



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Oncología  
Molecular**

**Los operones *SCO1897-1901* y *SCO2102-2103*  
modulan la diferenciación y el metabolismo  
secundario de *Streptomyces coelicolor***

**Gemma Fernández García**

**Noviembre, 2022.**

**TESIS DOCTORAL**









**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**TESIS DOCTORAL**

**Los operones *SCO1897-1901* y *SCO2102-2103*  
modulan la diferenciación y el metabolismo  
secundario de *Streptomyces coelicolor***

Gemma Fernández

Ángel Manteca

Carlos Olano

Paula Yagüe





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Los operones <i>SCO1897-1901</i> y <i>SCO2102-2103</i> modulan la diferenciación y el metabolismo secundario de <i>Streptomyces coelicolor</i> .	Inglés: <i>SCO1897-1901</i> and <i>SCO2102-2103</i> operons modulate <i>Streptomyces coelicolor</i> differentiation and secondary metabolism
2.- Autor	
Nombre: Gemma Fernández García	DNI/Pasaporte/
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

*Streptomyces* es una bacteria no patógena del suelo caracterizada por un ciclo de vida complejo que incluye procesos de muerte celular programada, diferenciación y esporulación. Desde el punto de vista aplicado, *Streptomyces* produce dos tercios de los antibióticos y otros compuestos bioactivos de interés en biomedicina.

El objetivo principal de esta tesis fue profundizar en el conocimiento de las rutas moleculares que regulan el desarrollo de *Streptomyces* y la activación del metabolismo secundario. Para ello creamos una colección de mutantes aleatorios con el fin de encontrar nuevos reguladores de la diferenciación y del metabolismo secundario. Nos centramos en caracterizar dos de los mutantes con los fenotipos más destacados, aquellos mutados en los genes *SCO2102* y *SCO1897*.

*SCO2102* se cotranscribe con *SCO2103* y la expresión de ambos está regulada al alza durante la esporulación. Hicimos los *knockouts* en cada uno de estos genes por separado mediante CRISPR-Cas9. El *knockout*  $\Delta$ *SCO2102* muestra un retraso importante en la esporulación mientras que el *knockout*  $\Delta$ *SCO2103* no es capaz de esporular. Ambos mutantes tienen alterada la producción de antibióticos. El gen *SCO2102* porta un dominio DnaA II. DnaA (*SCO3879*) es la proteína de iniciación de la replicación cromosómica. Está formada por cuatro dominios, siendo el dominio II el de interacción proteína-proteína y este es el dominio presente en *SCO2102*. *SCO2102* colocaliza con la proteína de división celular FtsZ en el divisoma durante la esporulación. *SCO2103* codifica para una metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), un enzima que participa en la biosíntesis de metionina y de dTMP necesario para la síntesis de ADN. Hemos comprobado que el *knockout*  $\Delta$ *SCO2103* es auxótrofo para metionina. Postulamos que el déficit de dTMP en el *knockout*  $\Delta$ *SCO2103* podría traducirse en una menor cantidad de ADN cromosómico en sus hifas, lo cual fue corroborado mediante la medida directa del ADN en las hifas. *SCO2103* es la primera



MTHFR esencial para la esporulación de *Streptomyces*. Por otro lado, comprobamos que SCO2102 siempre colocaliza con SCO2103, y que SCO2102 es esencial para el posicionamiento de la MTHFR SCO2103 en las hifas esporulantes de *Streptomyces*. Planteamos un modelo en el que SCO2102 posiciona a SCO2103 junto FtsZ en el divisoma de las hifas en esporulación, lo que facilita la biosíntesis de nucleótidos necesaria para la replicación masiva del ADN cromosómico que acompaña la esporulación.

El mutante *SCO1897::Tn5* tiene afectadas la germinación, el metabolismo secundario y la esporulación. Hemos diseñado distintos experimentos de complementación para intentar restaurar el fenotipo de este mutante incluyendo el gen interrumpido por Tn5, *SCO1897* y los cuatro genes que se encuentran aguas abajo de *SCO1897*, cuya expresión podría verse afectada por la inserción del transposón. Estos experimentos de complementación nos permitieron descubrir que plásmidos integrativos  $\Phi$ BT1, que se integran en el gen *SCO4848*, potencian mucho los fenotipos del mutante *SCO1897::Tn5*. La expresión de los genes *SCO4848/4849* está reducida en el mutante, y se bloquea completamente por la inserción de un plásmido integrativo  $\Phi$ BT1. *SCO4849* codifica para una proteína que porta un posible dominio fosfatasa. Esta fue la primera pista de que el fósforo podría estar implicado en el fenotipo del mutante. Experimentos de *single cell* ICP-MS revelaron que las esporas del mutante acumulan niveles muy altos de fósforo, y además, los fenotipos del mutante se ven alterados en medios de cultivo sin fósforo, lo que de nuevo apunta a un efecto del fósforo en la modulación de los fenotipos del mutante. Todos los fenotipos del mutante se complementaron con los genes *SCO1897* y sus cuatro genes aguas abajo (clonados en un vector integrativo  $\Phi$ C31). Aún estamos trabajando en la identificación del gen o genes responsable/s de los fenotipos observados y los mecanismos biomoleculares que controlan estos fenotipos.

### RESUMEN (en Inglés)

*Streptomyces* is a nonpathogenic soil bacterium characterized by a complex life cycle that includes processes of programmed cell death, differentiation, and sporulation. From a different point of view, *Streptomyces* produces two thirds of the antibiotics and other bioactive compounds of interest in biomedicine.

The main objective of this thesis was to contribute to understand the regulation of *Streptomyces* differentiation and secondary metabolism activation. We made a collection of random mutants in order to find new regulators of differentiation and secondary metabolism. We focused on characterizing the *SCO2103::Tn5* and *SCO1897::Tn5* mutants that show important alterations in germination, the activation of secondary metabolism and sporulation.





*SCO2102* co-transcripts with *SCO2103* and both are highly expressed during sporulation. We made the knockout for each gene using CRISPR-Cas9. The  $\Delta$ *SCO2102* knockout shows a significant delay in sporulation while the  $\Delta$ *SCO2103* knockout is not capable of sporulation. Both mutants have impaired antibiotic production. The *SCO2102* gene has a DnaA II domain. DnaA (*SCO3879*) is the chromosome replication initiation protein. It is made up of four domains, with domain II being the protein-protein interaction domain. *SCO2102* co-localises with FtsZ, the first component of bacterial divisome, during sporulation. *SCO2103* encodes for a methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), an enzyme that participates in the biosynthesis of methionine and dTMP. We have verified that the  $\Delta$ *SCO2103* knockout is auxotrophic for methionine. We postulate that the dTMP deficiency in the  $\Delta$ *SCO2103* knockout could lead to a lower amount of chromosomal DNA in sporulating hypha, which was corroborated by direct measurement of chromosomal DNA in the  $\Delta$ *SCO2103* sporulating hyphae. *SCO2103* is the first MTHFR described to be essential for *Streptomyces* sporulation. On the other hand, *SCO2102* always colocalises with *SCO2103* and *SCO2102* is essential for the positioning of *SCO2103* in sporulating hyphae. We propose a model in which *SCO2102* positions *SCO2103* together with FtsZ at the sporulation divisome, which facilitates the nucleotide biosynthesis necessary for the massive chromosomal DNA replication that accompanies sporulation.

The *SCO1897::Tn5* mutant has affected germination, secondary metabolism and sporulation. We designed different complementation experiments to try to restore the phenotype of this mutant including the gene at which *Tn5* was inserted, *SCO1897*, as well as the 4 downstream genes, whose expression could be affected by the transposon insertion. These experiments allowed us to discover that  $\Phi$ BT1 integrative plasmids, that integrate into the *SCO4848* gene, enhance the *SCO1897::Tn5* mutant phenotypes. The *SCO4848/4849* gene expression is highly reduced in the mutant and totally blocked by the insertion of  $\Phi$ BT1 plasmids. *SCO4849* carries a possible phosphatase domain, which was the first clue that phosphorus might be involved in the mutant phenotype. Single cell ICP-MS analyses revealed that the *SCO1897::Tn5* spores accumulate high levels of phosphorous. Moreover, the *SCO1897::Tn5* phenotypes are highly affected in media without phosphorous, which against point to a role of the phosphorous concentration in the modulation of the *SCO1897::Tn5* phenotypes. All the mutant phenotypes were complemented with *SCO1897* and their 4 downstream genes (Cloned into a  $\Phi$ C31 integrative plasmid). We are still working on the identification of the gene/s responsible/s of the phenotypes observed and in the characterisation of the biomolecular pathways regulating these phenotypes.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

## I. INTRODUCCIÓN

<b>I.1. EL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>.....</b>	<b>1</b>
I.1.1. Contexto histórico.....	1
I.1.2. Características principales del género <i>Streptomyces</i> .....	1
I.1.3. Producción de antibióticos .....	3
a) Edad dorada de los antibióticos.....	3
b) Rutas silenciosas de producción de metabolitos secundarios .....	4
<b>I.2. CICLO DE VIDA DE <i>STREPTOMYCES</i>.....</b>	<b>5</b>
I.2.1. Ciclo de vida en medios sólidos esporulantes .....	5
a) Ciclo tradicional de desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio sólido.....	5
b) Nuevas fases del desarrollo previas a la diferenciación del micelio sustrato ....	7
I.2.2. Ciclo de vida en medio líquido .....	8
I.2.3. Ciclo de vida en condiciones naturales (suelos) .....	9
I.2.4. Muerte celular programada.....	10
I.2.5. Latencia y germinación de las esporas de <i>Streptomyces</i> .....	11
<b>I.3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE <i>STREPTOMYCES</i> .....</b>	<b>15</b>
I.3.1. Germinación.....	20
I.3.2. Diferenciación del MI al MII sustrato.....	21
I.3.3. Diferenciación del MII sustrato al MII aéreo esporulante .....	22
I.3.4. Esporulación.....	23
I.3.5. Reguladores del metabolismo secundario.....	26
I.3.6. Control global por fósforo del desarrollo y la producción de antibióticos en <i>Streptomyces</i> .....	27

<b>I.4. MUTAGÉNESIS ALEATORIA EN <i>STREPTOMYCES</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>I.5. REPLICACIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO DE <i>STREPTOMYCES</i> .....</b>	<b>32</b>
a) Proteína DnaA .....	32
b) Efecto de las metiltetrahidrofolato reductasas en la síntesis de metionina y ADN .....	34
<b>II. METODOLOGÍA .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>II.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....</b>	<b>39</b>
II.1.1. Cepas utilizadas .....	39
II.1.2. Medios de cultivo utilizados para <i>E. coli</i> .....	40
II.1.3. Medios de cultivo utilizados para <i>S. coelicolor</i> .....	41
II.1.4. Condiciones de cultivo y conservación de <i>E. coli</i> .....	43
II.1.5. Condiciones de cultivo y conservación de <i>Streptomyces</i> .....	44
<b>II.2. OBTENCIÓN, ANÁLISIS FENOTÍPICO, VALIDACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES ALEATORIOS EN <i>S. COELICOLOR</i> M145 .....</b>	<b>47</b>
II.2.1. Obtención de mutantes insercionales aleatorios en <i>S. coelicolor</i> M145. ..	47
II.2.2. Análisis fenotípico de mutantes insercionales de <i>S. coelicolor</i> M145. ....	48
II.2.3. Identificación del sitio de integración del transposón en los mutantes insercionales de <i>S. coelicolor</i> M145. ....	49
II.2.4. Procedimiento general para la clonación de fragmentos de ADN, purificación y conservación de plásmidos. ....	52
<b>II.3. ESTUDIO DE LOS GENES <i>SCO2102</i> Y <i>SCO2103</i> .....</b>	<b>53</b>
II.3.1. Mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	53
II.3.2. Diseño de las construcciones de complementación de los mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	55
II.3.3. Conjugación de las construcciones de complementación.....	59
II.3.4. Comprobación del sitio de integración $\phi$ BT1 en el vector pNG3 .....	60

II.3.5. Diseño de las proteínas SCO2102 y SCO2103 fusionadas a proteínas fluorescentes.....	61
II.3.6. Microscopía láser confocal y de fluorescencia .....	65
II.3.7. Cuantificación de la producción de antibiótico y de proteína.....	65
II.3.8. Cuantificación ADN cromosómico .....	66
II.3.9. Extracción de ARN total .....	67
II.3.10. Síntesis de ADN complementario mediante transcripción inversa .....	68
II.3.11. Análisis de la expresión de los genes mediante PCR cuantitativa .....	68
II.3.12. Análisis de secuencias de SCO2102, SCO2103 y dnaA.....	69
<b>II.4. ESTUDIO DE LOS GENES <i>SCO1897-SCO1901</i>.....</b>	<b>70</b>
II.4.1. Diseño de las construcciones de complementación del mutante <i>SCO1897::Tn5</i> .....	73
II.4.2. Microscopía láser confocal y de fluorescencia .....	75
II.4.3. Análisis del diámetro de las esporas durante la fase de hinchamiento de la germinación .....	76
II.4.4. Cuantificación de esporas germinadas .....	76
II.4.5. Cuantificación de la producción de antibiótico y de proteína.....	77
II.4.6. Extracción de ARN total .....	77
II.4.7. Síntesis de ADN complementario mediante transcripción inversa .....	77
II.4.8. Análisis de la expresión de los genes <i>SCO1897-1901</i> y <i>SCO4848</i> mediante PCR cuantitativa .....	77
II.4.9. Cuantificación de fósforo en esporas .....	78
II.4.10. Resistencia de esporas a condiciones fisicoquímicas .....	81
II.4.11. Análisis de secuencias del gen <i>SCO1897</i> .....	82
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>83</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>

<b>IV.1. LIBRERÍA DE MUTANTES ALEATORIOS .....</b>	<b>89</b>
<b>IV.2. MUTANTE <i>SCO2103::Tn5</i> .....</b>	<b>91</b>
IV.2.1. Fenotipo del mutante <i>SCO2103::Tn5</i> .....	91
IV.2.2. Inserción de Tn5 en el mutante <i>SCO2103::Tn5</i> .....	92
IV.2.3. Los genes <i>SCO2102</i> y <i>SCO2103</i> se encuentran altamente conservados en <i>Streptomyces</i> .....	93
IV.2.4. Los genes <i>SCO2102</i> y <i>SCO2103</i> se expresan durante la esporulación .....	95
IV.2.5. Fenotipo de los mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	96
IV.2.6. Expresión y regulación génica de los genes <i>SCO2102</i> y <i>SCO2103</i> .....	99
IV.2.7. Complementación de los mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	101
IV.2.8. Producción de antibiótico en los mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	103
IV.2.9. <i>SCO2102</i> colocaliza con FtsZ durante la esporulación .....	104
IV.2.10. <i>SCO2102</i> y <i>SCO2103</i> colocalizan durante la esporulación .....	107
IV.2.11. Cuantificación de ADN cromosómico en los mutantes $\Delta$ <i>SCO2102</i> y $\Delta$ <i>SCO2103</i> .....	109
<b>IV.3 MUTANTE <i>SCO1897::Tn5</i> .....</b>	<b>110</b>
IV.3.1 Inserción del transposón en el mutante <i>SCO1897::Tn5</i> .....	110
IV.3.2. Complementación del mutante <i>SCO1897::Tn5</i> .....	114
IV.3.3. El mutante <i>SCO1897::Tn5</i> tiene afectada la morfología de las esporas, la fase de hinchamiento de las esporas durante la germinación y el tiempo de germinación .....	115
IV.3.4. La Resistencia de las esporas al calor, sonicación, lisozima, ácido y congelación está afectada en el mutante <i>SCO1897:: Tn5</i> .....	118
IV.3.5. Esporulación del mutante <i>SCO1897:: Tn5</i> y sus cepas de complementación .....	120
IV.3.6. Producción de antibiótico del mutante <i>SCO1897:: Tn5</i> y sus cepas de complementación .....	121

IV.3.7. El fenotipo del mutante <i>SCO1897::Tn5</i> está afectado por plásmidos integrativos tipo $\Phi$ BT1 .....	123
IV.3.8. El mutante <i>SCO1897::Tn5</i> acumula fósforo en las esporas.....	125
IV.3.9. La mutación de los genes <i>SCO4848/ 4849</i> potencia los fenotipos del mutante <i>SCO1897::Tn5</i> .....	129
IV.3.10. La expresión de los genes <i>SCO4848/4849</i> está disminuida en el mutante <i>SCO1897::Tn5</i> .....	131
IV.3.11. Germinación de las cepas salvaje y mutante en medios de cultivo con y sin fósforo.....	132
IV.3.12. Homologías, conservación y posibles funciones de los genes <i>SCO1897-1901</i> .....	133
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>A) <i>SCO2102</i> Y <i>SCO2103</i> SON ESENCIALES PARA LA ESPORULACIÓN DE <i>STREPTOMYCES</i>.....</b>	<b>137</b>
V.1. LA EXPRESIÓN DE <i>SCO2102</i> Y <i>SCO2103</i> ESTÁ ALTAMENTE REGULADA E INCLUYE, AL MENOS, DOS PROMOTORES Y UN TERMINADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN CONDICIONAL.....	137
V.2. <i>SCO2102</i> COLOCALIZA CON FtsZ Y CON <i>SCO2103</i> DURANTE LA ESPORULACIÓN .....	138
V.3. LA INSERCIÓN DEL DOMINIO DnaAII DE <i>STREPTOMYCES</i> PODRÍA ESTAR RELACIONADA CON EL POSICIONAMIENTO DE DnaA Y OTRAS PROTEÍNAS EN EL DIVISOMA DE LAS HIFAS ESPORULANTES.....	139
V.4. LOS MUTANTES $\Delta$ <i>SCO2102</i> Y $\Delta$ <i>SCO2103</i> TIENEN AFECTADA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO .....	142
V.5. MODELO ILUSTRANDO LA DINÁMICA E INTERACCIÓN ENTRE FTSZ, <i>SCO2102</i> Y <i>SCO2103</i> DURANTE LA ESPORULACIÓN .....	142

<b>B) <i>SCO1897-1901</i> MODULAN LA GERMINACIÓN Y ACUMULACIÓN DE FÓSFORO EN LAS ESPORAS, ASÍ COMO EL METABOLISMO SECUNDARIO Y LA ESPORULACIÓN.</b>	<b>144</b>
.....	
V.6. LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>SCO1897-1901</i> ES COMPLEJA Y MUY DESCONOCIDA .....	144
V.7. EL MUTANTE <i>SCO1897::Tn5</i> ACUMULA ALTOS NIVELES DE POLIFOSFATO EN LAS ESPORAS LO QUE PODRÍA ESTAR MODULANDO LA GERMINACIÓN .....	145
V.8. EL MUTANTE <i>SCO1897::Tn5</i> TIENE ALTERADOS EL METABOLISMO SECUNDARIO Y LA ESPORULACIÓN .....	146
V.9. IMPORTANCIA DEL MUTANTE <i>SCO1897::Tn5</i> .....	147
V.10. COMPLEMENTACIÓN DE LOS FENOTIPOS DEL MUTANTE <i>SCO1897::Tn5</i> .	148
V.11. POSIBLES FUNCIONES DE LOS GENES <i>SCO1897-1901</i> Y EXPERIMENTOS FUTUROS .....	149
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>





# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Antibióticos descubiertos entre los años 1940 y 2000.

**Figura 2. (a)** Esquema de un corte transversal de la capa de micelio. **(b)** Ciclo de desarrollo clásico de *Streptomyces* en cultivos sólidos.

**Figura 3.** Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido.

**Figura 4.** Desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido.

**Figura 5.** Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en condiciones naturales (suelos).

**Figura 6.** Fases de la germinación de *Streptomyces*.

**Figura 7.** Principales rutas biomoleculares conocidas de los procesos de diferenciación en *Streptomyces*.

**Figura 8.** Modelo de la división celular en la esporulación en *Streptomyces*.

**Figura 9.** Transposón mini-tn5 en el vector replicativo pHL734 utilizado para mutagénesis aleatoria.

**Figura 10.** Esquema representativo de la proteína DnaA y sus dominios.

**Figura 11.** Esquema representativo de la síntesis de metionina en *Streptomyces*

**Figura 12.** Esquema representativo de la síntesis de dTMP.

**Figura 13. (a)** Esquema representativo de la posición de los promotores de *SCO2103*, y el terminador condicional. **(b)** Construcciones de complementación en los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ .

**Figura 14.** Construcciones de complementación en el mutante *SCO1897::Tn5*.

**Figura 15.** Fenotipo del mutante *SCO2103::Tn5* visto en microscopia de fluorescencia confocal.

**Figura 16.(a)** Fenotipo del mutante *SCO2103::Tn5* en placa macroscópica. **(b)** Producción de antibiótico del mutante *SCO2103::Tn5*.

**Figura 17.** Esquema representativo de la inserción del transposón Tn5 en la ORF de *SCO2103* y posición de los promotores P1 y P2.

**Figura 18.** Esquema representativo de la región genética *SCO2102* y *SCO2103*, homologías génicas y elementos reguladores.

**Figura 19.** Expresión del gen *SCO2102* y *SCO2103* en la cepa salvaje de *S. coelicolor*.

**Figura 20.** Esporulación y ausencia de la misma en cultivos sólidos de los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ .

**Figura 21.** Esporulación de la cepa salvaje,  $\Delta SCO2103$  y  $\Delta SCO2102$  en cultivos sólidos.

**Figura 22.** Abundancia de los transcritos de *SCO2102* y *SCO2103*.

**Figura 23.** Tiempo de esporulación en cultivos sólidos GYM de los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$  y sus cepas complementadas.

**Figura 24.** Producción de antibióticos en los mutantes  $\Delta SCO2102$ ,  $\Delta SCO2103$  y sus cepas complementadas.

**Figura 25.** Imágenes de FtsZ-eGFP y *SCO2102*-mCherry en fase de esporulación visto en cultivos sólidos en medio SFM.

**Figura 26.** Imágenes de la cepa salvaje de *S. coelicolor* FM145 sin las proteínas fluorescentes.

**Figura 27.** Imágenes de *SCO2102*-mCherry y *SCO2103*-eGFP expresados en la cepa salvaje de *S. coelicolor* durante la fase de esporulación en cultivos sólidos en medio SFM.

**Figura 28.** Cantidad de ADN cromosómico en las hifas esporulantes de la cepa salvaje y los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ .

**Figura 29. (a)** Esquema representativo de la región genética de los genes *SCO1897-1901*. Conformaciones de los terminadores/ antiterminadores de los distintos posibles terminadores condicionales identificados y abundancia de los transcritos de la región génica *SCO1897-1901*.

**Figura 30.** Construcciones de complementación del mutante *SCO1897::Tn5*.

**Figura 31. (a)** Morfología de las esporas de las cepas WT, *SCO1897:: Tn5*, *SCO1897:: Tn5 [pRASK 1897]* y *SCO1897:: Tn5 [pRASK SCO1897-1901]* vistas en microscopia confocal y en experimentos de *time lapse*. **(b)** Gráfica del diámetro de las esporas después de germinar.

**Figura 32. (a)** Morfología de las esporas de las cepas WT, y *SCO1897:: Tn5* vistas en microscopia confocal y en experimento de *time lapse*. .

**Figura 33.** Resultados del experimento de resistencia de las esporas en las cepas: WT, WT [pRASK], *SCO1897::Tn5*, *SCO1897::Tn5 [pRASK 1897]* y *SCO1897::Tn5 [pRASK 1897-1901]*.

**Figura 34.** Esporulación de la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas complementación en distintos tiempos (72, 78 y 96h).

**Figura 35.** Producción de antibióticos de la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas complementación y sus respectivos controles

**Figura 36. (a)** Esporulación de la cepa *SCO1897::Tn5 [pMS82]* visto en microscopía confocal. **(b)** Germinación de la cepa *SCO1897::Tn5 [pMS82]*.

**Figura 37.** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo por célula en la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas complementación y sus respectivos controles en experimentos de *single-cell*.

**Figura 38.** Resultados de las esporas vistas en citometría de flujo.

**Figura 39. (a)** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo por célula en la cepa salvaje frente al mutante *SCO1897::Tn5* en experimentos de *single-particle*. **(b)** Comparativa de los experimentos de *single cell vs single particle* del salvaje y del mutante.

**Figura 40.** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo en unidades relativas de las cepas WT, WT [pMS82], *SCO1897::Tn5* y *SCO1897::Tn5 [pMS82]*.

**Figura 41. (a)** Abundancia génica de *SCO4848* analizada en el salvaje en todos los tiempos en medio GYM, siendo el punto máximo de expresión las 24h. **(b)** Abundancia del gen de *SCO4848* en la cepa salvaje vs el mutante *SCO1897::Tn5*.



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Revisión de los principales reguladores de la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces*.

**Tabla 2.** Algunos sistemas de transposición utilizados en *Streptomyces*.

**Tabla 3.** Cepas utilizadas de *E. coli* y *S. Coelicolor* (A32) utilizadas en este trabajo.

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados en esta tesis.

**Tabla 5.** Plásmidos utilizados para el estudio del gen *SCO2102* y *SCO2103* con las construcciones de clonación.

**Tabla 6.** Plásmidos utilizados para el estudio de los genes *SCO1897-SCO1901* con las construcciones de clonación.

**Tabla 7.** Listado de cebadores utilizados en el estudio de los genes *SCO2102* y *SCO2103*

**Tabla 8.** Secuencia de la construcción sintetizada PP-*SCO2102*.

**Tabla 9.** Secuencias sintetizadas de proteínas fluorescentes.

**Tabla 10.** Tabla de la construcción sintetizada de P1.

**Tabla 11.** Listado de cebadores utilizados para el estudio de los genes *SCO1897-SCO1901*.

**Tabla 12.** Numero de mutantes Tn5 observados en esta tesis.



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido deoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**Bld:** Bald

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**Cda:** *Calcium-Dependent Antibiotic*

**CRP:** Proteína receptora de AMP cíclico

**GYM:** Glucose Yeast Malt extract

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

**IP:** yoduro de Propidio

**Kb:** Kilobases

**LB:** Luria Bertani

**MCP:** Muerte celular programada

**MM:** Medio mínimo

**MI:** Primer micelio

**MII:** Segundo micélio

**Pb:** pares de bases

**Poli-P:** Polifosfatos

**qPCR:** Quantitative PCR

**RNA:** Ácido ribonucleico

**Rpf:** Resuscitation- promoting factors

**SFM:** Soy Flavour Mannitol

**Tn:** Transposón

**TSB:** Tryptic Soy Broth





# **I. INTRODUCCIÓN**



### I.1. EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

#### I.1.1. Contexto histórico

Hasta principios del siglo XX, los actinomicetos pasaron desapercibidos para la ciencia aplicada pues solo se trataba de microorganismos del suelo que *a priori*, no tenían mucho que ofrecer. El primer *Streptomyces* fue descrito por Ferdinand Cohn en 1875. Mientras observaba distintos microorganismos, Cohn se fijó en uno con células ramificadas interconectadas, *Streptothrix foersteri* (revisado en Hopwood, 2007). El nombre de *Actinomyces* se remonta a 1877, cuando se designó como el agente causal de una enfermedad llamada *jumpy jaw* (mandíbula abultada) que afectaba al ganado y que, debido a la proliferación y distensión del hueso mandibular les impedía comer con normalidad. Carl Otto Harz lo describió como un hongo con filamentos finos que se distribuyen formando estructuras regulares en forma de rayos. De esta forma recibió el nombre de *Actinomyces bovis* (Hopwood, 2007). En esos tiempos, otro científico llamado Selman Waksman comenzó a investigar las propiedades bioquímicas del género *Actinomyces* y sus contribuciones a la fertilidad agrícola. Waksman fue el descubridor de la estreptomicina, el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos y el primer fármaco usado para el tratamiento de la tuberculosis y fue quien identificó a los actinomicetos como los productores más prolíficos de antimicrobianos de la naturaleza (Hopwood, 2007).

#### I.1.2. Características principales del género *Streptomyces*

*Streptomyces* es el género más amplio dentro del grupo Actinobacteria (Raja, 2011). Actualmente, de acuerdo con el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, hay más de 500 especies de *Streptomyces* (Parte et al., 2012) siendo *Streptomyces coelicolor* A3(2) la especie representativa del género (Bentley et al., 2002).

Algo sorprendente es que las bacterias del género *Streptomyces* se parecen en muchos aspectos a los hongos. Por ejemplo, ambos crecen como hifas ramificadas y se dispersan a través de esporas. Estas similitudes probablemente se deban a las

## I. INTRODUCCIÓN

---

adaptaciones a nichos ecológicos parecidos, aunque los mecanismos subyacentes tienen diferentes orígenes evolutivos (*Flardh and Buttner, 2009*). Al igual que los hongos, la mayoría de los estreptomicetos viven como microorganismos saprófitos en el suelo, no obstante, también pueden crecer en nichos acuáticos (*Flardh and Buttner, 2009*). Algunas cepas forman relaciones simbióticas con hongos, animales o plantas (*Seipke et al., 2012*), también hay cepas patógenas que infectan plantas (*Bignell et al., 2014*), e incluso algunos estreptomicetos se han descrito como patógenos humanos (*Kapadia et al., 2007*).

Los estreptomicetos son bacterias Gram positivas, con un cromosoma lineal de 8-9 Mb y, además, con un alto contenido en G+C (69- 78%) (*Hodgson, 2000, Hopwood, 2006*). Se conocen como “las bacterias del suelo” ya que este constituye su hábitat natural siendo capaces de descomponer una gran parte de compuestos orgánicos (*Hodgson, 2000*). También producen un compuesto volátil, geosmina, que es el responsable del olor característico a tierra húmeda (*Jiang et al., 2007*).

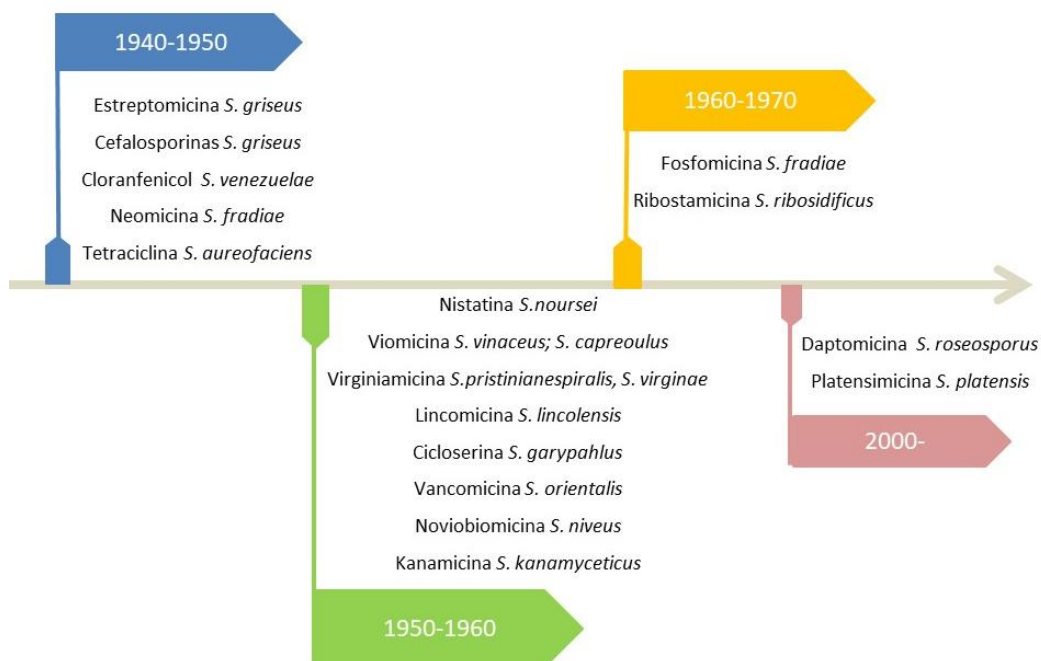
Son bacterias filamentosas con un complejo ciclo de vida que incluye procesos de diferenciación morfológica, muerte celular programada (MCP) y esporulación (*Chater, 1984*). Como se detallará más adelante, constituyen un modelo procariótico de multicelularidad (*Chater, 1993*).

Otro aspecto llamativo del género *Streptomyces* es su capacidad para producir compuestos bioactivos. La detección de nuevos metabolitos secundarios se realizó tradicionalmente mediante aislamientos de cepas, cultivos y bioensayos, un proceso tremendamente productivo durante la llamada "Edad de Oro" de los antibióticos (1940-1960) (*Sanchez et al., 2002*). Los estreptomicetos producen dos tercios de los antibióticos clínicamente útiles (*Raja, 2011*), así como otros compuestos bioactivos (inmunosupresores, antitumorales, antifúngicos, antiparasitarios, antivirales, entre otros).

## I.1.3. Producción de antibióticos

### a) Edad dorada de los antibióticos

La propiedad más atractiva de *Streptomyces* es la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos como antifúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivos y principalmente antibióticos e inmunosupresores (Procopio et al., 2012). La historia de los antibióticos derivados de *Streptomyces* comenzó con el descubrimiento de la estreptomicina, la cual se aisló de *Streptomyces griseus* (Schatz and Waksman, 1944). Se podría esperar que la estreptomicina fuera tóxica porque inhibe la síntesis de proteínas mediante su unión a los ribosomas, un proceso común a todas las formas de vida, pero sin embargo, no muestra afinidad por los ribosomas humanos (Hopwood, 2007), por lo que se pudo usar como tratamiento para la tuberculosis (Schatz and Waksman, 1944). Actualmente el uso de la estreptomicina está bastante limitado porque se ha demostrado que causa ototoxicidad y nefrotoxicidad (Ishiyama et al., 2005).



**Figura 1.** Antibióticos descubiertos entre los años 1940 y 2000. Se muestra la especie de procedencia del género *Streptomyces*. Esquema basado en de Lima Procopio et al. (2012).

## I. INTRODUCCIÓN

---

Con estos descubrimientos, los científicos intensificaron la búsqueda de antibióticos dentro del género, desembocando en la llamada edad dorada de los antibióticos en la que se descubrieron la mayoría de los antibióticos de utilidad en biomedicina (Figura 1). El 80% de los antibióticos provienen de actinomicetos, siendo los del género *Streptomyces*, los más importantes (*Raja, 2011, Procopio et al., 2012*)

### **b) Rutas silenciosas de producción de metabolitos secundarios**

El cromosoma lineal de *Streptomyces* está formado por 8.667.507 pares de bases, siendo uno de los genomas bacterianos de mayor tamaño (*Bentley et al., 2002*). Durante los últimos 20 años, la secuenciación masiva de genomas y las herramientas bioinformáticas han permitido detectar que el genoma de un *Streptomyces* típico codifica unas veinte rutas de producción de metabolitos secundarios, a pesar de que en el laboratorio sólo produce unas cuatro (*Onaka, 2017, Lee et al., 2020*). En *S. coelicolor*, los 7.825 genes predichos incluyen más de veinte grupos que codifican metabolitos secundarios conocidos o predichos en base a herramientas bioinformáticas (*Bentley et al., 2002*).

Las rutas de metabolitos secundarios que no han podido activarse en el laboratorio se denominan rutas crípticas o silenciosas. Activar estas rutas crípticas es uno de los principales retos en *Streptomyces*, con el fin de acceder a nuevos compuestos bioactivos potencialmente útiles en biomedicina (*revisado en Manteca and Yague, 2018*).

### I.2. CICLO DE VIDA DE *STREPTOMYCES*

#### I.2.1. Ciclo de vida en medios sólidos esporulantes

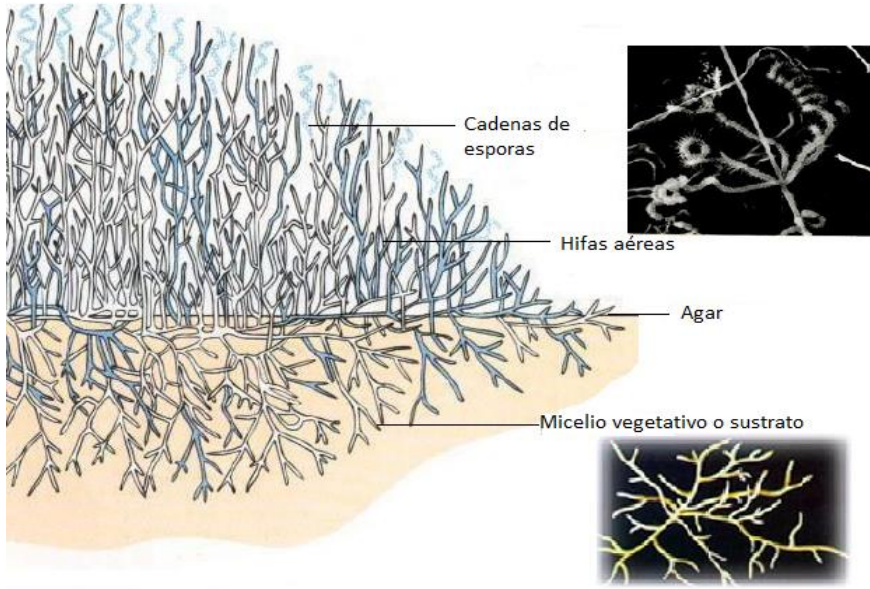
##### a) Ciclo tradicional de desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido

*Streptomyces* muestra un desarrollo complejo que implica crecimiento micelial, comportamiento multicelular, comunicación intercelular y diferenciación morfológica coordinada con varios procesos fisiológicos, como por ejemplo la activación del metabolismo secundario (McCormick and Flardh, 2012).

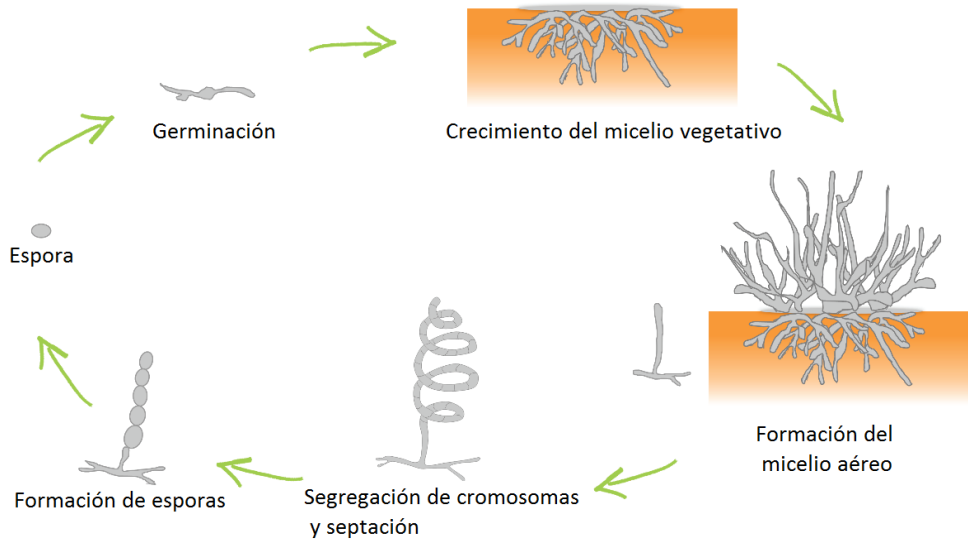
La fase vegetativa del crecimiento comienza por la germinación de una espora cuando ésta encuentra el entorno adecuado. La espora emite uno o más tubos germinativos que comienzan a crecer y ramificarse hasta formar redes miceliales llamadas micelio vegetativo o sustrato (McCormick and Flardh, 2012) (Figura 2a). El micelio vegetativo (o sustrato) en crecimiento explora el medio ambiente en busca de nutrientes disponibles, degradando los sustratos poliméricos encontrados por la secreción de enzimas hidrolíticas (Chater et al., 2010, McCormick and Flardh, 2012). La producción de antibióticos y otros compuestos bioactivos se coordina con el desarrollo de *Streptomyces* (Chater et al., 2010) de forma que lo protegen frente a la colonización por microorganismos competidores (Flardh and Buttner, 2009, McCormick and Flardh, 2012). Cuando el micelio sustrato se encuentra en condiciones adversas (falta de nutrientes), comienza la expresión de determinados genes implicados en el desarrollo del llamado micelio aéreo. El micelio aéreo crecerá obteniendo energía a partir de la degradación del micelio vegetativo (Miguélez et al., 1999). El micelio aéreo comienza a emerger en el aire formando una capa de hifas en la superficie de la colonia. Estas hifas están recubiertas por proteínas hidrofóbicas tales como chaplinas (chpA-H), rodlinas (rdlA/B), SapB, SapT, a modo de protección (McCormick and Flardh, 2012). El desarrollo de *Streptomyces* culmina con la fase de esporulación en la que las hifas del micelio aéreo comienzan a enrollarse en el extremo apical acompañado de la formación de septos de separación para dar lugar a cadenas de esporas unigenómicas (Claessen et al., 2006) (Figura 2b).

# I. INTRODUCCIÓN

a)



b)



**Figura 2. (a)** Esquema de un corte transversal de la capa de micelio, adaptado de Li et al. (Li et al., 2016). **(b)** Ciclo de desarrollo clásico de *Streptomyces* en cultivos sólidos, adaptado de Law et al. (Law et al., 2019).



## I. INTRODUCCIÓN

---

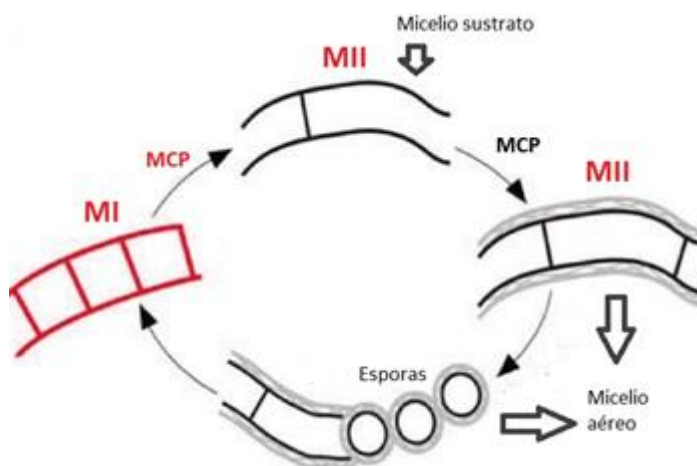
Las bacterias del género *Streptomyces* utilizan las esporas como medio de reproducción y dispersión. Estas esporas permanecen latentes hasta que encuentran las condiciones óptimas para germinar y dar lugar a un nuevo micelio que seguirá el ciclo de vida (Figura 2b).

