495</i> |  | -0,7  | 0,6  |
|                                 | <i>SCO1265</i> | Biosíntesis de policétido aromático            | 0,8   | 0,9  |
|                                 | <i>SCO1867</i> | Biosíntesis de 5-hidroxiectoina                | 0,4   | -1,3   |
|                                 | <i>SCO2782</i> | Biosíntesis de                                 | -0,6  | 1,4  |

## Resultados

|  |                | desferroxiamina              |      |      |
|--|----------------|------------------------------|------|------|
|  | <i>SCO3218</i> | Biosíntesis de               | 1,8  | -1   |
|  | <i>SCO3221</i> | CDA                          | 1,4  | 1,2  |
|  | <i>SCO5223</i> | Biosíntesis de albaflavenona | -0,5 | 0,6  |
|  | <i>SCO5799</i> | Biosíntesis de sideróforo    | -0,9 | -1   |
|  | <i>SCO6766</i> | Biosíntesis de               | 0,6  | -0,8 |
|  | <i>SCO6768</i> | hopeno                       | 1,4  | -1,1 |

<sup>a</sup> Transcritos no detectados en el mutante *SCO2730::Tn5062*

Las variaciones más relevantes se dieron en los genes que codifican proteínas relacionadas con el cobre: *SCO1044* y *SCO3280*, cuya expresión probablemente está modulada por CsoR (Dwarakanath *et al.* 2012); *SCO0164*, *SCO0860*, y *SCO6460*, potenciales ATPasas transportadoras de cationes (Dwarakanath *et al.* 2012); *SCO3281*, proteína citosólica de almacenamiento de cobre (Straw *et al.* 2018); *SCO7657*, posible proteína secretada de unión al cobre (Worrall & Vijgenboom 2010). Sorprendentemente, los genes *SCO0164* y *SCO7657* no se expresaron (al menos a niveles detectables en nuestro experimento de *RNAseq*) en el mutante *SCO2730::Tn5062*. La expresión de la mayoría de estos genes relacionados con el cobre está inhibida en la cepa *Wt80Cu*, lo que apoya la hipótesis de que las altas concentraciones de cobre citosólico presentes en las esporas de esta cepa, reprimen la expresión de genes que codifican chaperonas, transportadores, enzimas u otras proteínas relacionadas con cobre de manera independiente de CsoR, ya que como se apuntó antes, la variación de la expresión del gen *csoR*, comparado con la cepa silvestre, no es significativa (Tabla 13).

# DISCUSIÓN



#### **IV.1. La cepa de *S. coelicolor* afectada en la expresión de los genes *SCO2730* (*copZ*) y *SCO2731* (*copA*) tiene alterada la germinación, el crecimiento y el metabolismo secundario**

El primer objetivo de esta tesis (profundizar en la caracterización de genes que formen parte de las rutas biomoleculares que regulan los procesos de diferenciación y MCP en *Streptomyces*) se abordó construyendo 8 mutantes en genes que habían sido detectados diferencialmente expresados durante el desarrollo (Manteca *et al.* 2010a; Yague *et al.* 2013b), y analizando sus correspondientes fenotipos (objetivo 1) (Tabla 11). La cepa mutada en el gen *SCO2730*, fue la que mostró el fenotipo más interesante: retraso en la germinación y el crecimiento; un adelanto dramático en el metabolismo secundario, desde la fase de germinación (Fig. 37, 38 y 39).

#### **IV.2. Los plásmidos pNG1-4 no afectan el fenotipo de *S. coelicolor* al integrarse en el cromosoma**

Una vez observados los fenotipos del mutante *SCO2730*, lo primero que necesitamos fue abordar la complementación del mismo, con el fin de comprobar el gen o genes, responsable/s de los fenotipos observados. Para ello decidimos usar un plásmido integrativo. Descartamos el uso de los plásmidos que portan el sitio de integración del fago  $\Phi$ C31, ya que se ha demostrado que pueden integrarse en diferentes posiciones del genoma de *Streptomyces*, lo que conlleva distintas mutaciones y fenotipos (Combes *et al.* 2002). Por ello, probamos el plásmido pMS82 que porta el sitio de integración del fago  $\phi$ BT1, y cuya integración en el cromosoma de

*S. coelicolor* se había descrito que no producía fenotipo (Gregory *et al.* 2003). Para nuestra sorpresa, detectamos que la integración del plásmido pMS82 en el cromosoma de *S. coelicolor* producía un retraso muy importante en la germinación. Decidimos dedicar la primera parte de esta tesis doctoral a la creación de plásmidos integrativos con efecto neutro en el fenotipo de *S. coelicolor* (objetivo 2). De esta manera, obtendríamos una herramienta que podría utilizarse tanto para la complementación de mutantes como para evaluar la función de genes individuales o agrupaciones genéticas introducidas en *S. coelicolor*, sin obtener fenotipos adicionales a los generados por el material genético integrado.

Los sistemas de integración basados en  $\phi$ BT1 se han utilizado en diferentes especies de *Streptomyces* (Gregory *et al.* 2003): *S. avermitilis*, *S. cinnamonensis*, *S. fradiae*, *S. lincolnensis*, *S. nogalater*, *S. roseosporus*, *S. venezuelae*, *S. coelicolor*, y *S. lividans*; así como también en células de mamíferos y para el ensamblaje de ADN *in vitro* (Zhang *et al.* 2013) sitio *attB* de integración del fago  $\phi$ BT1 en el genoma de *Streptomyces* se encuentra en el ORF del gen *SCO4848* (genoma de *S. coelicolor*), el cual codifica una proteína integral de membrana (Gregory *et al.* 2003). Se ha demostrado la existencia de sitios pseudo-*attB* y pseudo-*attP* en genomas de ratón y humano (Zhang *et al.* 2008). Sin embargo, en *Streptomyces*, aunque se asume que el sitio de integración es único, no hay ningún trabajo que lo demuestre experimentalmente. En esta tesis demostramos, en 24 integraciones independientes (Fig. 17b), que los plásmidos pMS82 y sus derivados (pNG1-pNG4) se integran en el gen *SCO4848*, lo que sugiere que efectivamente, éste es el único sitio  $\phi$ BT1-*attB* en el genoma de *S. coelicolor*.

De acuerdo a lo publicado por Gregory *et al.* (2003), la integración de los plásmidos  $\phi$ BT1 en *SCO4848* no causa efecto en el fenotipo de *Streptomyces*, ya que sigue habiendo transcripción y el producto del gen (la proteína *SCO4848int1* en Fig. 16), aunque mutada en su extremo amino, conservaría su función. Al estudiar la integración del plásmido pMS82 en el gen *SCO4848* (Fig. 16) observamos que la región promotora del gen queda separada del ORF que codifica *SCO4848int1*, por lo que la transcripción a partir de esta ORF es poco factible. La otra ORF generada por la integración de  $\phi$ BT1, *SCO4848int2* (Fig. 16), es adyacente a la región promotora del gen *SCO4848* y su producto sólo conserva el 30% de los aminoácidos del extremo amino de la proteína que codifica el gen *SCO4848* (24 aminoácidos de 74). Este producto es el que podría ser el que conserva la función de la proteína *SCO4848*.

Tal como se apuntó arriba, en nuestros estudios encontramos que la integración de plásmidos basados en  $\phi$ BT1 genera un retraso muy significativo en la germinación de las esporas. Este fenotipo hizo que nos preguntáramos si el gen responsable del mismo era *SCO4848* o *SCO4849* (en dirección 3' del primero), dado que ambos genes están juntos y en la misma orientación en el genoma de *S. coelicolor*, y se podrían transcribir como un operón. De hecho, mediante RT-PCR demostramos que éste es el caso, ambos genes se transcriben juntos (Fig. 19b). En consecuencia, la integración de los plásmidos con el sitio de integración  $\phi$ BT1 en el gen *SCO4848* también afecta la expresión del gen *SCO4849*.

Dado que la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849* está afectada, es muy probable que el fenotipo en la germinación se deba a la alteración de la expresión de estos genes. Por ello, diseñamos dos

construcciones de complementación, incluyendo la región promotora aguas arriba del gen *SCO4848* junto con la ORF del gen *SCO4848* (construcción 1), y las ORFs de los genes *SCO4848* y *SCO4849* (construcción 2) (apartado II.2.5). La construcción con los dos genes fue inestable, debido a que probablemente el sitio *attB* del gen *SCO4848* introducido en el plásmido, aunque lo hayamos diseñado con mutaciones sinónimas, siga siendo funcional, produciendo las reorganizaciones que se observaron al introducir esta construcción en *E. coli* (Fig. 22). Sin embargo, la segunda construcción incluyendo el gen *SCO4849* restauraba el fenotipo en la germinación, demostrando que dicho fenotipo dependía de este gen. El gen *SCO4849* codifica una posible proteína integral de membrana, pero aún se desconoce el mecanismo mediante el que la proteína *SCO4849* participa en la regulación de la germinación de las esporas de *Streptomyces*.

La restauración del fenotipo silvestre modificando el plásmido pMS82 nos permitió construir pNG1, plásmido integrativo basado en  $\phi$ BT1 que incluye el promotor del gen *SCO4848* y, bajo su control, la ORF del gen *SCO4849*. Este plásmido, complementa el fenotipo observado en la germinación como consecuencia de la integración de  $\phi$ BT1 y representa una herramienta para la manipulación genética en *S. coelicolor*.

Para facilitar la expresión de genes heterólogos creamos el plásmido pNG2. Este plásmido, al igual que pNG1, tienen el marcador de resistencia a higromicina (Fig. 26) proveniente de pMS82. La resistencia a higromicina puede emplearse en *E. coli* y en *Streptomyces*. Sin embargo, en nuestros experimentos, observamos que al usarla para seleccionar las colonias de *E. coli* con el plásmido de interés, crecían también, aunque

más lento, colonias que no tenían el plásmido. Fue por esto que, decidimos incluir el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina en los plásmidos pNG3 y pNG4, derivados de pNG1 y pNG2, respectivamente.

Los genes *SCO4848* y *SCO4849* están conservados en estreptomicetos (Fig. 29 y 30). Nuestros resultados indican que, el retraso en la germinación de las esporas por la integración de plásmidos  $\Phi$ BT1 en *SCO4848* (*S. coelicolor*) y en sus ortólogos (Fig. 29), probablemente es común a todas las especies del género *Streptomyces*. Por ello, los plásmidos pNG1-pNG4 pueden ser herramientas de manipulación genética útiles en otras especies de *Streptomyces* además de en *S. coelicolor*. No obstante, dicha utilidad debe comprobarse en cada especie, ya que estos vectores no siempre complementan el fenotipo de retraso en la germinación y pudieran, en algunos casos, producir alguna alteración fenotípica en *Streptomyces*. Por ejemplo, en *S. griseus* el plásmido pNG1 hace que aumente la germinación con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que el efecto del gen *SCO4849* de *S. coelicolor* en la germinación es mayor que el efecto de la mutación, por integración del plásmido, en su gen ortólogo. En especies como *S. griseus*, podrían construirse y ponerse a prueba vectores basados en  $\Phi$ BT1 que tuvieran el gen ortólogo de *SCO4849* correspondiente a la especie en estudio.

En conclusión, podemos decir que, los plásmidos integrativos pNG1-4 construidos en esta tesis, son vectores que restauran la expresión de los genes afectados por su integración. Estos plásmidos no afectan la germinación de las esporas en *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. clavuligerus*, por lo que ofrecen menos interferencia que otros vectores integrativos a la hora de analizar fenotipos en *Streptomyces*. La estrategia desarrollada en

este trabajo para la creación de vectores integrativos con efecto neutro en cuanto al fenotipo de *S. coelicolor* una vez integrados, podría ser aplicada a vectores integrativos en otras bacterias. Es posible mejorar plásmidos integrativos cuya integración genere un fenotipo, si el gen responsable de éste, no es el gen donde se integra el vector.

### **IV.3. La expresión de los genes *SCO2728-2731* es compleja y está controlada por al menos 4 promotores**

Mediante RT-PCR demostramos la co-transcripción de los genes *SCO2730* y *SCO2731* (Fig. 36). También demostramos la co-transcripción de los genes *SCO2729-SCO2730* y *SCO2728-SCO2729*, lo que sugiere que los 4 genes (*SCO2728-SCO2731*) podrían transcribirse juntos. Hasta el momento se habían descrito tres promotores controlando la expresión de estos 4 genes (Fig. 13 y 36a):

- P<sub>1</sub>, localizado aguas arriba de la ORF del gen *SCO2728* (Jeong *et al.* 2016).
- P<sub>2</sub>, localizado dentro de la ORF del gen *SCO2729* (Jeong *et al.* 2016).
- P<sub>3</sub>, localizado aguas arriba de la ORF del gen *SCO2730* (Dwarakanath *et al.* 2012; Jeong *et al.* 2016). Este promotor está regulado por el represor CsoR (Jeong *et al.* 2016).

Nuestros experimentos de RT-PCR nos permitieron identificar la existencia de un cuarto promotor desconocido (P<sub>4</sub>), localizado dentro de la ORF del gen *SCO2730* (Fig. 36).

Utilizando toda esta información, procedimos a complementar la cepa mutada utilizando el plásmido pNG3, en el que introdujimos distintas combinaciones de los promotores P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> y los genes *SCO2730* y *SCO2731* (P<sub>4</sub> está incluido en la ORF del gen *SCO2730*). Se hicieron 6 cepas de complementación (Fig. 40), todas ellas tuvieron fenotipos distintos y expresiones de los genes *SCO2730* y *SCO2731* diferentes (Fig. 41 y 42). La cepa que más se acercó al fenotipo de la cepa silvestre, fue la que incluía los tres promotores y los genes *SCO2730* y *SCO2731* (cepa 1 en la Fig. 40). En esta cepa se restauró la germinación, la producción de undecilprodigiosina, actinorrodina y CDA, a niveles muy similares a los de la cepa salvaje, pero no exactamente los mismos (Fig. 41). Lo que fue muy interesante, fue que los niveles de expresión de los genes *SCO2730* y *SCO2731* aumentaron con respecto a la cepa salvaje, lo que demuestra la existencia de una regulación compleja más allá de los 4 promotores identificados.

Con base en nuestros resultados anteriores y los que se discutirán más adelante, podemos afirmar que el fenotipo del mutante *SCO2730::Tn5062* es el resultado de una regulación compleja. Esta regulación está afectada directa y/o indirectamente por la interrupción del gen *SCO2730* hecha en este trabajo y por la función de este gen en el transporte de cobre. El resto de genes que forman parte del operón *SCO2728-2731*, y sus 4 promotores, también están implicados en esta regulación.

#### **IV.4. La concentración citosólica de cobre regula la germinación, el crecimiento, el metabolismo secundario y la diferenciación de *S. coelicolor***

Como se introdujo en el apartado I.4.2, el cobre afecta la diferenciación morfológica (formación del micelio aéreo y esporulación) y fisiológica (producción de antibióticos) en *Streptomyces* (Ueda *et al.* 1997; Keijser *et al.* 2000). En esta tesis, hemos descubierto que el cobre también influye en la germinación (Fig. 44b y 47a) y en el crecimiento (Fig. 43a y 44b). Por tanto, puede concluirse que el efecto del cobre en el desarrollo de *Streptomyces* es mucho más complejo y pleiotrópico de lo que se pensaba.

#### **IV.5. Las proteínas SCO2730 (CopZ)/2731 (CopA) son responsables de la liberación de cobre durante la germinación y tienen mayor afinidad por el Cu(I) que el sistema SCO1045 (CopZ)/1046 (CopA)**

Dado que las proteínas CopZ y CopA están implicadas en el transporte de cobre (Worrall & Vijgenboom 2010), nos planteamos como hipótesis que el mutante *SCO2730::Tn5062* podría tener un mayor contenido de cobre intracelular que la cepa silvestre. Para poner a prueba nuestra hipótesis, hemos cuantificado el cobre citosólico y la expresión de los dos sistemas de transporte de cobre predichos en *Streptomyces* (*SCO2730/2731* y *SCO1045/1046*) en las distintas en distintas fases del desarrollo en la cepa silvestre de *S. coelicolor*. Los niveles de cobre citosólico son máximos en las esporas durmientes, alcanzan su mínimo durante la germinación y vuelven a subir en el micelio (Fig. 43a). Hemos

demostrado que el sistema chaperona/transportador de cobre *SCO2730/2731* es el encargado de exportar el cobre del citosol durante la germinación (Fig. 43b). Mientras que, el sistema chaperona/transportador de cobre *SCO1045/1046* tampona el cobre citosólico cuando las concentraciones del metal son más altas que en la germinación, es decir, en el micelio (Fig. 43a,b). Que cada sistema, desempeñe una función principal en un intervalo específico de concentración de cobre citosólico, guarda cierta similitud con lo que ocurre en otras bacterias y es una prueba más de la complejidad de la regulación de los niveles de cobre intracelular. En *E. coli*, los sistemas *cue* y *cus* regulan el exporte de cobre en respuesta a cambios en la disponibilidad de cobre y oxígeno (Outten *et al.* 2001). La activación del operón *cus* es fundamental en condiciones de anaerobiosis, debido a que aumenta la concentración de Cu(I) a niveles en los que no es efectivo el sistema *cue*. Mientras que, en presencia de oxígeno el sistema *cue* es suficiente para evitar el daño causado por exceso de cobre (Outten *et al.* 2001).

Los bajos niveles de cobre citosólico durante la germinación ( $11,8 \pm 0,3$  ng Cu/mg proteína), coinciden con los máximos niveles de expresión de los genes *SCO2730/2731*, lo que sugiere que, la afinidad por el Cu(I) del sistema *SCO2730/2731* es mayor que la de su sistema análogo *SCO1045/1046*. Estos resultados obtenidos *in vivo*, se corresponden con lo publicado por Chaplin *et al.* (2015), quienes establecieron, mediante ensayos *in vitro*, que el sistema *SCO2730/2731* tiene mayor afinidad por el Cu(I) que el sistema *SCO1045/1046*. Otro resultado que apoya la mayor afinidad del sistema *SCO2730/2731* es que durante la germinación de las esporas del mutante *SCO2730::Tn5062*, hay sobreexpresión de los genes

del sistema *SCO1045/1046* (Tabla 12), y aun así los niveles de cobre en las esporas no se reducen hasta los niveles de la cepa Wt ( $45,7 \pm 8$  ng Cu/mg proteína en el mutante vs.  $11,8 \pm 0,3$  ng Cu/mg proteína en el WT). Al mismo tiempo, el sistema chaperona/transportador *SCO1045/1046* parece ser el principal transportador de Cu(I) en el micelio (Fig. 43b), donde la concentración citosólica de cobre está por encima de 45 ng Cu/mg proteína (Fig. 43a).