Tanto el micelio sustrato como el aéreo son multinucleados con septos esporádicos que separan compartimentos celulares multigenómicos. Las esporas son el único estadio que representan compartimentos celulares unigenómicos (*Claessen et al., 2006, Flardh and Buttner, 2009*).

### **b) Nuevas fases del desarrollo previas a la diferenciación del micelio sustrato**

Durante los últimos 15 años, 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 et al., 2005b, Manteca and Sanchez, 2009*). Esta nueva fase, llamada primer micelio (MI), precede a la fase de micelio sustrato, y consiste en un micelio joven, totalmente compartimentalizado (Figura 3). Los tabiques del MI están formados en su mayoría por membranas celulares sin pared celular (peptidoglicano) (*Yague 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, Manteca et al., 2005b*). Los segmentos viables de este micelio comienzan a crecer y se diferencian a 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 comienza a crecer en el aire y expresar las cubiertas hidrofóbicas. 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, Manteca et al., 2006*). (Figura 3).



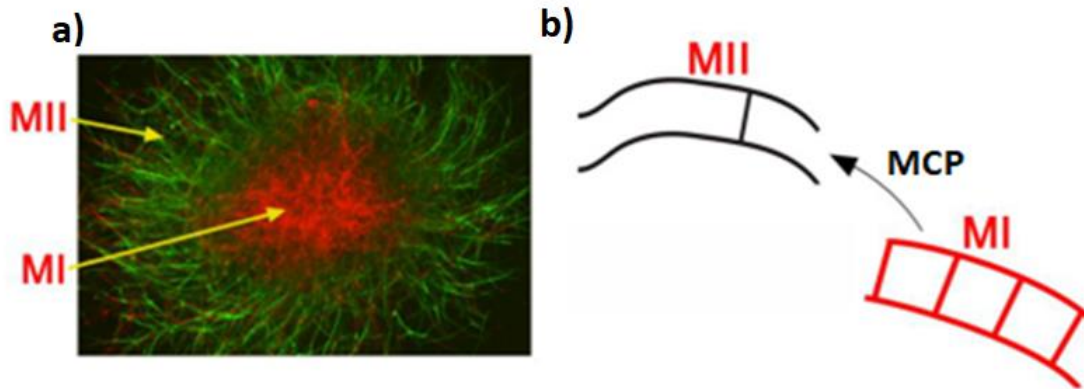
**Figura 3.** Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido. En rojo, se señalan las fases del ciclo descritas por nuestro grupo de investigación. MI: primer micelio; MCP: muerte celular programada; MII: segundo micelio. Adaptado de Yagüe *et al.* (2014).

### I.2.2. Ciclo de vida en medio líquido

A pesar de que la producción industrial de antibióticos se realiza principalmente en matraces o biorreactores, la mayoría de los estreptomicetos no esporulan en cultivos líquidos. Por lo tanto, se suponía que en estas condiciones no había diferenciación morfológica y la producción de antibióticos la realizarían las hifas del micelio sustrato tras una detención transitoria del crecimiento que no se entendía bien (Manteca *et al.*, 2008, Manteca and Yague, 2018).

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) (Figura 4). Sin embargo, en la mayoría de las cepas de *Streptomyces*, la formación de micelio aéreo y la esporulación están bloqueadas (Manteca *et al.*, 2008). La detención transitoria del crecimiento previa a la fase de producción se corresponde con la MCP del MI, y la fase de producción con el desarrollo del MII, al igual que ocurre en cultivos sólidos (Manteca and Yague, 2018). De esta forma se demostró que en cultivos líquidos existe una diferenciación

comparable a la de los cultivos sólidos, y que la diferenciación del MII se correlaciona con la producción de metabolitos secundarios (Manteca *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido. **(a)** Pellet de *Streptomyces antibioticus* en medio líquido, visto con microscopía láser-confocal (tinción con SYTO9 y yoduro de propidio (IP)). **(b)** Esquema ilustrando la diferenciación del MI (primer micelio compartimentalizado) al MII: (segundo micelio multinucleado). Tomado de Yagüe *et al.* (2014).

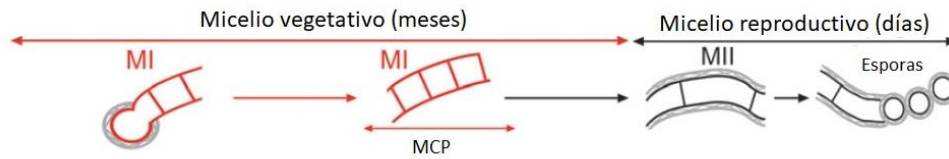
### I.2.3. Ciclo de vida en condiciones naturales (suelos)

Recreando las condiciones naturales, (crecimiento en tierra), las esporas de *Streptomyces* germinan lentamente (no antes de 7 días) y de manera muy asincrónica ya que, por ejemplo, a los 20 días de cultivo en tierra fértil no suplementada aún quedan esporas sin germinar. Además, el micelio puede permanecer en fase de MI hasta un mes, sin llegar a formar *pellets* densos y sin procesos de MCP ni evolución hacia un MII o esporulación (Manteca and Sanchez, 2009) (Figura 5).

Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que *Streptomyces* habita en los suelos naturales principalmente en forma de MI. Únicamente, en la fase previa a la esporulación, cuando se divide el material genómico, tendría lugar una fase transitoria de crecimiento rápido de MI a MII multinucleado productor de metabolitos que precede la formación de las esporas que probablemente no será tan abundante como

## I. INTRODUCCIÓN

la que se produce en medios de cultivo de laboratorio (Manteca and Sanchez, 2009, Yagüe et al., 2013a).



**Figura 5.** Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en condiciones naturales (suelos). MI: primer micelio; MII: segundo micelio; MCP: muerte celular programada. Tomado de Yagüe et al. (2013a)

### I.2.4. Muerte celular programada

El término “muerte celular programada” se refiere a cualquier forma de muerte celular mediada por un programa de mecanismos moleculares específicos. Tradicionalmente la MCP se asociaba con organismos multicelulares eucariotas (apoptosis). Más recientemente se demostró la existencia de una muerte celular programada en bacterias como por ejemplo, ha sido caracterizado en *Escherichia coli* o en *Bacillus subtilis* (Engelberg-Kulka et al., 2006). La MCP bacteriana está genéticamente regulada, aunque su mecánica y sus características morfológicas difieren en gran medida de la apoptosis eucariota.

*Streptomyces* tiene dos rondas de MCP en cultivos sólidos. Una primera ronda que afecta al MI y precede a la diferenciación del MII (Manteca et al., 2007, Manteca et al., 2006), y una segunda ronda de MCP que precede la formación del micelio aéreo y esporulación (Miguélez et al., 1999, Manteca et al., 2006). Ambos eventos de MCP siguen un patrón morfológico sucesivo (Miguélez et al., 1999, Manteca et al., 2005b), que engloba la activación de enzimas hidrolíticas como proteasas, peptidasas, muramidasa y nucleasas encargadas del desmantelamiento celular (Nicieza et al., 1999, Manteca et al., 2006, Manteca et al., 2007, Yagüe et al., 2010).

## I. INTRODUCCIÓN

---

El número de rondas de MCP en *Streptomyces* depende de las condiciones de cultivo. Mientras que en cultivos sólidos confluentes hay dos rondas (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 and Sanchez, 2009). Sin embargo, en cultivos líquidos hay una única ronda de MCP (Manteca et al., 2008), que se produce entre la fase vegetativa de MI de la fase productora de metabolitos secundarios (MII) y que es responsable de la detención transitoria del crecimiento que precede la producción de metabolitos secundarios (Yagüe et al., 2010, Rioseras et al., 2014).

Algunos autores consideran que las bacterias con un ciclo de vida complejo, entre las que se encuentran los estreptomicetos, podrían ser el origen evolutivo de algunos de los mecanismos apoptóticos de eucariotas (Nicieza et al., 1999, Kaczanowski, 2016).

### **I.2.5. Latencia y germinación de las esporas de *Streptomyces***

Los microorganismos que viven en el suelo, como es el caso de *S. coelicolor*, están expuestos continuamente a agentes adversos como la temperatura, o la escasez de nutrientes. Una estrategia de supervivencia importante para muchas bacterias y hongos frente a tales tensiones fisiológicas es la transición de las células a un estado latente, en el cual detienen su crecimiento, interrumpen la replicación e inician un estado con actividad metabólica limitada o su estancamiento completo (Bobek et al., 2017, Cihak et al., 2017).

Los estreptomicetos producen una gran cantidad de esporas recubiertas de una capa hidrofóbica relativamente gruesa, resistente a la desecación que no solo protege el contenido celular y la información genética durante condiciones desfavorables, sino que, también está adaptada para la dispersión de las esporas por el viento (Hirsch and Ensign, 1976, Bobek et al., 2017).

## I. INTRODUCCIÓN

---

La salida de la latencia es más rápida y exitosa en presencia de nutrientes y estímulos específicos. Todas las macromoléculas necesarias para la germinación han sido pre-sintetizadas antes de la entrada en latencia (*Bobek et al., 2017*). Se han probado varios estímulos como inductores de germinación, como el choque térmico, la abrasión mecánica y la presencia de nutrientes (*Cihak et al., 2017*), pero los mecanismos de señalización o regulación esenciales para desencadenar la germinación siguen siendo muy desconocidos (*Strakova et al., 2013a*).

Para germinar, las esporas necesitan encontrar las condiciones óptimas. En su interior, contienen sustancias de reserva como moléculas de trehalosa o polifosfatos (poli-P) acumulados en gránulos de volutina (*Strakova et al., 2013a*). La trehalosa puede jugar además un papel significativo en la protección frente a la deshidratación ya que protege la integridad de las membranas biológicas al interactuar con los grupos polares de los fosfolípidos de membrana (*McBRIDE and Ensign, 1987*).

En *Streptomyces* se han descrito tres etapas de germinación: oscurecimiento, hinchamiento y emergencia del tubo germinativo (*Hardisson et al., 1978, Süssstrunk et al., 1998*) (Figura 6).

### **a) Oscurecimiento**

En esta etapa las esporas cambian su apariencia de “brillante” a “oscuro”. Este cambio en la refractabilidad se debe a una mayor hidratación del citoplasma (*Elliot and Flärdh, 2012*) provocando la pérdida de resistencia al calor (*Salas et al., 1983*). Señales aún no bien conocidas desencadenan la entrada de agua en las esporas. El oscurecimiento requiere la presencia de cationes bivalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , y  $\text{Fe}^{+2}$  (*Bobek et al., 2017*) al igual que depósitos de energía de la espora como por ejemplo las reservas de trehalosa (*Elliot and Flärdh, 2012*).

### **b) Hinchamiento**

La continua entrada de agua hace que las esporas se hinchen pasando a la fase de hinchamiento. Los niveles de glucosa aumentan debido a la hidrólisis de trehalosa. Los niveles de ATP intracelular también aumentan durante esta fase de hinchamiento.

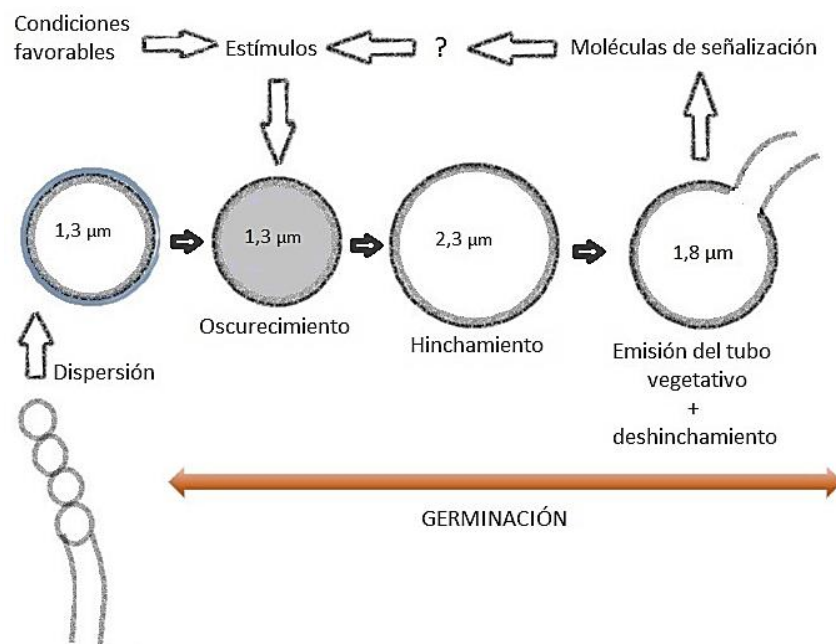
La hidratación del citoplasma favorece la reactivación de una variedad de proteínas y ribosomas que se conservaban en estado de latencia (*Cowan et al., 2003*). Las proteínas recuperan su conformación activa con ayuda de chaperonas (*Bobek et al., 2017*). Entre los 30-60 minutos del inicio de la germinación, los ribosomas presentes ya son completamente funcionales traduciendo proteínas a partir de los RNA mensajeros (*Strakova et al., 2013b, Bobek et al., 2017*). En esta etapa, las esporas ya son metabólicamente activas pudiendo utilizar fuentes de energía internas, como la trehalosa no solo para la síntesis de proteínas, sino también para la primera replicación de ADN, que ocurre justo antes o simultáneamente con la aparición del tubo germinativo (*Bobek et al., 2017*). Posteriormente, las esporas pueden adecuar sus vías metabólicas a las fuentes de nutrientes externas.

La regulación de la fase de hinchamiento es muy desconocida. Recientemente, en nuestro grupo de investigación descubrimos la carboxipeptidasa SCO4439 que modula la formación de enlaces cruzados en el peptidoglicano participando así en la fase de hinchamiento. Una cepa mutada en el gen que codifica esta carboxipeptidasa tiene menos enlaces cruzados en el peptidoglicano de la pared celular, lo que hace que sus esporas se hinchen más del triple que las de la cepa salvaje. Además, se descubrió una nueva fase consistente en el deshinchamiento de la espora una vez que emerge el tubo germinativo, que es muy evidente en la cepa mutada en el gen *SCO4439*, pero que también está presente en la cepa silvestre (*Rioseras et al., 2016*). Estos resultados indican que la entrada de agua en las esporas durante el hinchamiento, lejos de ser un proceso meramente pasivo, está altamente regulada. La disminución de los enlaces cruzados (y por tanto de la resistencia del peptidoglicano) en la cepa carente del gen *SCO4439*, desregula la entrada de agua en la espora, desencadenando un hinchamiento totalmente desproporcionado (*Rioseras et al., 2016*).

## c) Emergencia del tubo germinativo

Tras las fases de hinchamiento y deshinchamiento comienza la emisión del tubo germinativo y el crecimiento vegetativo. Los tubos germinativos aún no están septados y surgen de la pared interna de la espora y prosperan a través de la capa más externa (Bobek et al., 2017).

La emisión del tubo germinativo se da una vez finalizada la fase de hinchamiento (Hardisson et al., 1978, Süssstrunk et al., 1998). No obstante, el mutante generado en nuestro grupo de investigación en el gen *SCO4439*, demuestra que ambos procesos pueden desacoplarse, ya que en este mutante las esporas emiten el tubo germinativo mucho antes de que finalice su hinchamiento (Rioseras et al., 2016). Como en las etapas anteriores de germinación, el conocimiento sobre la regulación de la emergencia del tubo germinativo es muy escasa.



**Figura 6.** Fases de la germinación de *Streptomyces*. Tomado de González-Quñonez, N. (2018).



### I.3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE *STREPTOMYCES*

Tal como se introdujo arriba (apartado I.2), una de las características principales del género *Streptomyces* es su complejo ciclo de desarrollo que incluye la germinación de las esporas, la diferenciación morfológica de un MI completamente compartimentalizado a un MII multinucleado con tabiques esporádicos que comprende los micelios sustrato y aéreo, y la esporulación. Además, hay una diferenciación fisiológica, del MI vegetativo en un MII productor de antibióticos. La regulación de la diferenciación morfológica y fisiológica de *Streptomyces* es extremadamente compleja. Las fases del desarrollo mejor caracterizadas en cuanto a su regulación son las fases de micelio aéreo y esporulación. La activación del metabolismo secundario en *Streptomyces* también está muy regulada mediante reguladores pleiotrópicos y otros específicos de ruta. En la Tabla 1 se enumeran algunos de los reguladores y efectores más importantes de la germinación, la tabicación de las hifas, la diferenciación del micelio aéreo, la esporulación y la activación del metabolismo secundario de *Streptomyces*.

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Revisión de los principales reguladores de la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces*. Adaptado de Claessen et al. (2006), (van Wezel and McDowall, 2011) y (Yague et al., 2014).

Gen	ID	Referencia
<b>Germinación</b>		
<i>crp</i>	SCO3751	(Bobek et al., 2017)
<i>divIVA</i>	SCO2077	(Strakova et al., 2013b)
<i>dnaK</i>	SCO3671	(Bobek et al., 2017)
<i>filP</i>	SCO5396	(Strakova et al., 2013b)
<i>ftsZ</i>	SCO2082	(Bobek et al., 2017)
<i>nepA</i>	SCO4002	(de Jong et al., 2009)
<i>ssgA</i>	SCO3926	(Noens et al., 2005)
<i>swIA</i>	SCO1240	(Haiser et al., 2009)
<i>swIB</i>	SCO4582	(Haiser et al., 2009)
<i>swIC</i>	SCO6773	(Haiser et al., 2009)
<i>rpfA</i>	SCO3097	(Haiser et al., 2009)
	SCO4439	(Rioseras et al., 2016)
<b>Genes implicados en la tabicación del MI</b>		
<i>ftsZ</i>	SCO2082	(Yague et al., 2016)
<b>Genes implicados en la tabicación del MII sustrato y aéreo</b>		
<i>ftsZ</i>	SCO2082	(Jakimowicz and van Wezel, 2012)
<i>sepX</i>	SCO3177	(Bush et al., 2022)

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Continuación.

Gen	ID	Referencia
<i>Genes cuya mutación genera un fenotipo bld</i>		
<i>bldB</i>	SCO5723	(Champness, 1988)
<i>bldC</i>	SCO4091	(Hunt et al., 2005)
<i>bldD</i>	SCO1489	(Claessen et al., 2006)
<i>bldG</i>	SCO3549	(Bignell et al., 2000)
<i>bldH</i>	SCO2792	(Takano et al., 2003)
<i>bldK</i>	SCO5112/5116	(Akanuma et al., 2011)
<i>bldM</i>	SCO4768	(Molle and Buttner, 2000)
<i>bldN</i>	SCO3323	(Bibb et al., 2000)
<i>Genes relacionados con la formación del micelio aéreo</i>		
<i>chpA</i>	SCO2716	(Claessen et al., 2003)
<i>chpB</i>	SCO7257	(Claessen et al., 2003)
<i>chpC</i>	SCO1674	(Claessen et al., 2003)
<i>chpD</i>	SCO2717	(Claessen et al., 2003)
<i>chpE</i>	SCO1800	(Claessen et al., 2003)
<i>chpF</i>	SCO2705	(Claessen et al., 2003)
<i>chpG</i>	SCO2699	(Claessen et al., 2003)
<i>chpH</i>	SCO1675	(Claessen et al., 2003)
<i>ramCSAB</i>	SCO6681-6684	(Keijser et al., 2002)
<i>rdIA</i>	SCO2718	(Claessen et al., 2003)
<i>rdIB</i>	SCO2719	(Claessen et al., 2003)

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Continuación.

Gen	ID	Referencia
<b><i>Genes relacionados con la esporulación</i></b>		
<i>dynA</i>	SCO2685	(Schlimpert et al., 2017b)
<i>dynB</i>	SCO2684	(Schlimpert et al., 2017b)
<i>ftsI</i>	SCO2090	(Jakimowicz and van Wezel, 2012)
<i>ftsL</i>	SCO2091	(Jakimowicz and van Wezel, 2012)
<i>ftsW</i>	SCO2085	(Jakimowicz and van Wezel, 2012)
<i>mreB</i>	SCO2611	(Burger et al., 2000)
<i>parA</i>	SCO3886	(Kim et al., 2000)
<i>parB</i>	SCO3887	(Kim et al., 2000)
<i>sepH</i>	SCO5855	(Ramos-Leon et al., 2021)
<i>ssgA</i>	SCO3926	(Kawamoto et al., 1997)
<i>ssgB</i>	SCO1541	(Kormanec and Sevcikova, 2002)
<i>whiE</i>	SCO5314-5621	(Davis and Chater, 1990)
<b><i>Reguladores con efecto negativo en el metabolismo secundario</i></b>		
<i>adpA</i>	SCO2792	(Takano et al., 2003)
<i>cdgA</i>	SCO2817	(Den Hengst et al., 2010)
<i>cprB</i>	SCO6071	(Onaka et al., 1998)
<i>cutRS</i>	SCO5862/5863	(Chang et al., 1996)
<i>dasR</i>	SCO5231	(Rigali et al., 2006)
<i>nsdA</i>	SCO5582	(Den Hengst et al., 2010)
<i>nsdB</i>	SCO7252	(Zhang et al., 2007)
<i>rrdA</i>	SCO1104	(Ou et al., 2009)
<i>siqQ</i>	SCO4908	(Shu et al., 2009)
<i>slbR</i>	SCO0608	(Yang et al., 2012)
<i>wblA</i>	SCO3579	(Kang et al., 2007)

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Continuación.