Nuestros resultados nos permiten afirmar que, tanto el sistema *SCO2730/2731* como el *SCO1045/1046* cumplen una función principal en la regulación de los niveles de cobre citosólico, pero cada uno actúa en unas concentraciones de cobre y fases del ciclo de vida de *Streptomyces* específicas. Probablemente lo que permite que cada sistema se active en condiciones determinadas es, al menos en parte, la diferencia en afinidad por el cobre. Esto tiene un claro sentido evolutivo, ya que las células pueden volver a las condiciones de homeostasis sin que haya un mayor gasto energético del necesario, contrario a lo que pasaría si se expresaran los genes de los dos sistemas a la vez.

### **IV.6. La asincronía en la germinación de las esporas depende de los niveles de cobre citosólico en esporas individuales**

En esta tesis, postulamos que la asincronía en la germinación de las esporas de *S. coelicolor* es consecuencia, al menos en parte, de la diferencia en la concentración de cobre citosólico entre las esporas durmientes (Fig. 46). Dicha concentración no logró medirse en esporas individuales de la cepa silvestre ni del mutante *SCO2730::Tn5062*, debido a

que la sensibilidad del equipo empleado no fue suficiente para cuantificar los niveles de cobre en estas muestras. No obstante, sí logramos medir el cobre intracelular en esporas de la cepa salvaje obtenidas de medio SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (cepa WT80Cu). Si asumimos que, la variabilidad observada en el contenido de cobre de las esporas de la cepa WT80Cu (Fig. 46) es similar a la de las esporas de la cepa Wt obtenidas en medio SFM no suplementado, y teniendo en cuenta que el promedio de cobre intracelular en esporas de la cepa Wt fue igual a 1225 ng Cu/mg proteína/espora (Fig. 44b), sería de esperar que las concentraciones mínima y máxima de este metal en las esporas de la cepa silvestre fueran de 625 y 4691 ng Cu/mg proteína/espora, respectivamente.

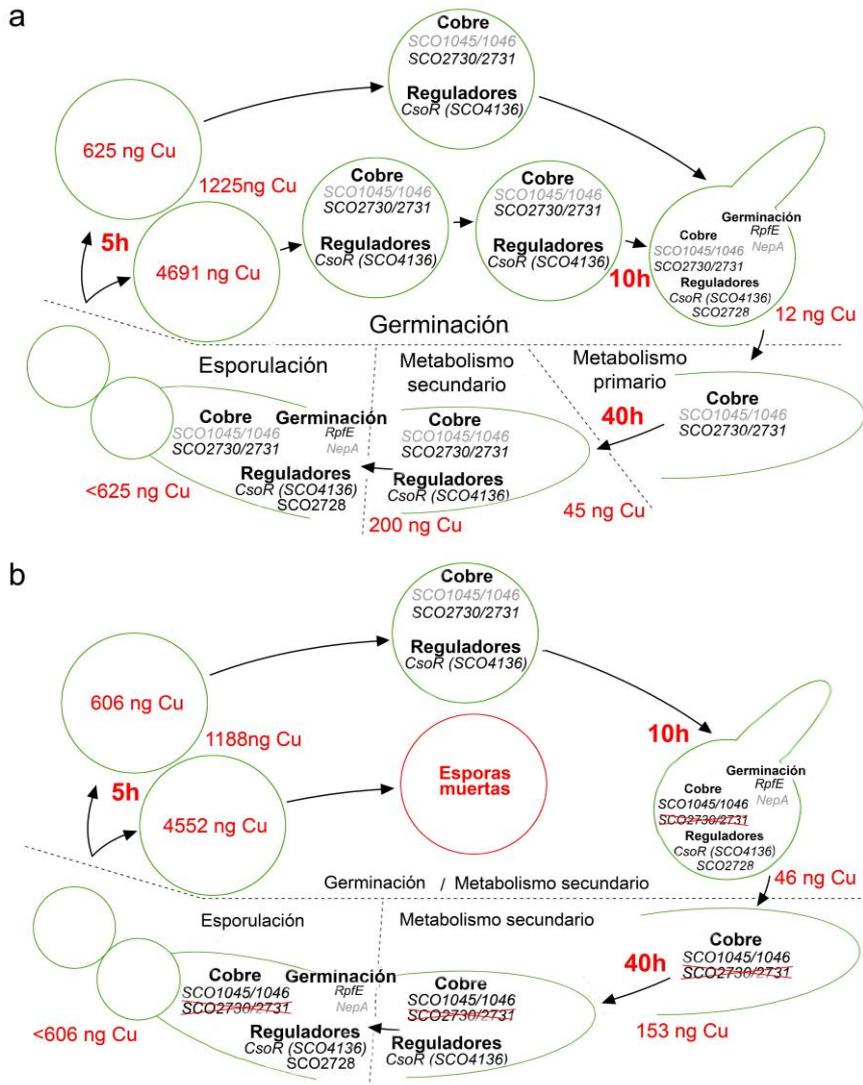
Cabe destacar el método empleado para medir el cobre en esporas individuales. Esta metodología se basa en la combinación de la electroforesis capilar y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo acoplada a colisión celular (apartado III.3.5) para medir el cobre citosólico en esporas individuales. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo donde se ha cuantificado el cobre citosólico en esporas individuales de *Streptomyces*. Hay estudios que demuestran que en las esporas latentes de *Streptomyces* hay cationes: principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , pero también  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (Salas *et al.* 1983). Sin embargo, hasta el momento se desconoce la variabilidad en la concentración de estos metales en esporas de estreptomicetos. Nuestra metodología podría ser adaptada para cuantificar la concentración de estos y de otros metales en esporas individuales de *Streptomyces*.

#### **IV.7. Los niveles de cobre citosólico controlan la germinación, el metabolismo primario/secundario y la esporulación**

Basándonos en los resultados previamente analizados, proponemos el modelo mostrado en la Fig. 50, donde se correlacionan la germinación de las esporas, el metabolismo primario/secundario y la esporulación, con los niveles de cobre citosólico y con la expresión de genes clave para la homeostasis del cobre intracelular en *S. coelicolor*.

##### **IV.7.1. Efecto del cobre citosólico en la cepa silvestre de *S. coelicolor***

El modelo propuesto para explicar el efecto del cobre citosólico en el desarrollo de la cepa silvestre se esquematiza en la Figura 50a. La germinación activa la secreción de cobre gracias a la activación del sistema de transporte *SCO2730/2731*. Postulamos que el sistema de transporte *SCO1045/1046*, con menor afinidad por el cobre, debería activarse durante los primeros estadios de la germinación, antes de que los niveles de cobre caigan por debajo del umbral en el que se activa el sistema *SCO2730/2731*, con mayor afinidad por el cobre (Fig. 43a,b). Una vez que la concentración de cobre cae a niveles de  $11,8 \pm 0,3$  ng Cu / mg proteína se activa la expresión de *rpfE*, una de las enzimas clave de la degradación del peptidoglicano durante la germinación (Sexton *et al.* 2015) (Fig. 50) (Tabla 12).



**Figura 50. Modelo que relaciona la concentración de cobre citosólico con la germinación, diferenciación morfológica y fisiológica, y expresión de genes en *S. coelicolor*.** Este modelo se basa en datos experimentales y en inferencias a partir de los mismos. Las concentraciones de cobre citosólico (ng Cu/mg proteína) se determinaron en los tiempos señalados (en rojo). Los genes mostrados se detectaron mediante *RNAseq*; en negro, genes activos; en gris, genes inactivos. TC: transportadores de cobre; AG: activador de la germinación; RG: represor de la germinación; RT: regulador transcripcional. (a) Modelo propuesto para la cepa silvestre de *S. coelicolor*. (b) Modelo propuesto para la cepa mutante *SCO2730::Tn5062*.

También postulamos que la asincronía en la germinación de las esporas se debe, al menos en parte, a las diferencias en la concentración citosólica de cobre en esporas individuales (Fig. 46). Las esporas con mayores niveles de cobre germinarían más tarde que las que tienen niveles más bajos.

Tras la germinación, la expresión de los genes *SCO2730/2731* disminuye, mientras que la expresión de los genes *SCO1045/1046* aumenta, la concentración citosólica de cobre también aumenta (Fig. 43a,b) y el metabolismo secundario se activa (Fig. 39b,c) cuando las concentraciones de cobre citosólico están comprendidas entre 45 y 200 ng Cu/mg proteína (Fig. 50).

Finalmente, postulamos la activación de un mecanismo de acumulación de cobre en las hifas esporulantes que culmina con los altos niveles de cobre citosólico presentes en las esporas durmientes (Fig. 44a). En este mecanismo podrían participar al menos dos reguladores transcripcionales, cuya función depende de la biodisponibilidad de metales: el represor de unión al cobre CsoR (*SCO4136*), y el posible regulador transcripcional dependiente de cationes ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) codificado por el gen *SCO2728*. También participaría NepA (proteína estructural de la pared de las esporas que está implicada en el mantenimiento de la latencia de las mismas) (de Jong *et al.* 2009). Hemos detectado un aumento de la expresión de los genes que codifican estas proteínas durante la germinación de las esporas del mutante *SCO2730::Tn5062* (Tabla 12), que se produce con altos niveles de cobre citosólico debido a la ausencia del sistema de transporte *SCO2730/2731*, que podrían ser análogos a los altos niveles de cobre citosólico que se dan durante la

esporulación. Un aspecto llamativo de este hallazgo es que, la expresión de *nepA* no está regulada por el represor CsoR, ya que este gen no tiene la secuencia consenso de unión al represor, por lo que debe existir otro mecanismo/sistema intracelular que actúe como sensor de cobre y como regulador transcripcional de otros genes en función del cobre citosólico. El producto del gen *SCO2728* tiene un dominio clasificado dentro de la familia de reguladores transcripcionales MerR con capacidad de unión a metales (TIGR02043 en la base de datos *Conserved Domain Database* del NCBI). Los reguladores CueR de *E. coli* (Outten *et al.* 2000) y *Bacillus subtilis* (Gaballa *et al.* 2003), son reguladores transcripcionales de la familia MerR que modulan la expresión de genes relacionados con la secreción de cobre. Mediante mecanismos inducidos por cobre, el regulador CueR de *E. coli* activa la expresión de *copA* (transportador de tipo ATPasa P<sub>1</sub>) y *cueO* (oxidasa multicobre) (Outten *et al.* 2000), y el regulador homónimo (antes denominado *yhdQ*) de *B. subtilis* activa la transcripción del operón *copZA* (metalochaperona y transportador de cobre). De manera similar podría actuar el potencial regulador *SCO2728*, modulando la expresión de genes relacionados con el transporte de cobre, tales como *SCO2730/2731*, en función de la concentración intracelular de este metal. Además, tal como se ha indicado en los resultados, *SCO2728* se co-transcribe junto a los genes *SCO2729-2731* (Fig. 36), y el promotor del gen *SCO2728* es necesario para complementar el mutante *SCO2730::Tn5062* (Fig. 36a y 41), indicando de nuevo que la expresión de los genes *SCO2728-2731* es extremadamente compleja. En este sentido, es particularmente interesante que el gen *SCO2728* (y también *SCO2729*) está muy sobreexpresado en el mutante *SCO2730::Tn5062* (5 veces más

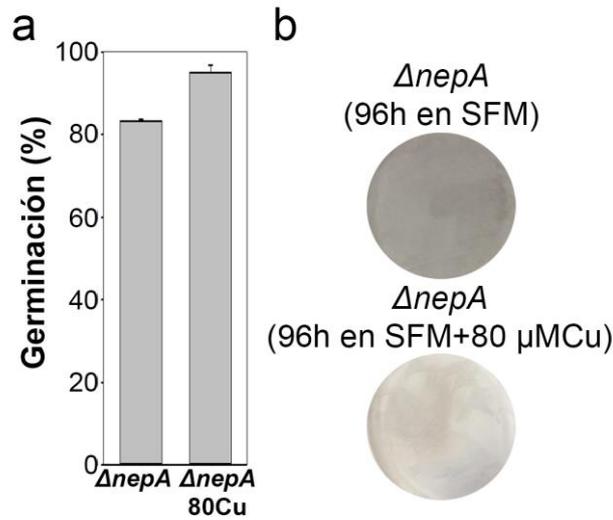
que en la cepa Wt) (Tabla 12), lo que sugiere una posible autorregulación de su propia expresión bajo las altas concentraciones de cobre citosólico de este mutante y de las hifas esporulantes, de forma análoga a lo que sucede con CsoR (Dwarakanath *et al.* 2012).

La importancia del cobre favoreciendo la esporulación ya había sido descrita anteriormente (Worrall & Vijgenboom 2010), y se sustenta también por el hecho de que el quelante de cobre BCDA reprime la esporulación en nuestros cultivos (datos no mostrados). No obstante, nosotros postulamos que niveles de cobre muy altos, contribuyen a la inactivación de la expresión génica en las esporas durmientes y, de hecho, la esporulación está muy retrasada en cultivos de la cepa silvestre suplementados con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (Fig. 45b).

El modelo anterior (Fig. 50a), también explica la aceleración en la germinación observada en las esporas de la cepa silvestre obtenidas en medio SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , pero germinadas en medio SFM no suplementado. Durante la esporulación en medio SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , las hifas esporulantes alcanzan los altos niveles de cobre típicos de las esporas durmientes muy rápido, deteniendo la expresión génica, incluyendo el gen *nepA*, y generando esporas con menor cantidad de NepA que las esporas de la cepa silvestre obtenidas en medio SFM no suplementado. En consecuencia, la germinación de las esporas de la cepa Wt80Cu mimetiza el fenotipo del mutante *nepA*, un adelanto muy significativo en la germinación (de Jong *et al.* 2009). Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, analizamos la germinación de las esporas del mutante *nepA* de *S. coelicolor* obtenidas en medio SFM suplementado con 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  y en medio SFM no suplementado. El

efecto del cobre en las esporas en la germinación del mutante *nepA* fue mucho menor que en la cepa silvestre: un incremento en la germinación del 12% (Fig. 51), comparado con el incremento del 64% observado en las esporas de la cepa Wt80Cu (Fig. 45a). Estos resultados corroboran que la proteína NepA es uno de los factores más importantes en el efecto del cobre acelerando la germinación en la cepa Wt80Cu, aunque no el único.

Dentro del conjunto de hifas que componen el micelio aéreo solo algunas forman esporas. Hasta el momento, no se conoce ninguna estrategia que permita separar las hifas esporulantes de las que no esporulan, pero sería muy interesante lograr esta separación para hacer análisis comparativos de la concentración de cobre citosólico y la expresión génica en ambas “poblaciones” de hifas. Aún queda mucho trabajo por hacer para entender por completo, o al menos a un nivel más detallado, las rutas bioquímicas moduladas por el cobre que participan en la regulación de la germinación, el metabolismo secundario, la esporulación y el estado de latencia de las esporas.



**Figura 51. Germinación y esporulación del mutante  $\Delta nepA$  en  $80 \mu M CuSO_4$ .** (a) Porcentaje de germinación (promedio de tres réplicas  $\pm$  D.E.), en cultivos de 6 horas en medio sólido GYM, en esporas del mutante  $\Delta nepA$  de *S. coelicolor* obtenidas de medio SFM y de medio SFM +  $80 \mu M CuSO_4$ . (b) Retraso en la esporulación del mutante  $\Delta nepA$  en presencia de cobre ( $80 \mu M CuSO_4$ ).

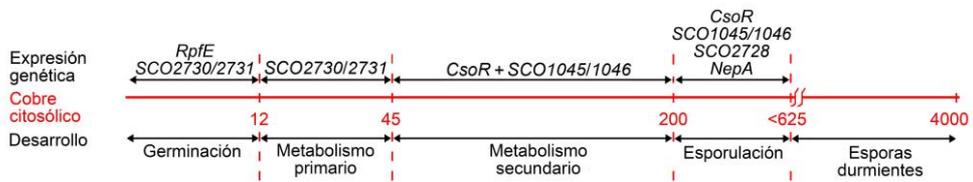
#### IV.7.2. Efecto del cobre citosólico en el mutante *SCO2730::Tn5062*

El modelo esquematizado en la Figura 50 también explica los fenotipos del mutante *SCO2730::Tn5062* (Fig. 50b). La ausencia del sistema de transporte *SCO2730/2731* conduce a una mayor concentración de cobre durante la germinación, la expresión de *rpfE* no se activa a los niveles de observados en la cepa silvestre (Tabla 12), y el metabolismo secundario está permanentemente activo (Fig. 39b,c y 50). Postulamos que las esporas que no germinan y se tiñen con yoduro de propido (esporas muertas) (Fig. 37b) son las que tienen los niveles más altos de cobre y no pueden llegar a emitir el tubo germinativo. La ausencia del sistema de transporte *SCO2730/2731* en las hifas esporulantes apenas

tiene efecto, lo que no es extraño, teniendo en cuenta que el sistema de transporte de cobre más importante durante la esporulación es el de las proteínas SCO1045/1046.

### **IV.7.3. Relación entre el cobre citosólico, la expresión génica y la diferenciación de *Streptomyces***

La Figura 52 esquematiza la relación entre el cobre citosólico, la expresión génica y la diferenciación de *S. coelicolor*. En concentraciones de cobre citosólico por debajo de 12 ng Cu/mg proteína, se induce la expresión del gen *rpfE* y la germinación. Las concentraciones de cobre intracelular por debajo de 45 ng Cu/mg proteína son consecuencia de la actividad del sistema de transporte de cobre *SCO2730/2731*, y activan el metabolismo primario. Cuando el cobre citosólico oscila entre 45 y 200 ng Cu/mg proteína se activan la expresión del regulador transcripcional CsoR, el sistema de transporte de cobre *SCO1045/1046* y el metabolismo secundario. Este rango de concentración de cobre es el resultado de la actividad del sistema *SCO1045/1046*. Cuando el cobre intracelular está entre 200 y 625 ng Cu/mg proteína se induce la esporulación, activando, entre otros, la expresión de los genes *nepA* y *SCO2728*. Las concentraciones de cobre superiores a 625 ng Cu/mg proteína contribuyen a la represión de la expresión génica en las esporas latentes.