Gen	ID	Referencia
<b>Reguladores con efecto positivo en el metabolismo secundario</b>		
<i>absA1/2</i>	SCO3225/3226	(Anderson et al., 2001)
<i>absB</i>	SCO5572	(Price et al., 1999)
<i>absC</i>	SCO5405	(Hesketh et al., 2009)
<i>afsQ1/2</i>	SCO4907/4906	(Shu et al., 2009)
<i>absR1/2</i>	SCO6992/6993	(Park et al., 2000)
<i>actII-orf4</i>	SCO5085	(Gramajo et al., 1993)
<i>atrA</i>	SCO4118	(Uguru et al., 2005)
<i>cpkO</i>	SCO6280	(Pawlik et al., 2007)
<i>cprA</i>	SCO6312	(Onaka et al., 1998)
<i>ecrE1/2</i>	SCO6421/6422	(Wang et al., 2007)
<i>eshA</i>	SCO7699	(Saito et al., 2006)
<i>rapA1/2</i>	SCO5403/5404	(Lu et al., 2007)
<i>redD</i>	SCO5877	(Feitelson et al., 1985)
<i>redZ</i>	SCO5881	(Guthrie et al., 1998)
<i>relA</i>	SCO1513	(Chakraborty et al., 1996)
<i>relC</i>	SCO4648	(Ochi, 1990)
<i>rok7B7</i>	SCO6008	(Park et al., 2009)
<i>rshA</i>	SCO5794	(Sun et al., 2001)
<b>Genes relacionados con la homeostasis y el control global del fosfato</b>		
<i>phoP/R</i>	SCO4229/4230	(Santos-Beneit et al., 2009)
<i>pitH1</i>	SCO4138	(Martin and Liras, 2021)
<i>pitH2</i>	SCO1845	(Martin and Liras, 2021)
<i>ppK</i>	SCO4145	(Ghorbel et al., 2006)
<i>pstSCAB</i>	SCO4142/4141 /4140/4139	(Martin and Liras, 2021)

### I.3.1. Germinación

Durante las últimas dos décadas, se ha avanzado bastante en la comprensión de los mecanismos reguladores de la germinación, aunque tal como se indicó en el apartado anterior la regulación del proceso aún es muy desconocida.

NepA, una proteína hidrofóbica de bajo peso molecular que forma parte de la pared celular de las esporas tiene un papel importante en el mantenimiento de la latencia de estas bajo condiciones desfavorables (*de Jong et al., 2009*).

Se ha demostrado que la molécula de señalización, AMP cíclico (AMPC), es importante para una germinación eficiente pues mutaciones sobre el receptor CRP reducen la tasa de germinación. Asimismo, algunas chaperonas como GroEL, *trigger factor* o DnaK se expresan constitutivamente a lo largo de la germinación y ayudan en la síntesis de proteínas *de novo* (*Bobek et al., 2017*).

Hidrolasas con función similar a la lisozima se activan durante la germinación y facilitan cambios en la morfología de las esporas degradando la pared celular, facilitando la reconstrucción de peptidoglicano y permitiendo la entrada de nutrientes. SwIA, SwIB y SwIC son tres enzimas líticas de *Streptomyces* que determinan el grosor de la pared y participan en la germinación (*Haiser et al., 2009*). Otra familia de proteínas que participan en el proceso de germinación serían las proteínas RPF (factores que promueven la resucitación). Se cree que la función de estas enzimas hidrolasas también es esencial para la formación de ramas en las hifas vegetativas, para la extensión de la punta de las hifas vegetativas aéreas y para la formación de cadenas de esporas y posterior dispersión de las mismas (*Haiser et al., 2009*).

La proteína SsgA marca donde emergerán los tubos germinativos. A pesar de que su función no es esencial, su ausencia reduce el promedio de tubos germinativos y su sobreexpresión, en cambio, los aumenta (*Noens et al., 2005*). Otras proteínas del grupo Ssg son responsables de la correcta segregación y condensación del ADN (SsgC), de la síntesis de la pared de las esporas (SsgD), de la separación autolítica de las esporas (SsgE/F) y de la localización exacta del primer tabique tras la germinación (SsgG) (*Noens et al., 2005*).

## I. INTRODUCCIÓN

---

Otra proteína que toma relevancia en la fase de germinación es DivIVA. Se expresa desde el principio después de la hidratación de las esporas y su síntesis aumenta durante todo el proceso de germinación (*Strakova et al., 2013b*). Su localización está en la parte apical de las hifas jóvenes dirigiendo el crecimiento apical de *Streptomyces* (*Flardh et al., 2012*). Asociada a DivIVA, está la proteína FilP, que se acumula en las puntas de las hifas jóvenes y también se expresa en las etapas iniciales de la germinación (*Strakova et al., 2013b*). Poco después de la germinación (300 minutos en *S. coelicolor*) se expresan los genes que codifican la proteína de división celular FtsZ, que junto con la expresión de las demás proteínas de división celular, suponen el punto en el que finaliza la fase de germinación (*Bobek et al., 2017*).

La carboxipeptidasa SCO4439 participa en la formación de enlaces cruzados de peptidoglicano, y en función de la cantidad que haya de estos enlaces cruzados, se retrasa la fase de deshinchamiento en mayor o menor medida. Una mutación en esta carboxipeptidasa produce una cepa en la que la fase de hinchamiento se prolonga en el tiempo hasta llegar a esporas de hasta 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (2,5 veces más que la cepa silvestre (*Riostras et al., 2016*)).

### **I.3.2. Diferenciación del MI al MII sustrato**

La principal característica morfológica que diferencia el MI del MII es la compartimentalización en el caso del primero, y la presencia de tabiques esporádicos que delimitan segmentos multinucleados en el segundo (*Manteca et al., 2005a*). Recientemente se han caracterizado los septos de MI viendo que poseen las propiedades de permeabilidad de las membranas y al menos, algunos de ellos son membranas sin una pared de peptidoglicano detectable (*Yague et al., 2016*). Se ha podido comprobar que FtsZ, el primer componente celular del divisoma (el conjunto de proteínas que modula la formación de tabiques y la citocinesis) participa en la formación de los tabiques del MI (*Yague et al., 2016*). Pero la regulación y dinámica del proceso de septación del MI aún no se ha caracterizado.

### I.3.3. Diferenciación del MII sustrato al MII aéreo esporulante

El micelio sustrato, al igual que el micelio aéreo forma los llamado septos vegetativos, que se diferencian de los septos de esporulación en que los primeros son independientes de la división celular (citocinesis), mientras que los últimos acaban formando esporas individualizadas (*Jakimowicz and van Wezel, 2012*). Los septos vegetativos conducen a la formación de compartimentos multinucleados espaciados entre 5-10  $\mu\text{m}$ .

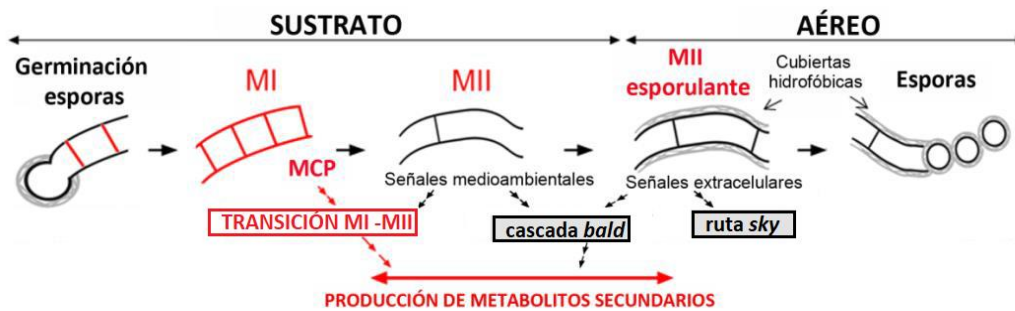
La principal diferencia morfológica entre las hifas del micelio sustrato y aéreo es la existencia de cubiertas hidrofóbicas en estas últimas. Los análisis genéticos y bioquímicos de la diferenciación de *Streptomyces* en cepas mutantes defectuosas en distintas fases de formación de estas cubiertas hidrofóbicas, han permitido ahondar en el conocimiento sobre la transición del micelio sustrato al micelio aéreo. Los mutantes *bald* (*bld*), tienen bloqueada la formación de las cubiertas hidrofóbicas de las hifas aéreas (*Kodani et al., 2004*). Entre los genes *bld* destacan los genes *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG*, *bldK*, *bldH*, *bIM* y *bldN* (*Claessen et al., 2006*). Los genes *bld* activan el cluster de genes *ram* (operón *ramCSAB*) que codifica el precursor de la proteína SapB, implicada la formación del micelio aéreo (*Claessen et al., 2006*), pues forma parte de las cubiertas hidrofóbicas de las esporas (*Kodani et al., 2004*). A su vez, los genes *bld* también inducen la expresión de otros genes que codifican componentes en la ruta *sky*, como por ejemplo los genes de rodlinas (genes *rdl*) y la mayoría de las chaplinas (*Claessen et al., 2006*) necesarias también para el crecimiento del micelio aéreo (*Capstick et al., 2007*). La vía *sky* parece ser un proceso intermedio entre la regulación realizada por los genes *bld* y los genes *white* (*whi*) (que regulan la esporulación) (*Claessen et al., 2006*) (Figura 7). Los mutantes en los genes *whi* son capaces de desarrollar micelio aéreo, pero no forman esporas pigmentadas (*Chater, 1972*) dando lugar a una esporulación defectiva. Algunos de estos genes son: *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* y *whiJ* los cuales están implicados en la segregación de cromosomas y la diferenciación de las esporas (*Flardh and Buttner, 2009*). Algunos genes *whi* activan la expresión del gen *ftsZ* (*Flardh and Buttner, 2009, Barka et al., 2016*) que codifica para FtsZ, el primer componente del divisoma y una proteína clave en la esporulación de



## I. INTRODUCCIÓN

*Streptomyces*. A su vez, los genes *whi* también regulan el gen de esporulación *sigF*, cuya mutación produce defectos en la maduración de las esporas, dando lugar a esporas de forma irregular con paredes delgadas y poco pigmentadas (Kelemen et al., 1996).

La formación del micelio aéreo conlleva una amplia señalización extracelular y varios estímulos fisiológicos y nutricionales. Por ejemplo, la escasez de nutrientes disponibles, variaciones en los niveles de ppGpp (tetrafosfato de guanósina) y de GTP disponibles o la fuente de carbono utilizada pueden resultar determinantes a la hora del desarrollo del micelio aéreo (McCormick and Flardh, 2012).



**Figura 7.** Principales rutas biomoleculares conocidas de los procesos de diferenciación en *Streptomyces*. Los nuevos mecanismos de regulación de las fases pre-esporulantes destacan en color rojo. Adaptado de Yagüe et al. (Yague et al., 2013b).

### I.3.4. Esporulación

En medio sólido, el desarrollo de *Streptomyces* culmina con la esporulación, es decir, la formación de esporas a partir de la célula apical de una hifa aérea. Esta célula, llamada célula esporogénica, se subdivide sincrónicamente por tabiques de esporulación espaciados de forma uniforme, dando lugar a una cadena de pre-esporas unicelulares que más tarde, se separará liberando esporas individuales. La delimitación que existe entre la célula esporogénica y la hifa subapical se llama tabique basal, se

## I. INTRODUCCIÓN

---

trata de una pared transversal cuya función es clave en esta fase, pues permite que algunos genes del desarrollo se expresen específicamente en la célula esporogénica apical o en la hifa subapical (*Dalton et al., 2007, McCormick and Flardh, 2012*).

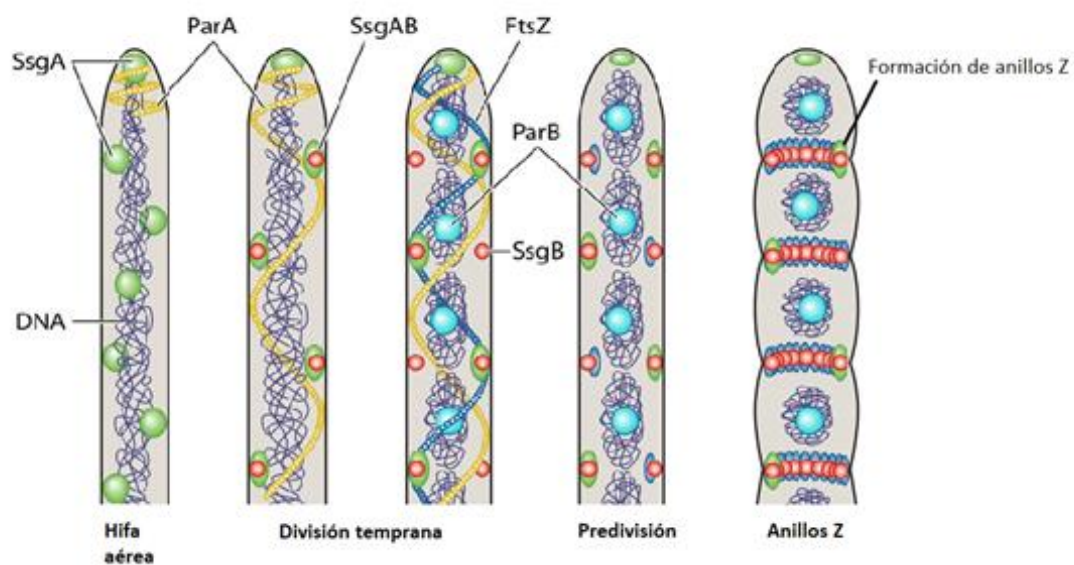
La primera proteína que se localiza en el sitio de división en bacterias es la proteína similar a la tubulina, altamente conservada, FtsZ. FtsZ polimeriza en este sitio para formar un anillo, llamado anillo Z, que luego recluta todas las demás proteínas de división conocidas, aproximadamente 20 en total, para formar un complejo proteico llamado divisoma. *S. coelicolor* tiene dos tipos de divisoma, uno que controla el crecimiento vegetativo en las etapas de sustrato y micelio aéreo, desacoplado de la citocinesis y que conduce a la formación de hifas multinucleadas, y otro que controla la formación de esporas unicelulares (*Jakimowicz and van Wezel, 2012*). Cuando tiene lugar la citocinesis, el divisoma se contrae tirando de la envoltura celular, pero es importante destacar que, es la posición del anillo Z la que marca el inicio de la división celular.

La regulación de la división celular en las hifas vegetativas no esporulantes es muy desconocida. Hasta la fecha, sólo se ha descubierto otra proteína alternativa al FtsZ que participa en la formación de tabiques del micelio vegetativo, SepX, cuyo papel exacto en la formación de estos tabiques aún se desconoce (*Bush et al., 2022*).

La división celular que acompaña a la esporulación es la que mejor se conoce en *Streptomyces*. El proceso empieza con las proteínas SsgA/B. SsgA inicia la división celular específica de la esporulación colocándose a los lados de la pared donde después, también se unirá SsgB. SsgB recluta directamente a FtsZ y también estimula su polimerización, logrando un espaciado simétrico de los anillos Z. Otro par de proteínas que también tienen función en la esporulación son ParA/B, intervienen en la segregación del ADN. ParA se ubica en el extremo de las hifas y se extiende por el resto de la hifa en forma de un filamento que desaparece antes de la septación. Sobre este filamento se distribuye regularmente el complejo de ParB, para que cuando se produzca la división y tenga lugar la formación de compartimentos de pre-esporas, cada uno cuente con un solo cromosoma (*Flardh and Buttner, 2009, Jakimowicz and van Wezel, 2012, Monahan et al., 2014, Barka et al., 2016*) (Figura 8).

## I. INTRODUCCIÓN

Otras proteínas que participan en la división celular asociada a la esporulación son FtsI, FtsL, FtsW (Jakimowicz and van Wezel, 2012), SepG (Zhang et al., 2016), DynA,B (Schlimpert et al., 2017a) y SepH (Ramos-Leon et al., 2021). Una vez formados los anillos Z, se produce la condensación y segregación cromosómica y la producción de tabiques de esporulación que delimitarán cada futura espora. Estas esporas comenzarán una etapa de maduración en la que tiene lugar la síntesis de otras proteínas. Las esporas adoptarán una forma más redondeada, y gracias a MreB, su pared se engrosa haciéndose resistente a la lisozima. La pigmentación grisácea de las esporas depende de WhiE y finalmente, SsgA, señalará los futuros sitios de



germinación (Flardh and Buttner, 2009, Barka et al., 2016).

**Figura 8.** Modelo de la división celular en la esporulación en *Streptomyces*. Adaptado de Barka et al., (2016).

### I.3.5. Reguladores del metabolismo secundario

La regulación del metabolismo secundario de *Streptomyces* es extremadamente compleja y aún no del todo comprendida. Buena muestra de esta complejidad son los reguladores positivos y negativos del metabolismo secundario mostrados en la Tabla 1.

*ActII-orf4* (Gramajo et al., 1993), *redD* (Feitelson et al., 1985), *atrA* (Uguru et al., 2005), *absA1/2* (Anderson et al., 2001), *relA* (Chakraborty et al., 1996), *rshA* (Sun et al., 2001), *cprA* (Onaka et al., 1998), *absR1/2* (Park et al., 2000), *afsQ1/2* (Shu et al., 2009), *rok7B7* (Park et al., 2009), *absB* (Price et al., 1999), *absC* (Hesketh et al., 2009), *rapA1/2* (Lu et al., 2007), *redZ* (Guthrie et al., 1998), *cpkO* (Pawlik et al., 2007), *ecrE1/2* (Wang et al., 2007), *eshA* (Saito et al., 2006), *relC* (Ochi, 1990), *cprA* (Onaka et al., 1998) o *rok7B7* (Świątek et al., 2013), son algunos de los reguladores positivos conocidos en *S. coelicolor*.

Entre los reguladores negativos cabe mencionar: *slbR* (Yang et al., 2012), *cprB* (Onaka et al., 1998), *siqQ* (Shu et al., 2009), *cdgA* (Den Hengst et al., 2010), *rrdA* (Ou et al., 2009), *dasR* (Rigali et al., 2006) *cutRS* (Chang et al., 1996), *nsdA* (Den Hengst et al., 2010), *nsdB* (Zhang et al., 2007), *wblA* (Kang et al., 2007) y *adpA* (Takano et al., 2003).

Muchos de los reguladores del metabolismo secundario son pleiotrópicos, afectando a múltiples rutas de antibiótico y otros metabolitos secundarios, así como a la diferenciación. Por ejemplo, *cprA* que acelera la esporulación (Onaka et al., 1998) o *rok7B7*, cuya delección afecta fuertemente a la represión de catabolitos de carbono (CCR), el crecimiento y la producción de antibióticos (Świątek et al., 2013). *DasR* forma parte del sistema de detección de nutrientes controlando el metabolismo de glutamato y glutamina, así como muchos transportadores de azúcar, y su mutación da lugar a un fenotipo *bld* (Rigali et al., 2006). La mutación en *nsdA* da lugar a un adelanto en la esporulación (Rigali et al., 2006, Den Hengst et al., 2010). *wblA*, modula la diferenciación morfológica y la biosíntesis de antibióticos, ya que una sobreexpresión de este regulador reduce la transcripción de los activadores de las rutas de biosíntesis de los principales antibióticos (actinorrodina, undecilprodigiosina y Cda) llegando a inhibir su síntesis (Kang et al., 2007, Den Hengst et al., 2010). La mayoría de los

reguladores pleiotrópicos son fundamentalmente factores de transcripción como *slbR* (Yang et al., 2012). Entre las principales familias se encuentran genes de la familia *abs* y *afs* (Guthrie et al., 1998). Por ejemplo, *afsQ1- Q2* regulan el metabolismo secundario y desarrollo morfológico (Shu et al., 2009). Reguladores como *wbla*, *atrA*, *redZ*, *ecr1/2* actúan de forma pleiotrópica en la síntesis de antibiótico (Kang et al., 2007, Uguru et al., 2005, Guthrie et al., 1998, Wang et al., 2007). El gen *adpA* restaura parcialmente la formación de micelio aéreo en un mutante *bldA* (Takano et al., 2003). *CdgA* y *nsdA* son dianas para el regulador BldD, un regulador transcripcional esencial para el desarrollo morfológico y la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* (Den Hengst et al., 2010).

### **I.3.6. Control global por fósforo del desarrollo y la producción de antibióticos en *Streptomyces***

El fósforo es un componente esencial de la nutrición bacteriana y uno de los componentes principales de la célula, representando aproximadamente el 1,5-2,1% del peso seco de la célula (Santos-Beneit et al., 2008). El fosfato es esencial para la replicación de material genético, la formación de intermediarios energéticos (ATP, GTP, etc.), la síntesis de muchos metabolitos primarios y secundarios, o incluso para la regulación de procesos celulares como la diferenciación (Barreiro and Martinez-Castro, 2019). Los niveles de fosfato intracelulares constituyen un mecanismo de control global de la expresión génica en bacterias Gram positivas como *Streptomyces* (Martin and Liras, 2021) y también en bacterias Gram negativas (Torriani, 1990).