**Figura 52. Relación entre el cobre citosólico, la expresión génica y la diferenciación de *S. coelicolor*.** En rojo se indican los valores de concentración de cobre citosólico obtenidos, expresados en ng Cu/mg proteína.

#### IV.7.4. Posibles aplicaciones industriales del mutante *SCO2730::Tn5062*

En nuestro conocimiento, el mutante *SCO2730::Tn5062* es la primera cepa de *Streptomyces* capaz de producir metabolitos secundarios durante todo tu ciclo de desarrollo, incluyendo la fase de germinación, de crecimiento exponencial, y por supuesto la fase estacionaria (Fig. 39). Además, la expresión de algunos genes pertenecientes a rutas de metabolitos secundarios predichas *in silico*, pero aún no observadas en *S. coelicolor* (rutas crípticas) (hexacétido, dipéptido, policético aromático) (Nett *et al.* 2009), está regulada al alza en el mutante *SCO2730::Tn5062*. Se conoce bien que la adición de cobre a los medios de cultivo acelera el metabolismo secundario de *Streptomyces* (Ueda *et al.* 1997), pero un exceso de cobre citosólico reprime el metabolismo secundario, como se puede observar durante la germinación de las esporas de la cepa Wt80Cu (Tabla 13). La concentración de cobre citosólico está muy regulada y se tampona de forma muy precisa por medio de transportadores específicos (Worrall & Vijgenboom 2010). Por tanto, la única forma de conseguir la concentración óptima de cobre citosólico para activar el metabolismo

secundario durante todo el ciclo de desarrollo de *Streptomyces* es la mutagénesis del sistema de transporte *SCO2730/2731*. Hará falta más trabajo para explorar si la mutación de los ortólogos de los genes *SCO2730/2731* en otros estreptomicetos diferentes a *S. coelicolor*, incluyendo cepas de *Streptomyces* de interés industrial, también potencian el metabolismo secundario y activan la expresión de rutas crípticas.



# CONCLUSIONES



1. De ocho mutantes obtenidos dos tuvieron un fenotipo relevante. En la cepa mutada en el gen *SCO2263* se observó mayor tabicación en las hifas en tiempos tardíos (fase de MII) y la cepa mutada en los genes *SCO2730/2731* en la que se observó un efecto pleiotrópico en el fenotipo.
2. La integración del plásmido pMS82 en el cromosoma de *Streptomyces* causa un retraso en la germinación de las esporas.
3. La integración en el cromosoma de los plásmidos pNG1-pNG4 creados en este trabajo, genera un fenotipo neutro en la germinación, diferenciación morfológica y en la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* y otros estreptomicetos, aunque no en todos.
4. El sistema de chaperona/transportador de cobre CopZ (*SCO2730*)/CopA(*SCO2731*) tiene un papel muy relevante en el transporte de cobre durante la germinación.
5. El sistema de chaperona/transportador de cobre CopZ (*SCO1045*)/CopA(*SCO1046*) tiene un papel muy relevante en la homeostasis del cobre en el micelio.
6. La cepa mutada en los genes *SCO2730/2731* muestra un retraso muy importante en la germinación, el crecimiento y en la diferenciación morfológica (retraso en esporulación), así como un adelanto en la producción de undecilprodigiosina que comienza en la germinación. Esto sugiere que CopZ (*SCO2730*) y CopA (*SCO2731*) participan en la regulación de todos estos procesos. Esta regulación probablemente se deba a su efecto en los niveles de

cobre citosólico, que a su vez modulan la germinación, la activación del metabolismo secundario y la esporulación.

7. La expresión de muchos de los genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluyendo algunas rutas crípticas, está regulada al alza durante la germinación de la cepa mutada en los genes *SCO2730/2731*, lo que permite inferir que CopZ (*SCO2730*) y CopA (*SCO2731*) afectan múltiples rutas de biosíntesis.
8. Hemos propuesto un modelo en *S. coelicolor* que correlaciona la concentración de cobre citosólico con la germinación, la diferenciación fisiológica y morfológica, así como con la expresión de genes relacionados con el transporte de cobre, genes que activan/reprimen la germinación y genes relacionados con el metabolismo secundario.
9. La concentración de cobre citosólico está muy regulada y se tampona de forma muy precisa por medio de transportadores específicos. La única forma de conseguir la concentración de cobre citosólico óptima para activar el metabolismo secundario durante todo el ciclo de desarrollo de *Streptomyces* es la mutagénesis del sistema de transporte *SCO2730/2731*.



# REFERENCIAS



## Referencias

---

1. Abbas, A.S. & Edwards, C. (1990). Effects of metals on *Streptomyces coelicolor* growth and actinorhodin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 675-680.
2. Ainsa, J.A., Bird, N., Ryding, N.J., Findlay, K.C. & Chater, K.F. (2010). The complex whiJ locus mediates environmentally sensitive repression of development of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 225-236.
3. Akanuma, G., Ueki, M., Ishizuka, M., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2011). Control of aerial mycelium formation by the BldK oligopeptide ABC transporter in *Streptomyces griseus*. *FEMS microbiology letters*, 315, 54-62.
4. 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 Genet.*, 10, e1004554.
5. Albarracín, V.H., Ávila, A.L., Amoroso, M.J. & Abate, C.M. (2008). Copper removal ability by *Streptomyces* strains with dissimilar growth patterns and endowed with cupric reductase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 288, 141-148.
6. 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, 553-566.
7. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. (2008). Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *J. Proteome Res.*, 7, 209-216.
8. Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. In: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

9. Balasubramanian, R., Kenney, G.E. & Rosenzweig, A.C. (2011). Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria. *J. Biol. Chem.*, 286, 37313-37319.
10. Balasubramanian, R. & Rosenzweig, A.C. (2008). Copper methanobactin: a molecule whose time has come. *Curr. Opin. Chem. Biol.* , 12, 245-249.
11. Baltz, R.H. (2012). *Streptomyces* temperate bacteriophage integration systems for stable genetic engineering of actinomycetes (and other organisms). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 661-672.
12. Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blažič, M., Horvat, M. *et al.* (2013). Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome Announc.*, 1, e00581-00513.
13. Barbe, V., Bouzon, M., Mangenot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B. *et al.* (2011). Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *J. Bacteriol.*, 193, 5055-5056.
14. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D. *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
15. Bhattacharyya, B.K., Pal, S.C. & Sen, S.K. (1998). Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5: cultural effect. *Rev. Microbiol.* , 29, 254-257.
16. Bibb, M.J., Domonkos, Á., Chandra, G. & Buttner, M.J. (2012). Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by  $\sigma$ BldN and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Mol. Microbiol.*, 84, 1033-1049.
17. Bibb, M.J., 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). *J Bacteriol*, 182, 4606-4616.

18. Bibb, M.J., White, J., Ward, J.M. & Janssen, G.R. (1994). The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.*, 14, 533-545.
19. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N. & Schonert, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Genes*, 116, 43-49.
20. Bignell, D.R., Warawa, J.L., Strap, J.L., Chater, K.F. & Leskiw, B.K. (2000). Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology*, 146 ( Pt 9), 2161-2173.
21. Bimboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
22. Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P. & Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res.*, 14, 893-900.
23. Blundell, K.L., Hough, M.A., Vijgenboom, E. & Worrall, J.A. (2014). Structural and mechanistic insights into an extracytoplasmic copper trafficking pathway in *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.*, 459, 525-538.
24. Blundell, K.L., Wilson, M.T., Svistunenko, D.A., Vijgenboom, E. & Worrall, J.A. (2013). Morphological development and cytochrome c oxidase activity in *Streptomyces lividans* are dependent on the action of a copper bound Sco protein. *Open Biol.* , 3, 120163.
25. Bobek, J., Halada, P., Angelis, J., Vohradsky, J. & Mikulík, K. (2004). Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Proteomics*, 4, 3864-3880.
26. Bobek, J., Šmídová, K. & Čihák, M. (2017). A waking review: old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. *Front. Microbiol.*, 8, 2205.