Los niveles de fósforo modulan la germinación. En *Bacillus subtilis*, se ha visto que una adición exógena de poli-P puede inhibir la germinación (Hamagishi et al., 1980) lo que hace pensar que sólo cuando se alcanza el nivel adecuado de fósforo libre se lleva a cabo la germinación. Otro ejemplo sería el mecanismo de inhibición de poli-P en la germinación de *B. cereus*. En este caso, el poli-P se uniría a la pared celular quelando metales esenciales (como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ) sin que estos puedan ser liberados

## I. INTRODUCCIÓN

---

durante la germinación, lo que desencadena efectos bactericidas (*Akhtar et al., 2008*). Un estudio sobre *B. cereus* demostró que las concentraciones de poli-P afectan a la separación de los septos de división celular, lo que conduce a células alargadas. Esto sugiere que proteínas de división, como FtsZ, debieran estar afectadas por iones metálicos divalentes, de forma que un efecto en la polimerización del anillo Z generaría este fenotipo de células alargadas (*Maier et al., 1999*).

Las principales enzimas asociadas con el metabolismo intracelular del fosfato en bacterias son las poli-P quininas, en particular la poli-P quinasa, PPK. PPK se encarga de catalizar reversiblemente la polimerización del fosfato terminal de ATP en una cadena de poli-P, el cual se utiliza como sustrato para fosforilar AMP a ADP, un precursor inmediato de ATP (*Jones and Elliot, 2018*). PPK actúa en la formación de polifosfatos cuando el ratio de ATP/ADP es alto, y como una nucleósido kinasa regenerando ATP cuando este ratio es bajo (*Chouayekh and Virolle, 2002*). Otras enzimas hidrolíticas son exo- y endopolifosfatasas (PPX y PPN, respectivamente) (*Jones and Elliot, 2018*). En *Streptomyces*, las cadenas de polifosfato son más largas y abundantes en el mutante PPK que en la cepa salvaje, y se ha demostrado in vitro que PPK puede regenerar ATP a partir de ADP, utilizando los polifosfatos como sustrato, cuando el ratio ATP/ADP es bajo, indicando que la función biológica de PPK en esta bacteria sería más la de formar ATP que la de formar cadenas de polifosfato (*Ghorbel et al., 2006*).

La expresión de cientos de genes se controla por los niveles de fosfato, el llamado “Pho regulon”. El sistema de dos componentes PhoR-PhoP donde PhoR (quinasa de histidina localizada en la membrana) y PhoP (regulador de respuesta que se une ADN) se encargan de regular la expresión (al alza o a la baja) de los genes del “Pho regulon” en función de los niveles intracelulares de fosfato (*Sola-Landa et al., 2003, Martin and Liras, 2019*). El metabolismo secundario se activa cuando los niveles de fósforo del medio de cultivo son bajos, y el “Pho regulon” participa activamente en su regulación (*Millan-Oropeza et al., 2020*). Cada vez hay más evidencia experimental de que PhoP no es el único regulador transcripcional implicado en la respuesta celular a los niveles de fosfato, por lo que los genes modulados por fosfato son muchos más de los que se podría esperar (*Martin et al., 2012*).

## I. INTRODUCCIÓN

---

El transporte de fósforo en *Streptomyces* está altamente regulado por transportadores como PstSCAB y PitH (revisado en (Martin and Liras, 2021)). El operón *pstSCAB* está altamente conservado en la mayoría de las especies de *Streptomyces*. La lipoproteína PstS de alta afinidad por fosfato, resulta ser clave pues su ausencia perjudica gravemente el transporte de fosfato, y a su vez, acelera la diferenciación y la esporulación en medios sólidos (Díaz et al., 2005, Martin and Liras, 2021). En cambio, los transportadores PitH (PitH1 y PitH2) son transportadores de fósforo inorgánico de baja afinidad; PitH1 se activa en concentraciones altas de fosfato (más de 3.2 mM) y PitH2, al contrario, en condiciones limitantes (alrededor de 0.01 mM) (Martin and Liras, 2021).

PPK y PstS se han relacionado activamente con la regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces* (Díaz et al., 2013).

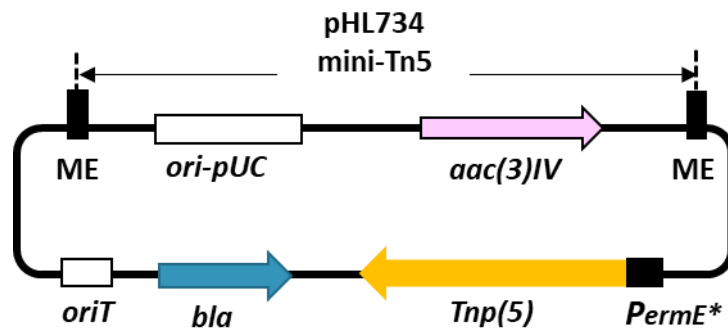
Entre los mutantes aleatorios que hemos creado en esta tesis, nos hemos encontrado un mutante con los genes *SCO1897-1901* (posible regulador transcripcional y proteínas transportadoras) que tiene una acumulación muy elevada de fósforo en sus esporas (el doble que la cepa salvaje). La caracterización de este mutante nos ha permitido profundizar en los mecanismos de regulación de los niveles celulares de fosfato de *Streptomyces coelicolor* (capítulo IV.3 de resultados).

### I.4. MUTAGÉNESIS ALEATORIA EN *STREPTOMYCES*

Tal como se describirá en resultados, el punto de partida de esta tesis doctoral fue la creación de una librería de mutantes aleatorios en *S. coelicolor*. Actualmente gracias a la evolución de las técnicas de biología molecular, se han podido reemplazar métodos clásicos de mutagénesis aleatoria, como la radiación ultravioleta o la mutación por agentes mutagénicos como la nitrosoguanidina, que no ofrecían posibilidades de mapeo de los genes mutados (Petzke and Luzhetskyy, 2009) por sistemas basados en transposones de gran eficiencia (resumidos en la Tabla 2).

## I. INTRODUCCIÓN

La transposición es el proceso de mover el ADN de una ubicación a otra en el cromosoma. Uno de los transposones más estudiados es el Tn5. Consta de dos secuencias de inserción IS50R e IS50L flanqueadas por repeticiones invertidas de 19 pares de bases denominadas extremos externos. IS50R codifica la transposasa, la única proteína necesaria para la transposición en este sistema (Steiniger et al., 2006).



**Figura 9.** Transposón mini-tn5 en el vector replicativo pHL734 utilizado para mutagénesis aleatoria en este trabajo; ME, la secuencia final del mosaico para el reconocimiento y corte de la transposasa Tn 5; ori-pUC, origen de la replicación del ADN en *E. coli*; aac (3) IV, gen de resistencia a apramicina; oriT, origen de la conjugación intergenérica de *E. coli* a *S. coelicolor*; bla, gen de resistencia a ampicilina; tnp(5), mini-Tn5 transposasa. Adaptado de Xu et al., (2017).

Tn5 se moviliza usando un mecanismo en el que el transposón se elimina por completo desde su ubicación original antes de ser insertado en un nuevo sitio de ADN (Steiniger et al., 2006). Desafortunadamente, los primeros transposones de *Streptomyces* derivados de Tn5 tenían un uso limitado, principalmente debido a una baja frecuencia de transposición (Petzke and Luzhetskyy, 2009, Xu et al., 2017). Recientemente, se ha desarrollado un sistema de transposición basado en un Tn5 hiperactivo (mini Tn-5) optimizando el sesgo de codones para *Streptomyces* consiguiendo una mutagénesis in vivo muy eficaz en *Streptomyces* (Xu et al., 2017). Este es el sistema que hemos utilizado en esta tesis. El mini-Tn5 modificado genéticamente tiene una eficiencia de transposición mucho mayor que el tipo salvaje



## I. INTRODUCCIÓN

(Petzke and Luzhetskyy, 2009). Como desventaja, la replicación del vector que contiene mini-Tn5 puede dar lugar a una inserción múltiple del mismo complicando la interpretación fenotípica de los mutantes resultantes (Xu et al., 2017). Por ello, en el método de Xu et al. 2017 clonaron mini-Tn5 en el plásmido pHL734 que carecía de origen de replicación en *Streptomyces* (Figura 9). pHL734 incluye un origen de replicación en *E. coli*, lo que facilita grandemente la identificación del sitio de inserción, mediante digestión del genoma de las cepas mutadas con *Apal*, ligación de los fragmentos, transformación en *E. coli* y secuenciación de al menos uno de los plásmidos clonados (Xu et al., 2017).

Durante la última década se han desarrollado otros vectores replicativos para la transposición *in vivo* en *Streptomyces* que incluyen un sistema de transposón *Himar1*, el cual pertenece a los transposones de la familia *mariner* y un sistema IS204 basado en *Nocardia asteroides* (Xu et al., 2017) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Algunos sistemas de transposición utilizados en *Streptomyces*.

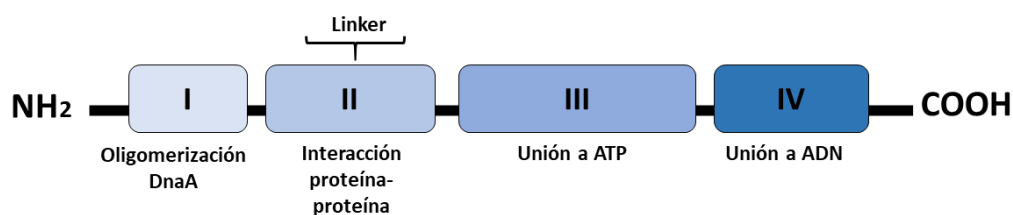
Transposón	Fundamento	Características	Referencia
<b>Derivado de IS204</b>	Genoma de <i>Nocardia asteroides</i> YP21	Estabilidad y fácil dispersión por el genoma	(Zhang et al., 2012)
<b>Mini-Tn5</b>	Derivado de Tn5	Tranposasa hiperactiva	(Xu et al., 2017).
<b>Derivado de <i>Himar-1</i></b>	Elemento de la familia <i>mariner</i> aislado de <i>Haematobia irritans</i>	Poca especificad	(Bilyk et al., 2013)

### I.5. REPLICACIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO DE *STREPTOMYCES*

#### a) Proteína DnaA

La replicación cromosómica es un evento clave en el ciclo celular bacteriano siendo principalmente controlado al inicio. Comienza en un *locus* cromosómico estrictamente definido, *oriC*. Este a su vez, puede variar entre las distintas especies de bacterias en términos de longitud y en el número y disposición de los motivos únicos (*dnaA boxes*) a los que se une la proteína iniciadora de la replicación del ADN (DnaA) (Lebkowski et al., 2020). DnaA es la proteína clave en el proceso de inicio de replicación cromosómica (Braun et al., 1985). El gen *dnaA* está autorregulado y la concentración de la proteína DnaA limita la velocidad del inicio de la replicación. El tiempo de la iniciación en el ciclo celular parece estar determinado por la actividad de DnaA en la célula (Løbner-Olesen et al., 1989). DnaA es necesaria para la replicación en prácticamente todas las bacterias y también actúa como factor de transcripción (Sedivy, 2020).

DnaA es una proteína compleja formada por 4 dominios funcionales (Saxena et al., 2013a): el dominio I participa en la oligomerización de DnaA y la formación del orisoma (el complejo de iniciación de la replicación del ADN cromosómico formado por múltiples copias de DnaA); el dominio II es el encargado de la interacción proteína-proteína; el dominio III participa en la unión al ATP; y el dominio IV controla la unión al ADN (Saxena et al., 2013b, Zawilak-Pawlik et al., 2017a, Lebkowski et al., 2020) (Figura 10). La proteína DnaA de *S. coelicolor* es una de las DnaA más grandes conocidas (656 aminoácidos comparados con los 467 aminoácidos de la proteína DnaA de *E. coli*) debido a la presencia de un dominio II mucho más largo, que comprende una inserción de aproximadamente 150 aminoácidos que no está presente en otras bacterias (Zawilak-Pawlik et al., 2017).



**Figura 10.** Esquema representativo de la proteína DnaA y sus dominios. Modificado de Saxeena et al., (2013).

Como en otros organismos, la replicación en *Streptomyces* comienza con la formación de un complejo de iniciación. El origen de replicación (*oriC*) de *Streptomyces* es más largo y complejo que en otras bacterias (Jakimowicz and van Wezel, 2012). Una de las características más llamativas de *Streptomyces* es su capacidad para dividirse de forma asincrónica generando esporas unigenómicas a partir de un micelio aéreo multinucleado, por lo que no sería extraño que contase con mecanismos reguladores únicos responsables de modular el inicio de la replicación durante la esporulación. Uno de los reguladores pleiotrópicos de diferenciación morfológica y fisiológica más estudiados es AdpA (Tabla 1), que se une específicamente a la región *oriC*. Este regulador modula el acceso de la proteína DnaA al origen de la replicación. Parece ser que en condiciones de bajo ATP y alta concentración de AdpA, DnaA no puede unirse de manera eficiente a la región *oriC* e iniciar la replicación (Wolanski et al., 2012). Otro mecanismo de regulación específico de la proteína DnaA de *S. coelicolor*, es la fosforilación del dominio II de la DnaA en la treonina 486 lo que implica cambios conformacionales en los dominios III y IV que disminuyen la actividad de DnaA (Lebkowski et al., 2020). La fosforilación de DnaA es llevada a cabo por la quinasa AfsK (Passot et al., 2022).

Tal como se detallará en el capítulo III.1 de resultados, *SCO2102*, uno de los genes que hemos identificado en nuestra librería de mutantes aleatorios y cuya

mutación genera un fenotipo en el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios, porta un dominio DnaA homólogo al dominio II de la proteína DnaA.

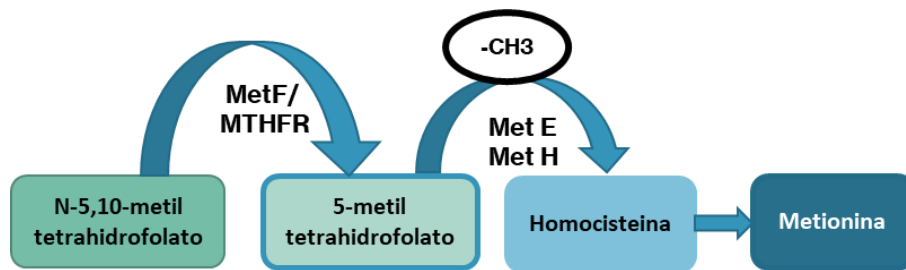
### **b) Efecto de las metiltetrahidrofolato reductasas en la síntesis de metionina y ADN**

La metionina fue descubierta por Mueller en 1922 (Mueller, 1922). En *E. coli* y *S. typhimurium* su biosíntesis está mediada por varios genes que forman el regulón de metionina. Este regulón consta de diez genes biosintéticos (*metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metF*, *metH*, *metK*, *metL*, *metQ* y *metX*), dos genes reguladores (*metJ* y *metR*), y el gen de la metionil-tRNA sintetasa (*metG*) (Blanco et al., 1998). Además, a lo largo de este proceso intervienen dos vitaminas como cofactores la cobalamina (vitamina B12) y el ácido fólico, tanto en bacterias como en animales (Rüdiger and Jaenicke, 1973). En enterobacterias, el último paso en la biosíntesis de este aminoácido es la metilación de la homocisteína catalizada por dos enzimas transmetilasas (*metE* y *metH*) (Blanco et al., 1998). El grupo metilo transferido por estas enzimas a la homocisteína es donado por el 5-metiltetrahidrofolato. Este compuesto se sintetiza a partir de N-5,10-metiltetrahidrofolato mediante la acción de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) MetF (Blanco et al., 1998). A esta ruta de síntesis de metionina en ocasiones se la llama rama del folato (Figura 11). Además, la metionina es el precursor de la S-adenosil metionina, el donante de metilo y modificador de macromoléculas más importante y probablemente universal (Rüdiger and Jaenicke, 1973, Saint-Girons et al., 1988).

## I. INTRODUCCIÓN

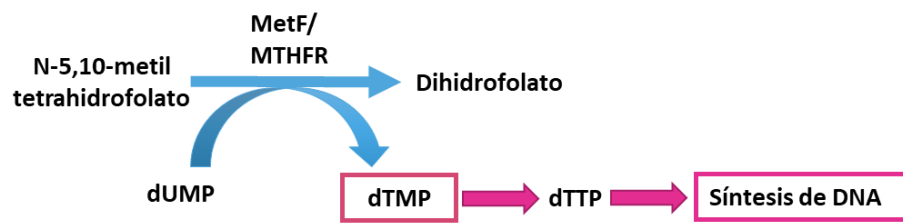
---

Experimentos en *S. lividans* indican que la rama del folato es esencial para la biosíntesis de metionina en los estreptomicetos al igual que sucede en las enterobacterias (Blanco *et al.*, 1998). NdgR es un regulador transcripcional que interviene en la activación de la biosíntesis de metionina. Además, se encuentra conservado entre los estreptomicetos. NdgR induce los genes involucrados en los últimos pasos de la síntesis de metionina (*metF*, *metE* y *metH*) ya que un mutante en el gen *ndgR* muestra un crecimiento lento que se ve recuperado cuando el medio es suplementa con metionina (Kim *et al.*, 2012).



**Figura 11.** Esquema representativo de la síntesis de metionina en *Streptomyces* (rama del folato).

Las MTHFRs no solo son importantes para la síntesis de metionina, sino que también son necesarias en muchas otras rutas biosintéticas como la implicada en la síntesis de dTMP (Figura 12). La biosíntesis de timidilato (dTMP) es esencial en la síntesis de ADN que a su vez es esencial para la correcta división celular (Chon *et al.*, 2017). Hasta hace poco, la timidilato-sintasa (ThyA) se consideraba la única enzima capaz de catalizar la formación de novo de dTMP, sin embargo, se ha visto que esta enzima no está presente en una gran cantidad de genomas microbianos, y por tanto deben existir vías alternativas para la formación de dTMP (Leduc *et al.*, 2004).



**Figura 12.** Esquema representativo de la síntesis de dTMP. Adaptado de (Walsh, 2003).

En esta tesis, en el capítulo III.1 de resultados, caracterizamos la función biológica de SCO2103, una MTHFR que participa en la síntesis del dTMP necesario para la replicación del ADN que acompaña a la esporulación. La mutación de esta MTHFR genera un mutante *bld* que es incapaz de producir hifas aéreas y no puede esporular.

## **II. METODOLOGÍA**





## II. METODOLOGÍA

### II.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

#### II.1.1. Cepas utilizadas

Todas las cepas utilizadas en esta tesis, tanto las cepas de *Escherichia coli* como de *Streptomyces coelicolor*, y sus características, están recogidas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cepas utilizadas de *E. coli* y *S. Coelicolor* (A32) utilizadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMSmcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) poa supE44 thi-1 gyrA96 relA1λ-</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR</i>	(MacNeil et al., 1992)
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002	<i>E. coli</i> ET12567 con el pUZ8002, un plásmido no transmisible que moviiza plásmidos con ori-T por conjugación.	(Flett et al., 1997)
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> , cepa modelo	(Kieser, 2000)

## II. METODOLOGÍA

**Tabla 3.** Continuación

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>S. coelicolor</i> <i>ΔSCO2102</i>	<i>SCO2102</i> delecionado por CRISPR-Cas9	Esta tesis
<i>S. coelicolor</i> <i>ΔSCO2103</i>	<i>SCO2103</i> delecionado por CRISPR-Cas9	Esta tesis
<i>SCO18987::Tn5</i>	<i>SCO1897</i> mutado en <i>S.coelicolor</i> por Tn5	Esta tesis

### II.1.2. Medios de cultivo utilizados para *E. coli*

#### LB (Miller, 1971)

5 g/L NaCl

5 g/L de Extracto de levadura

10 g/L de Triptona

Para obtener LB enriquecido con glucosa (LB + glucosa) añadir 1 % de glucosa a la mezcla.

#### 2xTY (Sambrook and Russell, 2001)

5 g/L NaCl

15 g/L Triptona

10 g/L Extracto de levadura

Para obtener medio sólido añadir 1,5 g de agar por cada 100m

### II.1.3. Medios de cultivo utilizados para *S. coelicolor*

#### GYM (Novella et al., 1992)

5 g/L Glucosa

4 g/L Extracto de levadura

5 g/L Extracto de malta

0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

20 g/L Agar

Después de esterilizar y antes de repartir en placas, suplementar con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (estéril) para tener una concentración final de 0,25 g/L.

#### Medio de liofilización (Castaño et al., 2021)

1,7% Trehalosa

2 % Leche descremada (Skim milk power)

0,125% MOPS

Ajustar pH a 7,5 y se autoclavar a 121°C entre 5-10 minutos

#### MM (Kieser, 2000)

0,5 g/L L-Asparagina

0,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,01 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

10 g/L Glucosa (añadir después de autoclavar el medio)

10 g/L Agar

Ajustar pH a 7-7,2.