## Referencias

---

27. Bosso, J.A., Mauldin, P.D. & Salgado, C.D. (2010). The association between antibiotic use and resistance: the role of secondary antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* , 29, 1125-1129.
28. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* , 72, 248-254.
29. Bruins, M.R., Kapil, S. & Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45, 198-207.
30. Burger, A., Sichler, K., Kelemen, G., Buttner, M. & Wohlleben, W. (2000). Identification and characterization of the mre gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular & general genetics : MGG*, 263, 1053-1060.
31. Burrus, V. & Waldor, M.K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.*, 155, 376-386.
32. Bush, M.J., Bibb, M.J., Chandra, G., Findlay, K.C. & Buttner, M.J. (2013). Genes required for aerial growth, cell division, and chromosome segregation are targets of WhiA before sporulation in *Streptomyces venezuelae*. *MBio*, 4, e00684-00613.
33. Bush, M.J., Chandra, G., Bibb, M.J., Findlay, K.C. & Buttner, M.J. (2016). Genome-wide chromatin immunoprecipitation sequencing analysis shows that WhiB is a transcription factor that cocontrols its regulon with WhiA to initiate developmental cell division in *Streptomyces*. *MBio.*, 7, e00523-00516.
34. Bystrykh, L.V., Fernandez-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A. & Dijkhuizen, L. (1996a). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 178, 2238-2244.
35. Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A. & Dijkhuizen, L. (1996b). Production of actinorhodin-

- related" blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.*, 178, 2238-2244.
36. Chakraborty, R. & Bibb, M.J. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.*, 179, 5854-5861.
37. Chakraborty, R., White, J., Takano, E. & Bibb, M. (1996). Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular microbiology*, 19, 357-368.
38. Challis, G.L. & Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 14555–14561.
39. Champness, W.C. (1988). New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J Bacteriol*, 170, 1168-1174.
40. Chang, F.M.J., Coyne, H.J., Cubillas, C., Vinuesa, P., Fang, X., Ma, Z. *et al.* (2014). Cu (I)-mediated allosteric switching in a copper-sensing operon repressor (*CsoR*). *J. Biol. Chem.*, 289, 19204-19217.
41. 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. *Mol. Microbiol.*, 21, 1075-1085.
42. Chaplin, A.K., Petrus, M.L., Mangiameli, G., Hough, D.A., Svistunenko, D.A., Nicholls, P. *et al.* (2015b). GlxA is a new structural member of the radical copper oxidase family and is required for glycan deposition at hyphal tips and morphogenesis of *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* , 469, 433-444.
43. Chaplin, A.K., Tan, B.G., Vijgenboom, E. & Worrall, J.A. (2015a). Copper trafficking in the *CsoR* regulon of *Streptomyces lividans*. *Metallomics*, 7, 145-155.

44. Chater, K.F. (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.*, 72, 9-28.
45. Chater, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In: *Microbial Development* (ed. Losick, R). Cold Spring Harbor New York pp. 89-115.
46. Chater, K.F. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 667-673.
47. Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T. & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 171-198.
48. Chater, K.F. & Carter, A.T. (1979). A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restrictionmodification systems. *J. Gen. Microbiol.*, 115, 431-442.
49. Cheng, K., Rong, X., Pinto-Tomás, A.A., Fernández-Villalobos, M., Murillo-Cruz, C. & Huang, Y. (2015). Population genetic analysis of *Streptomyces albidoflavus* reveals habitat barriers to homologous recombination in the diversification of streptomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 966-975.
50. Čihák, M., Kameník, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofronová, O. *et al.* (2017). Secondary metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*. *Front. Microbiol.* , 8, 2495.
51. Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L. & Wösten, H.A.B. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!. *Trends Microbiol.*, 14, 313-319.
52. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G. *et al.* (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & development*, 17, 1714-1726.
53. Combes, P., Till, R., Bee, S. & Smith, M.C. (2002). The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the  $\phi$ C31-encoded sitespecific recombination system. *J. Bacteriol.*, 184, 5746-5752.

54. Cruz-Morales, P., Vijgenboom, E., Iruegas-Bocardo, F., Girard, G., Yáñez-Guerra, L.A., Ramos-Aboites, H.E. *et al.* (2013). The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome Biol. Evol.*, 5, 1165-1175.
55. Davis, N.K. & Chater, K.F. (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Molecular microbiology*, 4, 1679-1691.
56. Davis, N.K. & Chater, K.F. (1992). The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Molecular & general genetics : MGG*, 232, 351-358.
57. de Jong, W., Manteca, A., Sanchez, J., Bucca, G., Smith, C.P., Dijkhuizen, L. *et al.* (2009). NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 71, 1591-1603.
58. de Lima Procópio, R.E., da Silva, I., Martins, M.K., de Azebedo, J.L. & de Araújo, J.M. (2012). Antibiotic produced by *Streptomyces Braz.* *J. Infect. Dis.*, 16, 466-471.
59. Delić, V., Hopwood, D.A. & Friend, E.J. (1970). Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutat. Res.* , 9, 167-182.
60. Den Hengst, C.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K. & Buttner, M.J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* , 78, 361-379.
61. Derouaux, A., Halici S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J. *et al.* (2004). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* , 186, 1893-1897.

62. Dwarakanath, S., Chaplin, A.K., Hough, M.A., Rigali, S., Vijgenboom, E. & Worrall, J.A. (2012). Response to copper stress in *Streptomyces lividans* extends beyond genes under direct control of a copper-sensitive operon repressor protein (CsoR). *J. Biol. Chem.*, 287, 17833-17847.
63. Eaton, D. & Ensign, J.C. (1980). *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. *J. Bacteriol.*, 143, 377-382.
64. Fayed, B., Younger, E., Taylor, G. & Smith, M.C. (2014). A novel *Streptomyces* spp. integration vector derived from the *S. venezuelae* phage, SV1. *BMC Biotechnol.*, 14, 51.
65. 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, 2431-2441.
66. Fernández-Martínez, L.T., Del Sol, R., Evans, M.C., Fielding, S., Herron, P.R., Chandra, G. *et al.* (2011). A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 515-522.
67. Fernández, E., Weißbach, U., Reillo, C.S., Braña, A.F., Méndez, C., Rohr, J. *et al.* (1998). Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.*, 180, 4929-4937.
68. Filippova, S.N. & Vinogradova, K.A. (2017). Programmed cell death as one of the stages of streptomycete differentiation *Microbiology* 86, 439-454.
69. Flärdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 564-571.
70. Flärdh, K. & Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7, 36-49.

## Referencias

---

71. Flårdh, K., Richards, D.M., Hempel, A.M., Howard, M. & Buttner, M.J. (2012). Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 15, 737–743.
72. Fogg, P.C.M., Haley, J.A., Stark, M. & Smith, M.C.M. (2017). Genome integration and excision by a new *Streptomyces* bacteriophage,  $\phi$ Joe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83, e02767-02716.
73. Foor, F., Roberts, G.P., Morin, N., Snyder, L., Hwang, M., Gibbons, P.H. *et al.* (1985). Isolation and characterization of the *Streptomyces cattleya* temperate phage TG1. *Gene*, 39, 11-16.
74. Fujimoto, M., Chijiwa, M., Nishiyama, T., Takano, H. & Ueda, K. (2016). Developmental defect of cytochrome oxidase mutants of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*, 162, 1446-1455.
75. Fujimoto, M., Yamada, A., Kurosawa, J., Kawata, A., Beppu, T., Takano, H. *et al.* (2012). Pleiotropic role of the Sco1/SenC family copper chaperone in the physiology of *Streptomyces*. *Microb. Biotechnol.*, 5, 477-488.
76. Gaballa, A., Cao, M. & Helmann, J.D. (2003). Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* copZA operon. *Microbiology*, 149, 3413-3421.
77. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D. *et al.* (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22, 58-73.
78. Gentz, R., Langner, A., Chang, A.C., Cohen, S.N. & Bujard, H. (1981). Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 4936-4940.
79. Glauert, A.M. & Hopwood, D.A. (1961). The fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (*S. coelicolor*). III. The walls of the mycelium and spores. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10, 505–516.

80. Gonzalez-Quinonez, N., Lopez-Garcia, M.T., Yague, P., Rioseras, B., Pisciotta, A., Alduina, R. *et al.* (2016). New PhiBT1 site-specific integrative vectors with neutral phenotype in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 2797-2808.
81. Gramajo, H.C., Takano, E. & Bibb, M.J. (1993). Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Molecular microbiology*, 7, 837-845.
82. Gregory, M.A., Till, R. & Smith, M.C. (2003). Integration site for *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.*, 185, 5320–5323.
83. Güssow, H.T. (1914). The systematic position of the organism of the common potato scab. *Science*, 39, 431-433.
84. 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. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 100, 1541-1546.
85. 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, 2007.
86. Hamedi, J., Poorinmohammad, N. & Wink, J. (2017). The role of Actinobacteria in biotechnology In: *Biology and biotechnology of Actinobacteria* (eds. Wink, J, Mohammadipanah, F & Hamedi, J). Springer International pp. 269-328.
87. Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A. & Suarez, J.E. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.*, 105, 203-214.
88. Harrison, J. & Studholme, D.J. (2014). Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microb. Biotechnol.*, 7, 373-380.

89. Heichlinger, A., Ammelburg, M., Kleinschnitz, E.M., Latus, A., Maldener, I., Flardh, K. *et al.* (2011). The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol*, 193, 1533-1542.
90. Hesketh, A., Bucca, G., Laing, E., Flett, F., Hotchkiss, G., Smith, C.P. *et al.* (2007). New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures. *BMC genomics*, 8, 261.
91. Hesketh, A., Kock, H., Mootien, S. & Bibb, M. (2009). The role of absC, a novel regulatory gene for secondary metabolism, in zinc-dependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Mol. Microbiol.*, 74, 1427-1444.
92. Hopwood, D.A. (2006). Soil to Genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 1-23.
93. Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, New York.
94. Hopwood, D.A. & Sermonti, G. (1962). The genetics of *Streptomyces coelicolor*. *Adv. Gen.* , 11, 273-343.
95. Hopwood, D.A., Wildermuth, H. & Palmer, H.M. (1970). Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *Microbiology*, 61, 397-408.
96. Horinouchi, S. (2002). A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front. Biosci.*, 7, 2045-2057.
97. Hunt, A.C., Servin-Gonzalez, L., Kelemen, G.H. & Buttner, M.J. (2005). The bldC developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family. *J Bacteriol*, 187, 716-728.