Después de autoclavar, añadir 2,5 mL de manitol al 20% por cada 100 mL de MM o 2 mL de glucosa al 50 % por cada 100 mL de MM. Ambos suplementos se esterilizan por filtración.

## II. METODOLOGÍA

---

### **R5A sin sacarosa (Fernandez et al., 1998)**

0,25 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

10,12 g/L MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

10 g/L Glucosa

0,1 g/L Difco casaminoácidos

200 µL (10x) Oligoelementos por litro

5 g/L Extracto de levadura

21 g/L MOPS

20 g/L Agar

Ajustar el pH a 6,8.

### **R5 (Kieser, 2000)**

103 g/L sacarosa

0,25 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

10,12 g/L MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

10 g/L Glucosa

0,1 g/L Difco casaminoácidos

200 µL (10x) Oligoelementos por litro

5 g/L Extracto de levadura

5,73 g/L TES *buffer*

Después de autoclavar, cuando se usa para la regeneración de protoplastos, por cada 100 mL se suplementa con: 0,7 mL de NaOH (1N); 1 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5%); 0,4 mL CaCl<sub>2</sub> (5M); 1,5 mL L-prolina (20%).

### **SFM (Kieser, 2000)**

20 g/L Harina de soja

20 g/L Manitol

20 g/L Agar

## II. METODOLOGÍA

---

### **TBO (Aparicio et al., 1999)**

20 g/L Avena molida

20 g/L Tomate concentrado

25 g/L Agar

Ajustar pH 6,5.

### **TSB (Kieser, 2000)**

17 g/L Peptona de caseína

2,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,5 g/L Glucosa

5 g/L Cloruro de sodio

3 g/L Peptona de soja

Ajustar pH al 7,3.

### **YEME 34% (Kieser, 2000)**

3 g/L Extracto de levadura

5 g/L Bactopeptona

3 g/L Extracto de óxido de malta

340 g/L de sacarosa

Después de autoclavar añadir 2 mL/L de MgCl<sub>2</sub> 2,5M.

### **II.1.4. Condiciones de cultivo y conservación de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C y 250 rpm. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con diferentes antibióticos: cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), apramicina (100 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL). Para preservar las cepas se centrifugaron 5 mL de un cultivo de 16 horas en medio LB o

## II. METODOLOGÍA

---

2xTY con los antibióticos correspondientes. El *pellet* se resuspendió en glicerol al 30 % y se repartió en alícuotas de 200  $\mu$ L, que se conservaron a -80 °C.

### II.1.5. Condiciones de cultivo y conservación de *Streptomyces*

En esta tesis se ha trabajado con la cepa tipo *Streptomyces coelicolor* M145 (Bentley *et al.*, 2002). Los cultivos, en medio líquido y sólido, de *S. coelicolor* se incubaron a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se prepararon en R5A sin sacarosa o TSB y se incubaron con agitación de 200 rpm.

Las esporas de las cepas silvestre y mutantes de *S. coelicolor* M145 se obtuvieron a partir de cultivos de 7-10 días en medio sólido SFM. En el caso de los mutantes *bld*, aquellos que carecen la formación de esporas, se obtuvo el micelio de una placa de 7 días en medio sólido SFM. Cuando fue necesario, los cultivos se suplementaron con los antibióticos correspondientes: kanamicina (50  $\mu$ g/mL), apramicina (25  $\mu$ g/mL), ácido nalidíxico (25  $\mu$ g/mL) e higromicina (100  $\mu$ g/mL). Cuando se indica, los medios de cultivo se suplementaron con metionina (50  $\mu$ g/mL).

Las esporas de las cepas de *Streptomyces* se obtuvieron a partir de placas de SFM de 7 días y se conservaron en glicerol al 30% a -80 °C. En el caso de los mutantes *bld*, se liofilizaron 2,5 mL del micelio recogido de tres placas en medio de liofilización.

### II.1.6. Plásmidos utilizados

Todos los plásmidos utilizados y construidos en esta tesis doctoral y sus características están recogidos en las Tabla s 4, 5 y 6. En el plásmido pRAS realizamos una modificación ya que se introdujo un gen de resistencia a kanamicina (plásmido pRASK) con el fin de facilitar y mejorar el estudio.

## II. METODOLOGÍA

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados en esta tesis.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
<b>pMV</b>	Vector de clonación; Amp <sup>R</sup>	BGI
<b>pKMV</b>	Vector de clonación; Kan <sup>R</sup>	BGI
<b>pNG3</b>	Vector integrativo, Hygro <sup>R</sup> .	<i>(Gonzalez-Quinonez et al., 2016)</i>
<b>pRAS</b>	pRA modificado por Antonio Rodríguez y Alberto-Sola-Landa; Apra <sup>R</sup>	<i>(Perez-Redondo et al., 2010)</i>
<b>pRASK</b>	pRAS modificado; Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	<i>Esta tesis</i>
<b>PCR™-Blunt II-TOPO®</b>	Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit; Kan <sup>R</sup> .	Invitrogen
<b>pCRISPR-Cas9</b>	Plásmido conjugativo y termosensible (contiene la nucleasa Cas9); Apra <sup>R</sup>	<i>(Tong et al., 2015)</i>

**Tabla 5.** Plásmidos utilizados para el estudio de los genes *SCO2102* y *SCO2103* con las construcciones de clonación.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<b>pNG3 P2-SCO2102</b>	pNG3 contiene la construcción P2-SCO2102, hygro <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pNG3 PP-SCO2102</b>	pNG3 contiene la construcción P1-P2-SCO2102, hygro <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pNG3 SCO2103</b>	pNG3 contiene el gen SCO2103, hygro <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pNG3 P1-SCO2102-03</b>	pNG3 contiene los genes SCO2102 y SCO2103, hygro <sup>R</sup>	Esta tesis

## II. METODOLOGÍA

**Tabla 5.** Continuación.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<b>pNG3 P2-SCO2102-mCherry</b>	pNG3 contiene la construcción P2-SCO2102 fusionada a mCherry, <i>hygro</i> <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pRAS P1-SCO2103-eGFP</b>	pRAS contiene la construcción P1-SCO2103 fusionada a eGFP, <i>apra</i> <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pCRISPR- 2102</b>	pCRISPR contiene la diana SCO2102 y el fragmento de 2,13 Kb utilizado para crear <i>ΔSCO2102</i>	Esta tesis
<b>pCRISPR- 2103</b>	pCRISPR contiene la diana SCO2103 y el fragmento 2,61 Kb utilizado para crear <i>ΔSCO2103</i>	Esta tesis
<b>pNG3 P1-terminador condicional-P2-SCO2102</b>	pNG3 contiene la construcción P1-terminador condicional- P2-SCO2102, <i>hygro</i> <sup>R</sup>	Esta tesis

**Tabla 6.** Plásmidos utilizados para el estudio de los genes *SCO1897-1901* con las construcciones de clonación.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<b>pRASK-1897</b>	pRASK contiene el gen <i>SCO1897</i> ; <i>Kan</i> <sup>R</sup>	Esta tesis
<b>pRASK- 1897-1901</b>	pRASK contiene los genes <i>SCO1897-SCO1901</i> <i>Kan</i> <sup>R</sup>	Esta tesis



### II.2. OBTENCIÓN, ANÁLISIS FENOTÍPICO, VALIDACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES ALEATORIOS EN *S. COELICOLOR* M145

#### II.2.1. Obtención de mutantes insercionales aleatorios en *S. coelicolor* M145.

Para la obtención de mutantes insercionales en *S. coelicolor* M145 se utilizó el plásmido pHL734 (Xu et al., 2017), el cual contiene el transposón mini-Tn5 con resistencia a apramicina. Este plásmido carece de origen de replicación en *Streptomyces* por lo que es un plásmido suicida. El gen que codifica la transposasa está fuera del transposón móvil, lo que asegura la estabilidad del transposón insertado y la de la mutación.

Se siguió la metodología descrita por Xu et al., 2017 (Xu et al., 2017): se introdujo el plásmido pHL734 (Figura 9) en una cepa de *E. coli* conjugativa y no metilante (*E. coli* ET1257 pUZ8002) que está mutada en las metilasas *dam* y *dcm* (*dam*<sup>-</sup> *dcm*<sup>-</sup>) (MacNeil et al., 1992) y además incluye el plásmido pUZ8002 (Paget et al., 1999), que no es transferible, pero tiene funciones para la movilización de cósmidos/ plásmidos que tengan un *oriT*. La transferencia del plásmido a *Streptomyces* se realizó mediante conjugación siguiendo el protocolo de Kiesser et al., (2000), con 5 mL de cultivo de *E. coli* y  $3 \cdot 10^8$  esporas de *S. coelicolor* M145. Posteriormente, se seleccionaron los exconjugantes con resistencia a apramicina (para seleccionar las colonias de *Streptomyces* que portan el transposón) y ácido nalidíxico (para eliminar las células de *E. coli*).

### **II.2.2. Análisis fenotípico de mutantes insercionales de *S. coelicolor* M145**

Debido a la alta eficiencia del método de mutación, se obtuvieron cientos de mutantes, por lo que se hizo un primer análisis fenotípico rápido de los mismos con el fin de seleccionar los que tenían los fenotipos más destacados. Estos análisis fenotípicos se realizaron a partir de suspensiones frescas de esporas en agua o de micelio, en el caso de los mutantes *bld*. Para obtener estas suspensiones, se raspó con una torunda estéril la superficie del cultivo tras añadir 10 mL de agua destilada estéril. La concentración de esporas se cuantificó midiendo la D.O. a 600 nm y utilizando una recta patrón de *S. coelicolor* M145 para los mutantes que esporulaban como la cepa salvaje. Para los mutantes que esporulaban, pero en los que la esporulación era defectiva, se establecieron las respectivas curvas patrón a partir de diluciones seriadas y cuantificando su absorbancia. En estos mutantes, también se filtró la suspensión de esporas con jeringas estériles de algodón hidrófilo para eliminar los posibles restos de micelio. En el caso de los mutantes *bld*, se partió de una suspensión de micelio en agua destilada estéril obtenido de una placa de 7 – 10 días de cultivo. El micelio se obtuvo con una torunda estéril en placas a las que se añadió 5 mL de agua estéril.

Para los análisis fenotípicos, se inocularon  $10^7$  esporas frescas en placas de Petri (8,5 cm de diámetro) con 25 mL de medio sólido GYM cubierto con discos de celofán estériles. En el caso de algún mutante que no esporulaba bien, se inocularon  $3,5 \cdot 10^6$  esporas frescas en placas Petri de 5 cm de diámetro con 8,6 mL de medio sólido GYM. En los dos casos el número de esporas por  $\text{cm}^2$  de superficie y la profundidad del medio de cultivo en las placas fueron similares. Para el estudio de los mutantes *bld*, se inoculó el volumen de la suspensión de micelio equivalente a 26,3 mg proteína celular en placas de Petri (8,5 cm de diámetro) con 25 mL de medio sólido GYM cubierto con discos de celofán estériles.

## II. METODOLOGÍA

---

Los análisis fenotípicos de los mutantes se realizaron del siguiente modo:

- El ciclo de desarrollo se analizó en medio sólido GYM. Se analizaron las diferentes fases del ciclo de vida de *Streptomyces*: germinación (7-8 h), MI (16 h), MII temprano (micelio sustrato, 24 h), MII tardío (micelio aéreo, 48 h) y esporulación (72 h); como se ha descrito previamente (*Manteca et al., 2006*). Las células se tiñeron con IP y SYTO-9 (*LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, L-13152*). Estas muestras se observaron en el microscopio láser confocal LEICA TCS-SP8, 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 R5A sin sacarosa. Se inocularon 20 mL de medio en matraces lisos de 100 mL de capacidad, con una concentración de  $10^7$  esporas/mL. En el caso de los mutantes *bld* se inoculó micelio equivalente a 26,3 mg de proteína en 20 mL de medio. Estos cultivos se incubaron a 30 °C y 200 rpm (*Manteca et al., 2008*). La producción de undecilprodigiosina y actinorrodina en estos experimentos preliminares se realizó macroscópicamente mediante la observación de la coloración azul (actinorrodina) y roja (undecilprodigiosina) (*Bystrykh et al., 1996*).

### **II.2.3. Identificación del sitio de integración del transposón en los mutantes insercionales de *S. coelicolor* M145.**

El sistema de mutagénesis usado está diseñado para generar mutantes aleatorios con una única inserción del transposón, es decir, el sitio de integración es único (*Xu et al., 2017*). Se identificó el punto exacto de inserción de mini-Tn5 en el cromosoma de los mutantes con los fenotipos más llamativos. Extrajimos el ADN cromosómico de los mutantes con el kit *GenElute™ Bacterial Genome DNA* (Sigma) y lo digerimos con el enzima *Apal*, un enzima de restricción que corta el ADN de *S. coelicolor* generando fragmentos de un promedio de 1,3 kb. *Apal* no corta el transposón mini-Tn5 (*Xu et al., 2017*). Una vez digerido, se purifica el ADN mediante el kit *DNA, RNA and protein*

## II. METODOLOGÍA

*purification* (Macherey-Nagel). A continuación, hicimos una ligación utilizando la ligasa *T4 DNA ligase* (Invitrogen). El ADN ligado se introdujo en *E. coli DH5α* mediante transformación química. El resultado fueron colonias con resistencia a apramicina que contenían el mini-Tn5 con secuencias cromosómicas a los lados que habían ligado en sus extremos. Todas las colonias de *E. coli* resistentes a apramicina contenían el mini-Tn5, ya que en el diseño del transposón de *Xu et al. 2017* introdujeron el gen de resistencia a apramicina y un origen de replicación en *E. coli* dentro del min-Tn5 (*Xu et al., 2017*). Finalmente, el plásmido recombinante de cada clon resistente fue extraído y secuenciado mediante Sanger. Para la extracción se utilizó un kit comercial *Gen Elute™ Plasmid Plasmid Minioreo* (Kit-Sigma-Aldrich) y para determinar la secuencia cromosómica que flanquea cada lado de mini-Tn5 se usaron los cebadores UpS/DownS (Tabla 7).

**Tabla 7.** Tabla de cebadores utilizados para el estudio de los genes *SCO2102-2103*.

PRIMERS	SECUENCIA	REFERENCIA
<b>UpS</b>	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	( <i>Xu et al., 2017</i> )
<b>DownS</b>	ACTGCTGTGAGCGCTTTGCCTTGGC	( <i>Xu et al., 2017</i> )
<b>SCO2102F</b>	AAAAAGATATCCTCACAGCCAAGGACGATCC	Esta tesis
<b>SCO2102R</b>	CCCACTAGTGGACTCGTGGTGGAGGGG	Esta tesis
<b>SCO4848F</b>	CGTCGTATCCCCTCGGTTG	(Gonzalez-Quinonez et al., 2016)
<b>pMS82R</b>	GAGCCGGGAAAGCTCATTCA	(Gonzalez-Quinonez et al., 2016)
<b>M13 F</b>	CAGGAAACAGCTATGA	Invitrogen
<b>M13 R</b>	CTGGCCGTCGTTTTAC	Invitrogen
<b>2102 leftF</b>	CGGTTGGGTGACCGCCGCA	Esta tesis
<b>2102leftR</b>	GCGGCTCCGGCTTCTCTTCCGTACGCCCTCTC CCAGTGGC	Esta tesis

## II. METODOLOGÍA

**Tabla 7.** Continuación.

PRIMERS	SECUENCIA	REFERENCIA
<b>2102 rightF</b>	GCCACTGGGAGAGGGGCGTACGGAAGAGGAA GCCGGAGCCGC	Esta tesis
<b>2102 rightR</b>	AGGAGCCGCTGTGGCCCAAC	Esta tesis
<b>sg2102F</b>	GGCTTCCTCTTCCTCAGAAG	Esta tesis
<b>sgRNA-R</b>	ACGCCTACGTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC	Esta tesis
<b>CAS91R</b>	GTAGTACGGGATGCGGAAGG	Esta tesis
<b>CAS9-1F</b>	ATTACTGGACCGGATCGGG	Esta tesis
<b>2103F</b>	AACCTGGACGAGGTGCTGG	Esta tesis
<b>2103R</b>	CGTTACGCAGTGTGTCGCAAAT	Esta tesis
<b>210203R</b>	TGCGCGACCGTCTCCTGT	Esta tesis
<b>sg2103F</b>	CCGGCGGCTGTACGCTCGAT	Esta tesis
<b>2103 LeftF</b>	GTAGCCAGGTTTCCGACTGT	Esta tesis
<b>2103 LeftR</b>	GATCGTCCTTGGCTGTGAGATGGGCAGGTTAGC CAGGGT	Esta tesis
<b>2103 RightF</b>	ACCCTGGCTAACCTGCCCAT CTCACAGCCAAGGACGATC	Esta tesis
<b>2103 RightR</b>	TCTTCCTCAGAAGCGGTACT	Esta tesis
<b>TerF</b>	AACTGGTCAGGCTCATCAAGG	Esta tesis
<b>TerR</b>	TTCCGCGGCTCCAGT	Esta tesis
<b>2103R2</b>	GGCCCGCGGTGGGTGG	Esta tesis
<b>q2103F</b>	GGTGACCAGTGTGAAGATG	Esta tesis
<b>q2103R</b>	GAGTTGTTGAGCGTGATGA	Esta tesis
<b>q2102F</b>	AACTCGTACGGCGTCTA	Esta tesis
<b>q2102R</b>	ATGTACGGGTCGGAGTAG	Esta tesis
<b>q4758F</b>	ATCACCGACCGGATGCCCTT	(Li et al., 2015)

## II. METODOLOGÍA

---

**Tabla 7.** Continuación.

PRIMERS	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>q4758R</i>	GCCGAGCCCCGCTTCTTC	(Li et al., 2015)
<i>SCO3798intF</i>	CAGCTCGTCCTTGGTGTTC	Esta tesis
<i>SCO3798intR</i>	TCAGGTCCATGACGTTTCCC	Esta tesis

### II.2.4. Procedimiento general para la clonación de fragmentos de ADN, purificación y conservación de plásmidos.

Los fragmentos obtenidos mediante digestiones enzimáticas o amplificados por PCR se aislaron en geles de agarosa (0,8 %) y se purificaron mediante el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel). Los fragmentos se clonaron en pCR™-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) para su conservación comprobando la secuencia del inserto mediante secuenciación empleando los cebadores universales *M13F* y *M13R* (Tabla 7). Las ligaciones se llevaron a cabo con la ligasa *T4 DNA ligase* (Invitrogen) con 200 ng de inserto para 50 ng de vector, añadiendo 1µL de ligasa (5U/ µl) en un volumen final de 10 µL.

La introducción de plásmidos en *E. coli* DH5α se realizó por transformación química (*Hanahan et al., 1991*). El ADN plasmídico a partir de *E. coli* se obtuvo mediante lisis alcalina (*Bimboim and Doly, 1979*) para comprobar las construcciones por digestiones enzimáticas. Los plásmidos se conservaron a -20°C en agua destilada estéril.

### II.3. ESTUDIO DE LOS GENES *SCO2102* Y *SCO2103*

El punto de partida para el estudio de los genes *SCO2102* y *SCO2103* fue el mutante *SCO2103::Tn5*, el cual se detalla su fenotipo en el capítulo IV.2 de resultados. Este mutante pertenece a la librería de mutantes obtenida utilizando el sistema de mutagénesis seguido por *Xu et al., 2017* y descrito en el apartado II.2.1 (*Xu et al., 2017*).

La inserción del transposón afecta a los genes *SCO2102* y *SCO2103* por lo que decidimos mutar de forma independiente cada gen mediante el sistema CRISPR/Cas9, generado los *knockout*  $\Delta$ *SCO2102* y  $\Delta$ *SCO2103*. Complementamos estos mutantes *knockout* con distintas construcciones incluyendo varias combinaciones de los dos promotores presentes, lo cual se detalla en el apartado IV.2.7. de resultados. EL plásmido integrativo utilizado para las complementaciones fue pNG3 (*Gonzalez-Quinonez et al., 2016*) (Tabla 4).

#### II.3.1. Mutantes $\Delta$ *SCO2102* y $\Delta$ *SCO2103*

Para deletar los genes *SCO2102* y *SCO2103* por la técnica de CRISPR/Cas9, hemos seguido el método de *Tong et al., (2015)* (*Tong et al., 2015*). Se diseña una secuencia diana de 20nt sobre sgRNA, donde 20nt es específico de cada gen. Esta será la secuencia guía para deletar el gen de interés, de esta forma, sgRNA-F (*sgRNA-F 2102* y *sgRNA-F 2103*) y *sgRNA-R* (Tabla 7) (éste último sirve para las dos construcciones) se utilizaron para amplificar las secuencias guía. El producto que se obtuvo (110 pb) fue digerido con *NcoI* y *SnaBI*, y clonado en el vector pCRISPR/Cas9, entre los sitios *NcoI* y *SnaBI*. En las PCRs se utilizó DNA cromosómico de la cepa salvaje como molde y se utilizó la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización a 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 10 s, 71 °C (-1 °C/ciclo) 30 s, 72 °C 4 s; un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min.

## II. METODOLOGÍA

---

Para la comprobación de la secuencia diana dentro del plásmido se utilizaron los cebadores *N20-2102* o *N20-2103/* *crisrcas9R* (Tabla 7) y en este caso se utilizó la polimerasa *BIOTAQ™ DNA Polymerase* (Bioline). El ciclo de PCR empleado fue: desnaturalización a 94°C, 2 min; 30 ciclos de: 94°C 30 s, 60°C 30 s, y 72°C 60 s; y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min.