98. Jeong, Y., Kim, J.N., Kim, M.W., Bucca, G., Cho, S., Yoon, Y.J. *et al.* (2016). The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nat. Commun.*, 7, 11605.
99. Kalakoutskii, L.V. & Agre, N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.*, 40, 469-524.
100. Kang, S.H., Huang, J., Lee, H.N., Hur, Y.A., Cohen, S.N. & Kim, E.S. (2007). Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.*, 189, 4315-4319.
101. Kawamoto, S., Watanabe, H., Hesketh, A., Ensign, J.C. & Ochi, K. (1997). Expression analysis of the *ssgA* gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Microbiology*, 143 ( Pt 4), 1077-1086.
102. Keijser, B.J., van Wezel, G.P., Canters, G.W., Kieser, T. & Vijgenboom, E. (2000). The ram-dependence of *Streptomyces lividans* differentiation is bypassed by copper. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* , 2, 565-574.
103. Keijser, B.J., van Wezel, G.P., Canters, G.W. & Vijgenboom, E. (2002). Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* ram genes: involvement of RamR in regulation of the ramCSAB operon. *J Bacteriol*, 184, 4420-4429.
104. Kelemen, G.H., Brown, G.L., Kormanec, J., Potůčková, L., Chater, K.F. & Buttner, M.J. (1996). The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Mol. Microbiol.*, 21, 593-603.
105. Khaleel, T., Younger, E., McEwan, A.R., Varghese, A.S. & Smith, M. (2011). A phage protein that binds  $\phi$ C31 integrase to switch its directionality. *Mol. Microbiol.*, 80, 1450-1463.

106. Kieser, T., Bibb M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
107. Kim, H.J., Calcutt, M.J., Schmidt, F.J. & Chater, K.F. (2000). Partitioning of the linear chromosome during sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves an oriC-linked parAB locus. *J Bacteriol*, 182, 1313-1320.
108. Kim, J.N., Kim, Y., Jeong, Y., Roe, J.H., Kim, B.G. & Cho, B.K. (2015). Comparative genomics reveals the core and accessory genomes of *Streptomyces* species. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 1599-1605.
109. Kormanec, J. & Sevcikova, B. (2002). The stress-response sigma factor sigma(H) controls the expression of ssgB, a homologue of the sporulation-specific cell division gene ssgA, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular genetics and genomics : MGG*, 267, 536-543.
110. Lee, H.N., Huang, J., Im, J.H., Kim, S.H., Noh, J.H., Cohen, S.N. *et al.* (2010). Putative TetR family transcriptional regulator SCO1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 76, 3039-3043.
111. Li, S., Wang, W., Li, X., Fan, K. & Yang, K. (2015). Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for *Streptomyces coelicolor*. *Sci. Rep.*, 5, 15840.
112. Lilya, H. & Andriy, L. (2017). The genetic system of Actinobacteria In: *Biology and biotechnology of Actinobacteria* (eds. Wink, J, Mohammadipanah, F & Hamedi, J). Springer International pp. 79-121.
113. Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S.K., Zhang, L., George, G.N. *et al.* (2007). CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat. Chem. Biol.* , 3, 60.
114. Lu, Y., Wang, W., Shu, D., Zhang, W., Chen, L., Qin, Z. *et al.* (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 625-635.

## Referencias

---

115. Ma, Z., Cowart, D.M., Scott, R.A. & Giedroc, D.P. (2009). Molecular insights into the metal selectivity of the copper (I)-sensing repressor CsoR from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 48, 3325-3334.
116. Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B. & Canters, G.W. (2004). Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.*, 13, 2388-2397.
117. 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, 61-68.
118. Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P. & Sanchez, J. (2008a). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3877-3886.
119. Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P. & Sanchez, J. (2008b). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 3877-3886.
120. Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C. & Sanchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274, 118-125.
121. Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2005a). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*, 151, 3689-3697.
122. Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2005b). Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol*, 5, 51.
123. Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2006). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res. Microbiol.*, 157, 143-152.

## Referencias

---

124. Manteca, A. & Sanchez, J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2920-2924.
125. Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H.R., Schwammle, V. & Jensen, O.N. (2010a). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1423-1436.
126. Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H.R., Schwammle, V. & Jensen, O.N. (2010b). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol. Cell. Proteomics*, 9, 1423-1436.
127. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17, 10.
128. McBride, M.J. & Ensign, J.C. (1987). Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.*, 169, 4995–5001.
129. McBride, M.J. & Ensign, J.C. (1990). Regulation of trehalose metabolism by *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.*, 172, 3637-3643.
130. McCormick, J.R. & Flärdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36, 206-231.
131. Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.*, 31, 446–450.
132. Mendez, C. & Chater, K.F. (1987). Cloning of whiG, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 169, 5715-5720.
133. Merrick, M.J. (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.*, 96, 299–315.

## Referencias

---

134. Miguelez, E.M., Hardisson, C. & Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell. Biol.*, 145, 515-525.
135. Mikulik, K., Janda, I., Maskova, H., Stastna, J. & Jiranova, A. (1977). Macromolecular synthesis accompanying the transition from spores to vegetative forms of *Streptomyces granaticolor*. *Folia Microbiol.*, 22, 252–261.
136. Mikulik, K., Janda, I., Weiser, J., Stastna, J. & Jiranova, A. (1984). RNA and ribosomal protein patterns during aerial spore germination in *Streptomyces granaticolor*. *Eur. J. Biochem.*, 145, 381–388.
137. Millard, W.A. (1922). Common scab of potatoes. *Ann. Appl. Biol.*, 9, 70-88.
138. Miller, J.H. (1971). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Laboratory Press*.
139. Molle, V. & Buttner, M.J. (2000). Different alleles of the response regulator gene bldM arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Molecular microbiology*, 36, 1265-1278.
140. Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 1362-1384.
141. Nicieza, R.G., Huergo, J., Connolly, B.A. & Sanchez, J. (1999). Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 20366-20375.
142. Noens, E. (2007a). Control of sporulation-specific cell division in *Streptomyces coelicolor*. In: *Department Microbial Development (LIC), Department Electron Microscopy (LUMC/MCB)*. Leiden University Leiden, Netherlands.

## Referencias

---

143. Noens, E.E., Mersinias, V., Traag, B.A., Smith, C.P., Koerten, H.K. & van Wezel, G.P. (2005). SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 58, 929-944.
144. Novella, I.S., Barbés, C. & Sánchez, J. (1992). Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can. J. Microbiol.*, 38, 769-773.
145. Nwaka, S. & Holzer, H. (1998). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 58, 197-237.
146. Ochi, K. (1990). A relaxed (rel) mutant of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin. *Microbiology*, 136, 2405-2412.
147. Odermatt, A. & Solioz, M. (1995). Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.*, 270, 4349-4354.
148. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H. *et al.* (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.*, 190, 4050-4060.
149. Onaka, H., Nakagawa, T. & Horinouchi, S. (1998). Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Molecular microbiology*, 28, 743-753.
150. Ou, X., Zhang, B., Zhang, L., Zhao, G. & Ding, X. (2009). Characterization of *rrdA*, a TetR family protein gene involved in the regulation of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2158-2165.
151. Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A. & O'Halloran, T.V. (2001). The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic

- and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 276, 30670-30677.
152. Outten, F.W., Outten, C.E., Hale, J. & O'Halloran, T.V. (2000). Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J. Biol. Chem.*, 275, 31024-31029.
153. Paget, M.S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J. & Buttner, M.J. (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^E$  is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.*, 181, 204-211.
154. Palumaa, P. (2013). Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Letters*, 587, 1902-1910.
155. Park, S.S., Yang, Y.H., Song, E., Kim, E.J., Kim, W.S., Sohng, J.K. *et al.* (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 1073-1083.
156. Park, U.M., Suh, J.W. & Hong, S.K. (2000). Genetic Analysis of absR, a new abs locus of *Streptomyces coelicolor*. *J Microbiol Biotechnol* 10, 169-175.
157. 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). *Arch. Microbiol.*, 187, 87-99.
158. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A.F., Shimkets, L.J., Sevillano, L. & Santamaría, R.I. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol*, 4, 175-183.
159. Petrus, M.L., Vijgenboom, E., Chaplin, A.K., Worrall, J.A., van Wezel, G.P. & Claessen, D. (2016). The DyP-type peroxidase DtpA is a Tat-substrate required for GlxA maturation and morphogenesis in *Streptomyces*. *Open Biol.* , 6, 150149.

160. Price, B., Adamidis, T., Kong, R. & Champness, W. (1999). A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog. *J. Bacteriol.*, 181, 6142-6151.
161. Puig, S., Rees, E.M. & Thiele, D.J. (2002). The ABCDs of periplasmic copper trafficking *Structure* 10.
162. Ranade, N. & Vining, L.C. (1993). Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.*, 39, 377–383.
163. Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E.E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M. *et al.* (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol. Microbiol.*, 61, 1237-1251.
164. Rioseras, 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 Technol.*, 151, 191-198.
165. Rioseras, B., Yagüe, P., López-García, M.T., Gonzalez-Quiñonez, N., Binda, E., Marinelli, F. *et al.* (2016). Characterization of *SCO4439*, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in spore cell wall maturation, resistance, and germination in *Streptomyces coelicolor*. *Sci. Rep.*, 6, 21659.
166. 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, 2410–2429.
167. Romero-Rodríguez, A., Maldonado-Carmona, N., Ruiz-Villafán, B., Koirala, N., Rocha, D. & Sánchez, S. (2018). Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-21.

168. Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Guzmán-Trampe, S., Maldonado-Carmona, N., Vázquez-Hernández, M. *et al.* (2017). Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 162.
169. Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M. *et al.* (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.*, 36, 146–167.
170. 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). *J Bacteriol*, 181, 5419-5425.
171. Saito, N., Xu, J., Hosaka, T., Okamoto, S., Aoki, H., Bibb, M.J. *et al.* (2006). EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 188, 4952-4961.
172. Salas, J.A., Guijarro, J.A. & Hardisson, C. (1983). High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J. Bacteriol.*, 155, 1316–1323.
173. Sambrook, J. & Russel, D.V. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
174. Sánchez, L. & Braña, A.F. (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, 142, 1209-1220.
175. Santo, C.E., German, N., Elguindi, J., Grass, G. & Rensing, C. (2014). Biocidal mechanisms of metallic copper surfaces. In: *Use of Biocidal Surfaces for Reduction of Healthcare Acquired Infections*. Springer, pp. 103-136.
176. Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.*, 6, 1-13.

177. Santos-Beneit, F., Rodriguez-Garcia, A., Sola-Landa, A. & Martin, 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, 53-68.
178. Schatz, A. & Waksman, S.E. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57, 244–248.
179. Seipke, R.F., Kaltenpoth, M. & Hutchings, M.I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol. Rev.*, 36, 862-876.
180. Sexton, D.L., St-Onge, R.J., Haiser, H.J., Yousef, M.R., Brady, L., Gao, C. *et al.* (2015). Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 197, 848-860.
181. Sharma, U.K. & Chatterji, D. (2010). Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of  $\sigma^{70}$  activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 646–657.
182. Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W. *et al.* (2009). *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 1149.
183. Singer, M.A. & Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.*, 1, 639–648.
184. Smith, M.C., Hendrix, R.W., Dedrick, R., Mitchell, K., Ko, C.C., Russell, D. *et al.* (2013). Evolutionary relationships among actinophages and a putative adaptation for growth in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.*, 195, 4924-4935.
185. Smokvina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C.J. & Guerineau, M. (1990). Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene*, 94, 53–59.

## Referencias

---

186. 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6133–6138.
187. Solioz, M., Helge, A., Mermod, M. & Mancini, S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *J. Biol. Inorg. Chem.* , 15, 3-14.
188. Solioz, M. & Stoyanov, J.V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 183-195.
189. Song, J.Y., Jeong, H., Yu, D.S., Fischbach, M.A., Park, H.S., Kim, J.J. *et al.* (2010). Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J. Bacteriol.*, 192, 6317-6318.
190. Strakova, E., Bobek, J., Zikova, A. & Vohradsky, J. (2013). Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. *PloS one*, 8, e72842.
191. Straw, M.L., Chaplin, A.K., Hough, M.A., Paps, J., Bavro, V.N., Wilson, M.T. *et al.* (2018). A cytosolic copper storage protein provides a second level of copper tolerance in *Streptomyces lividans*. *Metallomics*, 10, 180-193.
192. Studholme, D.J. ( 2016). Genome Update. Let the consumer beware: *Streptomyces* genome sequence quality. *Microb. Biotechnol.*, 9, 3-7.
193. Sun, J., Hesketh, A. & Bibb, M. (2001). Functional analysis of relA and rshA, two relA/spoT homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 183, 3488-3498.
194. Takano, E. (2006).  $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* , 9, 287-294.
195. Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M.J., Wang, L., Li, W. *et al.* (2003). A rare leucine codon in adpA is implicated in the morphological defect of bldA

- mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 50, 475-486.
196. Tan, B.G., Vijgenboom, E. & Worrall, J.A. (2014). Conformational and thermodynamic hallmarks of DNA operator site specificity in the copper sensitive operon repressor from *Streptomyces lividans*. *Nucleic Acids Res.*, 42, 1326-1340.
197. Tenconi, E., Jourdan, S., Motte, P., Virolle, M.J. & Rigali, S. (2012). Extracellular sugar phosphates are assimilated by *Streptomyces* in a PhoPdependent manner. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 425-433.
198. Thorpe, H.M., Wilson, S.E. & Smith, M.C.M. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage  $\phi$ C31. *Mol. Microbiol.*, 38, 232-241.
199. Tottey, S., Rich, P.R., Rondet, S.A. & Robinson, N.J. (2001). Two menkes-type ATPases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 276, 19999-20004.
200. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R. *et al.* (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.*, 7, 562-578.
201. Tsao, S.W., Rudd, B.A., He, X.G., Chang, C.J. & Floss, H.G. (1985). Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J. Antibiot.*, 38, 128-131.
202. Ueda, K., Tomaru, Y., Endoh, K. & Beppu, T. (1997). Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*. *J. Antibiot.*, 50, 693-695.
203. Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S. & McDowall, K.J. (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 58, 131-150.

## Referencias

---

204. van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S. & Anné, J. (1998). Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. . *Microbiology*, 144, 3351-3358.
205. Vijgenboom, E. & Keijser, B. (2002). Copper and the morphological development of *Streptomyces* In: *Handbook of copper pharmacology and toxicology* (ed. Massaro, EJ). Humana Press New Jersey.
206. Vijgenboom, E., Woudt, L.P., Heinstra, P.W.H., Rietveld, K., van Haarlem, J., van Wezel, G.P. *et al.* (1994). Three tuf-like genes in the kirromycin producer *Streptomyces ramocissimus*. *Microbiology*, 40, 983-998.
207. Vrancken, K. & Anné, J. (2009). Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*. *Future Medicine*, 4.
208. Waksman, S.A. & Henrici, A.T. (1943). The Nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 46, 337-341.
209. Waksman, S.A. & Woodruff, H.B. (1942). Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent particularly against Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 49, 207-209.
210. Wang, C., Ge, H., Dong, H., Zhu, C., Li, Y., Zheng, J. *et al.* (2007). A novel pair of two-component signal transduction system ecrE 1/ecrE 2 regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Biologia* 62, 511-516.
211. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. & Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? . *Arch. Microbiol.* , 176, 386-390.
212. Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M. & Ludwig, W. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Part A.*
213. Worrall, J.A., Machczynski, M.C., Keijser, B.J., di Rocco, G., Ceola, S., Ubbink, M. *et al.* (2006). Spectroscopic characterization of a high-potential lipo-

## Referencias

---

- cupredoxin found in *Streptomyces coelicolor*. . *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 14579-14589.
214. Worrall, J.A. & Vijgenboom, E. (2010). Copper mining in *Streptomyces*. Enzymes, natural products, and development. *Nat. Prod. Rep.* , 27, 742-756.
215. Yague, P., Lopez-Garcia, M.T., Rioseras, B., Sanchez, J. & Manteca, A. (2013a). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol. Lett.*, 342, 79-88.
216. Yagüe, P., Manteca, Á., Simon, A., Diaz-Garcia, M.E. & Sanchez, J. (2010). New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Appl. Environ. Microbiol*, 76, 3401-3404.
217. Yague, P., Rodriguez-Garcia, A., Lopez-Garcia, M.T., Martin, J.F., Rioseras, B., Sanchez, J. *et al.* (2013b). Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS one*, 8, e60665.
218. Yagüe, P., Willemse, J., Koning, R.I., Rioseras, B., López-García, M.T., Gonzalez-Quiñonez, N. *et al.* (2016). Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces* hyphae. *Nat. Commun.*, 7, 12467.
219. Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H. *et al.* (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. . *Microbiology*, 151, 2899-2905.
220. Yang, H.Y. & Chen, C.W. (2009). Extracellular and intracellular polyphenol oxidases cause opposite effects on sensitivity of *Streptomyces* to phenolics: a case of double-edged sword. *PLoS one*, 4, e7462.
221. Yang, Y.H., Kim, J.N., Song, E., Kim, E., Oh, M.K. & Kim, B.G. (2008). Finding new pathway-specific regulators by clustering method using threshold

standard deviation based on DNA chip data of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 709-717.

222. Yang, Y.H., Song, E., Kim, J.N., Lee, B.R., Kim, E.J., Park, S.H. *et al.* (2012). Characterization of a new ScbR-like  $\gamma$ -butyrolactone binding regulator (SlbR) in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 113-121.
223. Zhang, L., Li, W.C., Zhao, C.H., Chater, K.F. & Tao, M.F. (2007). NsdB, a TPR-like-domain-containing protein negatively affecting production of antibiotics in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Weishengwu Xuebao*, 47, 849-854.
224. Zhang, L., Ou, X., Zhao, G. & Ding, X. (2008). Highly efficient in vitro site-specific recombination system based on *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 integrase. *J. Bacteriol.*, 190, 6392-6397.
225. Zhang, L., Zhu, B., Dai, R., Zhao, G. & Ding, X. (2013). Control of directionality in *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 integrase-mediated site-specific recombination. *PloS one*, 8, e80434.