Para obtener las regiones homólogas que flanquean al gen de interés se diseñaron los cebadores *2102RightF/2102RightR*, *2102leftF/2102leftR*, *2103rightF/2103rightR* y *2103leftF/2103leftR* (Tabla 7). A partir de ADN de la cepa salvaje y utilizando la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) se amplificó cada región (aproximadamente 1 Kb). Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización a 98°C 30 s; 30 ciclos de 98°C 30 s, 65 -71°C 30 s, 7 °C 35 s; un paso de extensión final a 72°C durante 10 min.

Los distintos productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 0,8% y se purificaron utilizando el kit *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel). Usando como molde estos productos (concentración mínima 20 ng/μl), se realizaron dos PCR anidadas (una para cada gen) para conseguir el solapamiento de las regiones utilizando los cebadores, *2102leftF/2102RightR* y *2103leftF/2103rightR* (Tabla 7). Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización a 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98°C 10 s, 65- 71°C 30 s, 72°C 65 s; un paso de extensión final a 72°C durante 10 min.

El producto amplificado (aproximadamente 2 Kb) se clonó en el vector *pCR™-Blunt II™TOPO®* obteniéndose el plásmido *pTOPO-overlap2102* y *pTOPO-overlap2103*, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger. Este inserto se digirió con el enzima *StuI* y se clonó en el plásmido *pCRISPR/Cas9* con la secuencia diana, previamente digerido con *StuI*.

Introdujimos estas construcciones *en E. coli ET12567(pUZ8002)* mediante transformación química y mediante conjugación, las transferimos a *Streptomyces* utilizando un cultivo de 5mL de la cepa donadora y una concentración de  $1.10^8$  esporas



## II. METODOLOGÍA

---

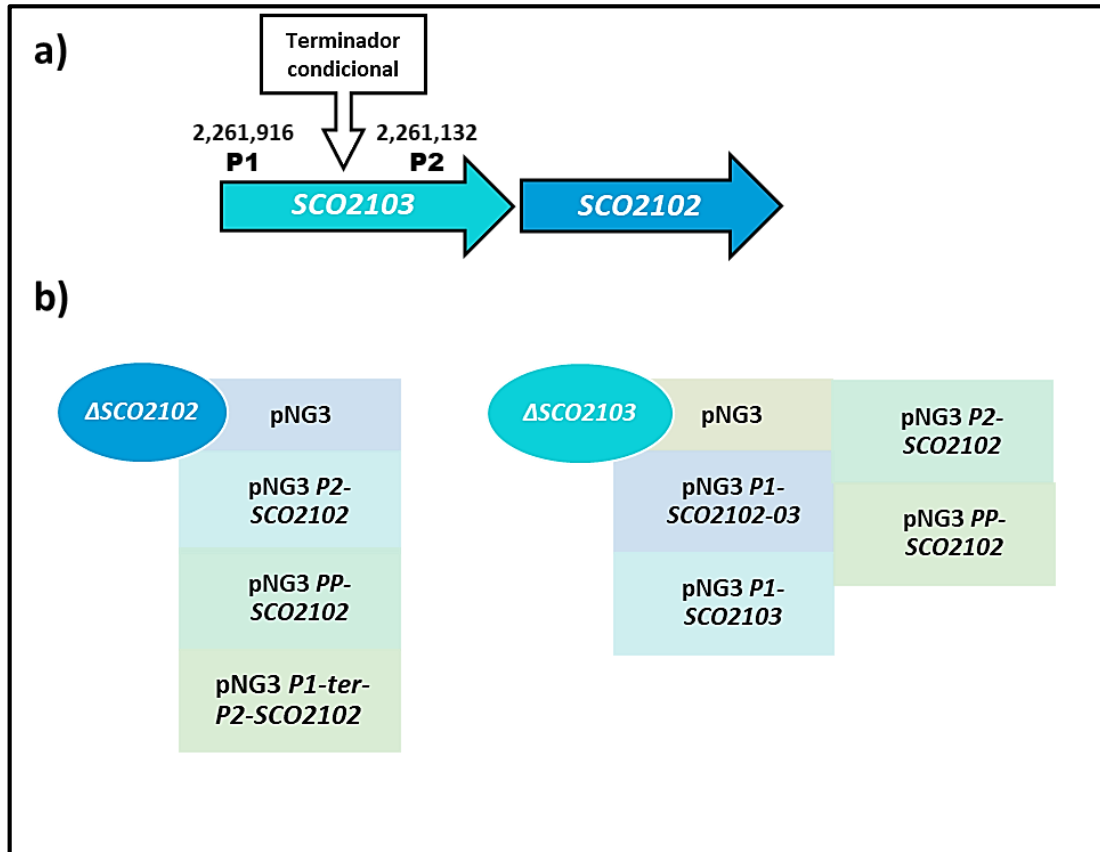
de la cepa receptora. Se seleccionó con apramicina y nalidíxico y se incubó 3 días a 30°C. Cuando los exconjugantes crecieron, se picaron colonias en placas que contenían apramicina y tioestreptona (concentración 1µg/ mL) y se incubaron 1 semana a 30°C.

Tras sucesivos pases, se recogieron esporas de cada clon, se sembraron 100 µl de una dilución de 10<sup>-5</sup> esporas en medio sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 3 días para la eliminación del plásmido pCRISPR/Cas9, ya que solo se elimina en temperaturas superiores a 34°C (*Tong et al., 2015*). *A posteriori*, se corroboró la pérdida del plásmido con sensibilidad a apramicina.

Finalmente, en los clones positivos se comprobó por PCR la pérdida del plásmido pCRIPSR/Cas9 con los cebadores *CAS91F/ CAS91R* y la delección de cada gen con los cebadores *2102F/2102R* o *2103F/2103R* (Tabla 7). Las reacciones se prepararon de acuerdo con las indicaciones para la polimerasa *BIOTAQ™ DNA Polymerase* (Bioline). El ciclo de PCR empleado para la pérdida de plásmido fue el siguiente: desnaturalización a 94°C, 2 min; 30 ciclos de: 94 °C 30 s, 53°C 30 s, y 72 °C 45 s; y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Para la comprobación de la delección de cada gen se siguió el mismo ciclo modificando la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión siendo, respectivamente, 65,5°C 30 s, y 72°C 39 s para *SCO2102* y 59,2°C 30 s, y 72°C 90 s para *SCO2103*.

### **II.3.2. Diseño de las construcciones de complementación de los mutantes *ΔSCO2102* y *ΔSCO2103***

Cada mutante fue complementado con diferentes combinaciones de dos promotores (P1 y P2) y genes (*SCO2102/2103*): *ΔSCO2102* [pNG3], *ΔSCO2102* [P2-*SCO2102*] y *ΔSCO2102* [pNG3 *PP-SCO2102*]; *ΔSCO2103* [pNG3], *ΔSCO2103* [pNG3 P2-*SCO2102*], *ΔSCO2103* [pNG3 P1-*SCO2102-03*], *ΔSCO2103* [pNG3 *PP-SCO2102*] y *ΔSCO2103* [pNG3 P1-*SCO2103*] (Figura 13).



**Figura 13.** (a) Esquema representativo de la posición de los promotores P1 y P2 de *SCO2103*, y el terminador condicional situado entre ambos. (b) Construcciones de complementación en los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ , los cuales fueron mutados por la técnica CRISPR/Cas9.

#### a) Construcción pNG3 P2-SCO2102

Se amplificó por PCR la región que abarca *SCO2102* y parte de *SCO2103* dejando margen para incluir el promotor P2 (1312 pb en total), utilizando los cebadores *SCO2102F* (incluye sitio de corte *EcoRV*) y *SCO2102R* (incluye sitio de corte *SpeI*) (Tabla 7), utilizando como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor M145*.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue

## II. METODOLOGÍA

el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 58-70 °C 30 s, 72 °C 39 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-P2-SCO2102, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores *M13 F/R*. El fragmento *SpeI*-P2-SCO2102-*EcoRV* se obtuvo mediante digestión *SpeI/EcoRV* de pTOPO-P1-SCO2102 y se clonó entre los sitios *SpeI/EcoRV* de pNG3, obteniéndose pNG3 P2-SCO2102.

### b) Construcción pNG3 PP-SCO2102

En el caso de la construcción pNG3 PP-SCO2102 partimos de una secuencia que fue sintetizada por BGI Genomics (Hong Kong) (Tabla 8). Esta construcción engloba los dos promotores (P1 y P2) en pauta junto con el gen *SCO2102* y se encuentra flanqueada por los cortes *SpeI/EcoRV*. La secuencia se recibió clonada en pKMV y con sus respectivos ficheros de secuenciación por el método de Sanger. Para clonar el inserto PP-SCO2102 (1574pb) en pNG3 se digirieron ambos vectores con *SpeI/EcoRV*.

**Tabla 8.** Secuencia de la construcción sintetizada PP-SCO2102. P1, en verde y P2, en naranja, son los promotores mencionados en el apartado II.3.1. En azul se muestra la ORF de *SCO2102* y en rojo los cortes de los enzimas de restricción.

**PP-SCO2102:** *SpeI*+ P1+ P2+ *SCO2102*+ *EcoRV*

```
ACTAGTAACTGGACGAGGTGCTGGAGGCGGGCGCCGGCGCGTGGTCTGTCGTCGCGCGGATACCCGCCGCGAGGACC
CGGGCGCGGGCGCGGCCGAGTTCGCCGGCGGGTGCGGCAGGCTCCGGCACACGGGTAGCCGCACCTCGCCACCGACGT
CGTCGACAGCCGTCGTCTGCGGCGGGCAGGTGTCCAAAGGGTGGACAACAACCTCGACAATGTGGACAAAAGTCCCGCAT
CCGTTGGGTGACCGCCGACCCCTGGTAACCTGCCATCTCACAGCAAGGACGATCCGGCGGCTGTACGCTCGATCGG
CATCGAGTTCGCCACGGAGTTCTGCGCGCGGCTGCTGGCCGAGGGAGTGCCAGGACTGCACTTCATCACGCTCAACAAC
CCACGGCGACGCTGGAATCTACGAGAACCTGGCCCTGCACCAACCACCGGGCCCTAGACCGGCCGACGATTTGCGA
CACACTGCGTAACGGCCACTGGGAGAGGGGCGTACATGGGCTGGACGGTCTCTACATCGCGTTCGGCGTCTGTCGCGCTG
TGGTGTCTCGGCGAGGTGCTGCTGCAGTACAAGGCGGGCTGCCTGGCGGCTGCTGGCCTTCGCCGGCTTCGTCGGGCTG
CGTGGCCGGTGTGCTGATGTCGAACGTGCTCGTCATCGGCGTGGTGCCGCCCTTCGCGGTGCGCCAGACCTACGTCA
CCCTGTCGTTCCGCCGCGCTTCGAGGCCGGTGGGCGGTCAACGCCCGGCGAGCCTGTCGGCAAGCGCGGGCGTCCC
GAACGGGGCCCGGGAACCGACGTTGGAGGTCTCCGGGCTCGAACCCGCGAGGGCGGCCGGACCACCACGACGGC
TAGCAGAGCCCGCCCGGGCCAGGACGGCACCGGCTCGTACGGGACGACGACTACGACCGGACGACGCTTTCACCC
GGCCCGCCACCPCGACCCCTCGGCCGAGAGACCACCGCGTCTACGAACCGCAGCCATGCCGGACGACCAACT
CGTACGGGCTTACACCGACGCCGTTACGGCACCGCCAGCAGCAGGGCGCCGCCGCGCCGGACCGGACCAGGCGTA
CGCCTACGACTACTCCGGTACGGCCAGCAGCAGGAGTACGGTACGACACCGGCGCCAGCAGCAGTACGCCGCTACT
CCGACCCGTACATCGGCACCCACACCTACGGCGGGGACGTACGACACCGGCGGCTACGACACGACCGGTGAGCAGAA
CTACGGCCAGCAGGGTACGGGACGAGACAGTACGCCCCGGCGCCCCGGCGCCCCGGCGCGCCCGGGCGGCTACGGC
GGCAGACCCCGCCGGCGGAGTGTGGGTGCCGACGACGCGACACCGACACCCCTACGGCGGCGAGCTCCCGCCG
AGCAGCAGCCCTACCCCTACCAGGGCGACGGCCAGACGACGGCCAGGGCTACGACGAGCAGTACCGCTTCTGAGGAAG
AGGAAGCCCGAGCCGCTCACTGGGAGCCGCGGAACTCCGGCCCTCCACCACGAGTCCGATATC
```

## II. METODOLOGÍA

---

### **c) Construcción pNG3 P1-SCO2103**

Para amplificar *SCO2103* y su correspondiente promotor P1 (1229 pb en total), se emplearon los cebadores *2103F* (incluye sitio de corte *SpeI*) y *2103R* (incluye sitio de corte *EcoRV*) (Tabla 7), utilizando como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 60-70 °C 30 s, 72 °C 38 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-P1-SCO2103, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores *M13 F/R*. El fragmento *SpeI*-P1-SCO2103-*EcoRV* se obtuvo mediante digestión *SpeI/EcoRV* de pTOPO-P1-SCO2103 y se clonó entre los sitios *SpeI/EcoRV* de pNG3, obteniéndose pNG3-P1-SCO2103.

### **d) Construcción pNG3 P1-SCO2102-03**

Los genes *SCO2103* y *SCO2102* y sus respectivos promotores (2530 pb) se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores *2103F* (incluye sitio de corte *SpeI*) y *210203R* (incluye sitio de corte *EcoRV*) (Tabla 7). Como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. Coelicolor* M145.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 60-70 °C 30 s, 72 °C 75 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-P1-SCO2102-03, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores *M13 F/R*. El fragmento *SpeI*-P1-SCO2102-03-*EcoRV* se obtuvo mediante digestión *SpeI/EcoRV* de pTOPO-P1-SCO2102-03 y se clonó entre los sitios *SpeI/EcoRV* de pNG3, obteniéndose pNG3-P1-SCO2102-03.

## II. METODOLOGÍA

---

### e) Construcción pNG3-P1-ter-P2-SCO2102

Se diseñaron los cebadores TerF (incluye el corte *EcoRV*) y TerR (incluye el corte *XbaI*) (Tabla 7) para amplificar la región del terminador condicional presente en la parte final de la ORF del gen *SCO2103*. Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 63-68 °C 30 s, 72 °C 48 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El fragmento se clonó dentro del plásmido pKMV-P1 entre los sitios de corte *XbaI/EcoRV*, dando lugar al plásmido pKMV-P1-ter-P2-SCO2102, el cual se comprobó mediante secuenciación de Sanger con los cebadores *M13 F/R*. Después, el plásmido pKMV-P1-ter-P2-SCO2102 se digirió con las enzimas *SpeI/EcoRV*, liberando el inserto -P1-ter-P2-SCO2102 para clonarlo en el vector pGN3, previamente digerido en los mismos sitios de corte.

### II.3.3. Conjugación de las construcciones de complementación

#### a) Conjugación de las construcciones de complementación

Las construcciones de complementación se introdujeron en el mutante  $\Delta$ SCO2102 mediante conjugación siguiendo el protocolo de *Kiesser et al., (2000)*, utilizando 5 mL de cultivo de *E. coli* ET1257 (pUZ8002) y  $3 \times 10^8$  esporas del mutante. Las colonias resultantes se seleccionaron con higromicina.

#### b) Transformación de las construcciones de complementación

Como el mutante  $\Delta$ SCO213 muestra un fenotipo *bld*, éste se complementó mediante la transformación de protoplastos. Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo de *Kiesser et al., (Kieser, 2000)* con algunas modificaciones en función de la cepa utilizada. Se inoculó 1 mL de micelio por matraz indentado con 25 mL de medio 34% YEME suplementado con glicina al 20% y  $MgCl_2$  2,5M. Se incubó a 30°C, 200 rpm, durante 40h. Después, se pasó el contenido del matraz a un tubo de 50 mL y se

## II. METODOLOGÍA

---

realizaron 3 lavados con 10-15 mL de sacarosa al 10,3%, centrifugando 1000x g, 10 minutos. Una vez lavado, el *pellet* se resuspendió en 4 mL de *buffer* P (composición 10,3% sacarosa, 0,025 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,202 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,2 mL oligoelementos 1x; se iguala a 80 mL con agua destilada. Una vez autoclavado se suplementa con 1 mL 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mL CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 10 mL TES Buffer 5,73% pH 7,2) con lisozima (concentración 1 mg/mL) y se incubó a 30°C durante 1 hora, agitando los tubos cada 10 minutos. Se mantuvo 15 minutos más a 30°C tras agitar la suspensión 3 veces con una pipeta de vidrio de 5mL. En este punto se echó un vistazo en el microscopio a la suspensión de protoplastos para comprobar su estado. A continuación, se añadieron 5 mL de *buffer* P, se agitó de nuevo la suspensión, y se filtró a través de jeringas con algodón hidrófilo para eliminar los posibles restos de micelio que no se hubieran disgregado. Finalmente, se centrifugó 10 minutos a 1000x g y una vez sedimentaron los protoplastos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µl de *buffer* P. Las alícuotas se almacenaron en el congelador a -80°C o fueron usadas inmediatamente.

Para la transformación, se partió de una alícuota de protoplastos a la que se le añadió 20 µl de ADN plasmídico a una concentración de 50 ng/µl y 500 µl de PEG1000 al 25%. Previamente, se obtuvo el ADN plasmídico mediante el *kit GenElute HP Plasmid Miniprep* (Sigma). La suspensión se sembró en placas con medio R5 y se incubó a 30°C durante 16-18h. Al día siguiente se seleccionó con el antibiótico adecuado. Finalmente, los exconjugantes se seleccionaron con higromicina.

### **II.3.4. Comprobación del sitio de integración $\Phi$ BT1 en el vector pNG3**

El plásmido pNG3 fue creado en nuestro laboratorio modificando el sitio de integración de  $\Phi$ BT1 a partir del plásmido pMS82 (Gonzalez-Quinonez et al., 2016). Los vectores derivados de  $\Phi$ BT1 se integran en el sitio attB único localizado en el gen *SCO4848* dentro del genoma de *S. coelicolor* y para comprobarlo se diseñaron los

## II. METODOLOGÍA

---

cebadores SCO4848F/pMS82R (Tabla 7) en los que, si amplifican un fragmento de 617 pb, significa que el plásmido está integrado (*Gonzalez-Quinonez et al., 2016*)

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *BIOTAQ™ DNA Polymerase* (Bioline). El ciclo de PCR empleado fue el siguiente: desnaturalización a 94°C durante 5 min; 30 ciclos de: 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, y 72 °C 50 s; y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. Como control negativo se utilizó el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145.

### **II.3.5. Diseño de las proteínas SCO2102 y SCO2103 fusionadas a proteínas fluorescentes**

#### **a) Construcción de pNG3 P2-SCO2102eGFP y pNG3 P2-SCO2102mCherry**

Con el fin de analizar la dinámica de SCO2102 decidimos fusionarla con dos proteínas fluorescentes de forma independiente. Por un lado, tendríamos la construcción P2-SCO2102eGFP, y por el otro, P2-SCO2102mCherry. Estas construcciones se sintetizaron en BGI Genomics (Hong Kong), fusionando la proteína fluorescente hacia el lado C-terminal (*Shaner et al., 2004*). La secuencia de aminoácidos de las proteínas fluorescentes se tomaron del GenBank (mCherry no UFQ89828 y eGFP no AFA52654) adaptando el sesgo de codones a *Streptomyces*, utilizando para ello la Tabla de los codones utilizados en 100 cepas de *Streptomyces* reportada en Kieser (*Kieser, 2000*). Las secuencias sintetizadas, incluían la región promotora de SCO2102 (P2) junto con la ORF de SCO2102 (sin el codón de stop) y la proteína fluorescente en pauta con SCO2102. Se recibieron clonadas en el vector pMV.

En primer lugar, se digirió la construcción sintetizada SCO2102-mCherry en el vector pMV con los enzimas *SpeI/EcoRV*, y se clonó en el plásmido integrativo pNG3 entre estas enzimas de restricción, dando lugar al plásmido pNG3- SCO2102-mCherry. Para obtener la construcción con la proteína verde, se digirió el vector pMV con los enzimas *XhoI/ EcoRV*, y se clonó en el plásmido pNG3- SCO2102-mCherry, previamente digerido con los mismos enzimas, donde básicamente se cambia la proteína roja

## II. METODOLOGÍA

(mCherry) por la proteína verde (eGFP) dejando el gen *SCO2102* intacto. Por último, estos genes clonados en pNG3 se introdujeron en la cepa salvaje de *S. coelicolor* mediante conjugación (Kieser, 2000) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Secuencias sintetizadas de las proteínas fluorescentes. En el cuadro superior, P2, en verde, en color negro la ORF de *SCO2102*, en naranja, mCherry en pauta con el gen, en rojo los cortes de los enzimas de restricción. En el cuadro inferior, en verde la proteína eGFP y en rojo los cortes de los enzimas de restricción.

***SCO2102-mCherry:*** SpeI + P2+ NdeI+ *SCO2102*+ XhoI + mCherry+ SnaBI + HpaI + EcoRV

ACTAGTATCCTCACAGCCAAGGACGATCCGGCGGCTGTACGCTCGATCGGCATCGAGTTCGCCACGGAGTTCTGCGCGCGG  
CTGCTGGCCGAGGGAGTGCCAGGACTGCACTTCATCACGCTCAACAACCTCCACGGCGACGCTGGAAATCTACGAGAACCTG  
GGCTGCACCAACCACCGCGGGCTAGACCGGCCGACGTATTGCGACACACTGCGTAACGGCCACTGGGAGAGGGGCG  
TACCATATGGGCTGGACGGTCTCTACATCGCTTCGGGCTCGTCGCGCTGTGGCTGCTCGGCGAGGTGCTGCTGCAGTAC  
AAGGCGCGGCTGCGCTGGCGGCTGCTGGCCTTCGCCGGCTTCGTGCGGCTCGTGGCCGGTGTGCTGATGTGCAACGTGCTC  
GTCATCGGCGTGGTGGCCGCCCTTCGCGGTCGGCCAGACCTACGTACCCTGTCGTTCCGCCGCGGCTTCGAGGCCGGC  
TGGGCGGTCAACGCCCGGCGAGCCTCGTCGGCAAGCGCGGGCGTCCGAACGGGGCCGCCGGGAACCGACGTTGGAGG  
TCTCCGGGCTCGAACCCGCCGAGGGCGGGCCGGACCACCACGACGGCTACGACGAGCCCGCCCGGGCCAGGACGGCACC  
GGCTCGTACGGGCACGACGACTACGACCGGACGACGTCTTACCCCGGCCCGGCCACCGCCGACCCCTCGGCCGAGAG  
ACCACCGCGTCTACGAACCGCAGCCCATGCCGGACGACACCAACTCGTACGGCGTCTACACCGACGCCGGTTACGGCACC  
GGCCAGCAGCAGGGCGGCCGCCGCGCCGGACGCCAGGCGTACGCCCTACGACTACTCCGGTACGGCCAGCAGCAGGA  
GTACGGTACGACACCGGCGCCAGCAGCAGTACGCCCGCTACTCCGACCCGTACATCGGCACCCACACCTACGGCGGCGG  
GACGTACGACACCGGCGGCTACGACACGACCGGTGAGCAGAACTACGGCCAGCAGGGTACGGGCAGGACAGTACGCC  
CCCGGCGCCCCGGCGCCCCGGCGCGCCGGCGGCTACGGCGGCGAGACCCCGGCCGGGAGTGTGGGTGCCGACG  
AGCGCAGCACCGACGACCCCTACGGCGGCGAGCTCCCGCCGAGCAGCAGCCCTACCCTACCAGGGCGACGGCCAGACG  
CAGGGCCAGGGTACGACGAGCAGTACCGCTTCTCGAGATGGTCAGCAAGGGCGAGGAGGACAACATGGCCATCATCAA  
GGAGTTATGCGCTTCAAGGTCCACATGGAGGGTCCGTCAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC  
CGCCCGTACGAGGGCACCCAGACCCGCAAGCTGAAGGTACCAAGGGCGGCCGCTGCCGTTCCGCTGGGACATCCTGTCC  
CCGAGTTCATGTACGGTCCAAGGCTACGTCAAGCACCCCGCCGACATCCCGGACTACCTGAAGCTGTCTTCCCGAGG  
GCTTCAAGTGGGAGCGCGTATGAAGTTCGAGGACGGCGGCGTGTACCCGTACCCAGGACTCCTCCTGCAGGACGGC  
GAGTTCATCTACAAGGTCAAGTCCGCGGCACCAACTTCCGTCGACGGCCCGGTATGCAAGAAGAAGACCATGGGCTGG  
GAGGCTCCTCCGAGCGCATGTACCCGGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGCGCCTGAAGTGAAGGACG  
GCGGCCACTACGAGCCGAGGTCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGCCGGTCCAGCTGCCGGGCGCCTACAACGTCAACA  
TCAAGTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACCATCGTCGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCG  
GCGCATGGACGAGCTGTACAAGTATACGTAGTTAACGATATC

***eGFP:*** XhoI + eGFP + SnaBI + HpaI + EcoRV

CTCGAGATGGTCTCCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGCTCGTCCGATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTCAACGG  
CCACAAGTTCTCCGTCTCCGGCGAGGGCGAGGGCGACGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG  
CAAGTGTCCGGTCCCGTGGCCGACCTGGTACCACCTGACTACGGCGTCCAGTGTCTTCCCGTACCCGGACCACATG  
AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAGGGTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTAAGGACGACGGCACT  
ACAAGACCCGCGCCGAGGTCAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTCAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG  
GACGGCAACATCCTGGGCCAAAGTGGAGTACAACCTCCACAACGTCTACATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGC  
GCATCAAGGTCAACTCAAGATCCGCACAACATCGAGGACGGTCCGTCCAGTGGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC  
GATCGGCGACGGCCGGTCTGCTGCCGACAACCACTACTGTCCACCCAGTCCGCCCTGTCAAGGACCCCAACGAGAAG  
CGGACACATGCTCCTGCTGGAGTTCGTACCCGCCCGGCATCACCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGTACGTA  
GTTAACGATATC



## II. METODOLOGÍA

---

### b) Construcción pNG3 P1P2-SCO2102mCherry

También se sintetizó en BGI Genomics (Hong Kong) de forma separada el promotor P1 (Tabla 10), ya que un punto de interés era ver la expresión del gen con uno y con dos promotores. P1 se recibió clonado en el vector pKMV, que tras digerirlo con *XbaI/EcoRV*, se clonó el inserto P2-SCO2102mCherry digerido previamente con *SpeI/EcoRV*, dando lugar así al plásmido pKMV P1P2-SCO2102mCherry. Una vez comprobado por secuenciación de Sanger con los cebadores M13 F/ R, el fragmento P1P2-SCO2102mCherry se obtuvo mediante digestión *SpeI/EcoRV* de pKMV P1P2-SCO2102mCherry y se clonó entre los sitios *SpeI/EcoRV* de pNG3, obteniéndose pNG3-P1P2-SCO2102mCherry.

**Tabla 10.** Tabla de la construcción sintetizada de P1. La secuencia del promotor aparece en color negro y los cortes de los enzimas de restricción en color rojo.

**P1:** SpeI + P1+ XbaI+ EcoRV

```
ACTAGTAACCTGGACGAGGTGCTGGAGGCGGGCGCCCGCGCGTGGTCGTCGTGCGCGCATCACCGCCGC
CGAGGACCCGGGCGCGGCGGCGGCCGAGTTCCGCCGGCGGCTGCGGCAGGCTCCGGCACACGGGTAGCCG
CACCTCGCCACCGACGTCGTCGCGAGGCCGTCGTCGCGGCGGGCAGGTGTCCAAAGGGTGGACAACAACCTCG
ACAATGTGGACAAAAGTCCCGCATCCGGTTGGGTGACCGCCGCACCCTGGCTAACCTGCCCATCTCTAGAGATA
TC
```

### c) Construcción pNG3-P1- SCO2103eGFP

Para ver la dinámica de *SCO2103*, fusionamos el gen *SCO2103* junto con su promotor (P1) con el gen *eGFP*. Para ello amplificamos por PCR el gen *SCO2103* eliminando el codón de stop y abarcando el promotor P1 (1191 pb) con los cebadores 2103F (incluye el sitio de corte *SpeI*) y 2103R2 (incluye el sitio de corte *XhoI*) (Tabla 7). Como molde se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado fue

## II. METODOLOGÍA

---

el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 64-71 °C 30 s, 72 °C 39 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-P1-SCO2103, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores M13 F/ R. Se digirió con los enzimas *SpeI/XhoI* y se obtuvo el fragmento *SpeI*-P1-SCO2103-*XhoI* que se clonó entre los sitios *SpeI/ XhoI* de la construcción pNG3-P2-SCO2102eGFP, dando lugar al plásmido pNG3 P1-SCO2103eGFP.

### **d) Construcción pRAS P1-SCO2103eGFP**

Una forma de ver la interacción entre las proteínas SCO2102 y SCO2103 sería combinarlos en la misma cepa fusionados con proteínas fluorescentes. Para ello creamos la construcción pRAS-P1-SCO2103eGFP y la conjugamos en la cepa  $\Delta$ SCO2102 [pNG3-P1P2-SCO2102mCherry].

Para ello clonamos P1-SCO2103eGFP en el vector integrativo pRAS (un vector derivado de pRA cedido por Antonio Rodríguez y Alberto Sola-Landa; INBIOTEC, León, España) (Perez-Redondo *et al.*, 2010). El inserto P1-SCO2103eGFP lo obtuvimos de la construcción pNG3-P1-SCO2103eGFP digiriendo con los enzimas *SpeI/EcoRV* y lo clonamos en pRAS digerido con los mismos enzimas.

Los plásmidos integrativos pRAS y pNG3 tienen diferentes sitios de integración ( $\Phi$ C31 y  $\Phi$ BT1 respectivamente). El plásmido pRAS se integra en el sitio  $\phi$ C31 (SCO3798) en el genoma de *S. coelicolor* (Combes *et al.*, 2002). Con el fin de comprobar que la integración del plásmido es correcta, diseñamos los cebadores 3798intF y 3798intR (Tabla 7), con los que se produce una amplificación de un fragmento de 1122 pb en el caso de que el vector se haya integrado correctamente.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 minuto 10 segundos.; extensión final 72 °C 10 min.

### II.3.6. Microscopía láser confocal y de fluorescencia

La esporulación de las hifas se analizó al microscopio láser confocal tras la tinción con SYTO9 e IP tal como se describe en el apartado II.2.2 de metodología.

Las proteínas fluorescentes (eGFP y mCherry fusionadas a la proteína de interés), se observaron usando un microscopio de fluorescencia Leica DMRXA con filtros FITC y Texas Red. Se colocaron cubreobjetos bajo un ángulo de 45 grados en los cultivos sólidos. En los tiempos indicados, se quitaron los cubreobjetos, se montaron con agua estéril y se observaron al microscopio de fluorescencia.

### II.3.7. Cuantificación de la producción de antibiótico y de proteína

Las muestras empleadas para la cuantificación de la producción de antibióticos fueron obtenidas a partir de cultivos en medio líquido en 20 mL de medio R5A sin sacarosa, utilizando matraces de 50 mL sin indentaciones y en tiempo final de 168 horas (el tiempo en el que la producción de antibiótico es máxima). Cada matraz, se inoculó con  $1 \cdot 10^7$  esporas/mL a partir de suspensiones de esporas frescas. En el caso de las cepas *bid*, se inoculó el micelio equivalente a 26.3 mg de proteína en cada matraz. La incubación se realizó a 30 °C con 200 rpm de agitación.

La producción de actinorrodina y undecilprodigiosina se cuantificó espectrofotométricamente, de acuerdo con el protocolo establecido por Tsao et al. y Bystrykh et al. (Tsao et al., 1985, Bystrykh et al., 1996). 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 Lamber-Beer para estimar la concentración ( $\epsilon_{640} =$

## II. METODOLOGÍA

---

25.320) (*Kieser, 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, 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.

La concentración de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (*Bradford, 1976*) utilizando el estándar de albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich, Burlington, MA, EE. UU.). Los extractos de proteínas totales se obtuvieron mezclando un volumen de cultivo con un volumen de NaOH 1 M, hirviendo durante 5 min y eliminando los restos celulares mediante centrifugación a 7740x g.

Se tomaron tres muestras biológicas y dos réplicas metodológicas. El análisis estadístico que se realizó fue una prueba t para media de dos muestras emparejadas considerando diferencias significativas aquellas con un p valor menor o igual a 0.05.

### II.3.8. Cuantificación ADN cromosómico

La cantidad de ADN se cuantificó en las cepas salvaje (WT), y en los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 según el método de Burton (*Burton, 1956*). Se analizaron tres réplicas biológicas a partir de cultivos de 48h. Se sembraron  $1.10^7$  esporas, o el micelio equivalente a 26,3 mg de proteína en el caso de  $\Delta$ SCO2103, en placas con 25 mL de medio sólido GYM recubierto con discos de celofán estériles. A las 48h se recogieron 0,2 g de micelio de cada cepa y se resuspendieron en 2 mL de tampón de ruptura (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM e inhibidores de proteasa libre de EDTA, Roche). El micelio se lisó por sonicación (MSE soniprep 150) durante 6 ciclos con descansos de 60 segundos y se centrifugó 10000x g, 10 minutos a 4°C para eliminar los restos que hubiesen quedado. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo. Para cuantificar el ADN, se partió de 125  $\mu$ l de micelio lisado y se completó hasta 500  $\mu$ l con tampón de ruptura. A cada tubo se le añadieron 500  $\mu$ l de ácido perclórico 0.5 N y se incubaron durante 70

## II. METODOLOGÍA

---

minutos a 70°C. Luego, se enfriaron durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 1500x g 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante a un tubo nuevo. A cada *pellet* se le añade de nuevo 500 µl de ácido perclórico 0.5 N, se enfría y centrifuga y se junta el sobrenadante con el del paso anterior. Finalmente, por cada volumen de sobrenadante se añadieron 2 volúmenes de difenilamina y se incubó 18h a 30 °C. La absorbancia se midió a 600 nm.

La concentración de ADN se normalizó en relación con la proteína total medida por el método de Bradford (*Bradford, 1976*), y las muestras se analizaron por triplicado. La significación estadística se estimó utilizando una prueba t para media de dos muestras emparejadas estableciendo el umbral de significancia en un p valor menor o igual a 0,05.

Las curvas estándar de ADN se crearon utilizando una solución de ADN de timo de ternera de 1 mg/mL (Sigma Aldrich) que fue procesada y cuantificada por el método de Burton en paralelo a las muestras de *Streptomyces*.

### II.3.9. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir de muestras de cultivos de 16, 24, 48 y 72 horas, crecidos en medio sólido GYM con celofán, de la cepa *S. coelicolor M145* (cepa WT). También se realizó la extracción de ARN total muestras de cultivos de 48h de las cepas mutantes  $\Delta$ SCO2102,  $\Delta$ SCO2103 y  $\Delta$ SCO2102 [pNG3- P1-ter-P2-SCO2102].

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 12000x g durante 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 The Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research)

## II. METODOLOGÍA

---

incluyendo un tratamiento con fenol ácido. Para la eliminación del ADN cromosómico se hicieron dos tipos de tratamientos: el primero, con *DNase I (RNase-Free DNase, kit The Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus, Zymo Research)*, realizado en columna durante la extracción del ARN, y el segundo, con *Turbo DNase (TURBO DNA free™-kit, Invitrogen)*, 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).

### **II.3.10. Síntesis de ADN complementario mediante transcripción inversa**

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™)*. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 µL: 2 µL de 10X RT Buffer; 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100mM); 2 µL de 10X RT Random Primers; 1 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 1 µg de ARN molde; y H<sub>2</sub>O para PCR libre de DNasa-RNasa (Sigma) hasta completar 20 µL. 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 se guardó a -20 °C hasta que se utilizó para las PCRs cuantitativas.

### **II.3.11. Análisis de la expresión de los genes mediante PCR cuantitativa**

Debido a la diferencia en las eficiencias de los cebadores, las cuales se midieron utilizando diluciones seriadas de ADN genómico como molde, realizamos una cuantificación absoluta creando curvas de cuantificación estándar para cada pareja de cebadores utilizando el producto de los genes *SCO2102*, *SCO2103* y *SCO4758* amplificado por PCR como molde (*Rutledge and Cote, 2003*). La cuantificación absoluta se basa en la cuantificación del ADN de interés utilizando una curva estándar construida mediante la amplificación de cantidades conocidas del ADN diana (*Rutledge*

## II. METODOLOGÍA

---

and Cote, 2003). El análisis de la expresión de los genes *SCO2102* y *SCO2103* se realizó en las cepas, WT,  $\Delta$ *SCO2102*,  $\Delta$ *SCO2103* y las complementaciones  $\Delta$ *SCO2102* [pNG3-*P1-ter-P2-SCO2102*] y  $\Delta$ *SCO2102* [pNG3-*PP-SCO2102*]. Como control se analizó también la expresión del gen de expresión constitutiva *SCO4758* (Li et al., 2015).

El primer paso fue amplificar el producto de interés con los cebadores *q2102F/q2102R* o *q2103F/q2103R* (Tabla 7). La amplificación se realizó con la polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific) y las reacciones se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la polimerasa. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 10 s, 60°C 30 s, 72 °C 6 s.; extensión final 72 °C 10 min. El producto se aisló en un gel de agarosa (2%), se purificó y se cuantificó en un equipo *Nanodrop ND2000* (Thermo Scientific). Posteriormente, se prepararon las diluciones correspondientes para la curva estándar de cada gen a estudiar.

Las PCR cuantitativas (qPCR) se llevaron a cabo en un termociclador *FQD-96A* (BIOER). La composición de las reacciones fue: 100 ng de ADNc, 10  $\mu$ L de *PowerTrack™ SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher), 300 nM de cebadores y agua para PCR libre de DNasa (*Sigma*) hasta completar 20  $\mu$ L de volumen final. Se analizaron tres réplicas biológicas. Se incluyeron reacciones control con agua, para descartar que los cebadores formasen dímeros, y utilizando ARN como molde, para verificar la ausencia de contaminación con ADN en el ARN de partida. 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 obtención de un único producto.

Todas las curvas estándar utilizadas tuvieron un coeficiente de correlación lineal superior a 0,99. La significación estadística se determinó comparando la abundancia de transcritos utilizando una prueba t de muestras emparejadas estableciendo el umbral de significancia en un p valor a 0,05.

### **II.3.12. Análisis de secuencias de *SCO2102*, *SCO2103* y *dnaA***

## II. METODOLOGÍA

---

Los ortólogos de *SCO2102* y *SCO2103* de las especies de *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. avermitilis*, *S. lividans* y *S. venezuelae* y las secuencias de *dnaA* de *S. coelicolor* (*SCO3879*) se obtuvieron de la página web StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Se compararon las secuencias aminoacídicas de las proteínas correspondientes a estos genes. Las similitudes de aminoácidos estimadas se obtuvieron utilizando el programa Lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)). Las alineaciones de las secuencias fueron realizadas utilizando el software MUSCLE disponible en la plataforma online gratuita Phylemon (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es/>). Las homologías que se muestran en la Figura 17 se crearon con el software Jalview 2.11.0. Las supuestas conformaciones del terminador/ antiterminador condicional de la transcripción se predijeron utilizando el algoritmo en línea desarrollado por Millman et al. 2017 (*Millman et al., 2017*).

### II.4. ESTUDIO DE LOS GENES *SCO1897-SCO1901*

El estudio de la función de los genes que abarca el gen *SCO1897* y sus cuatro genes aguas abajo, hasta el gen *SCO1901* comenzó con el mutante *SCO21897::Tn5*, del cual definimos su fenotipo en el capítulo IV.3 de resultados. Este mutante también pertenece a la librería de mutantes obtenida utilizando el sistema de mutagénesis descrito por *Xu et al., 2017* (*Xu et al., 2017*) y descrito en el apartado II.2.1. de metodología.

La inserción del transposón se encuentra dentro del gen *SCO1897*, pero tiene efectos polares en los genes que se encuentran aguas abajo, por lo que realizamos dos complementaciones, una incluyendo solamente el gen mutado *SCO1897* y otra, incluyendo desde el gen *SCO1897* hasta el *SCO1901* (ambos inclusive), lo que se detalla en el apartado IV.3.2. de resultados. Las construcciones de complementación se introdujeron en el plásmido integrativo pRAS (derivado de pRA) (*Perez-Redondo et al., 2010*) (Tabla 4) sobre el que se realizó una modificación pues se introdujo la resistencia a kanamicina para facilitar la selección de los exconjugantes porque nuestro mutante



## II. METODOLOGÍA

es resistente a apramicina, el antibiótico que contiene el plásmido pRAS. Para ello, se amplificó por PCR el gen de resistencia a kanamicina (970 pb) usando como molde una dilución de una maxiprep que contenía el plásmido pCR™-Blunt II™TOPO, con los cebadores *KanaF/KanaR* (Tabla 11). Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (*Thermo Scientific*). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 68-70 °C 30 s, 72 °C 75s.; extensión final 72 °C 10 min. El producto amplificado se digirió con el enzima de restricción *NheI* y se clonó en el vector pRAS, previamente digerido, entre los sitios de corte de *NheI*. El plásmido pRAS-Kana (pRASK) se comprobó mediante secuenciación de Sanger con los cebadores *PrasNheIF/PrasNheIR*.

**Tabla 11.** Tabla de primers utilizados para el estudio de los genes *SCO1897-SCO1901*.

PRIMERS	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>Kana F</i>	TTTTATGGACAGCAAGC	Esta tesis
<i>Kana R</i>	GTTAATAATTCAGAAGAACTC	Esta tesis
<i>pRASNheIF</i>	GTTTGGCCTCCGACTAACGA	Esta tesis
<i>pRASNheIR</i>	CACTACTCCCGAAAACCGCT	Esta tesis
<i>SCO1897F</i>	GAGAACCACCGAAGAGGCG	Esta tesis
<i>SCO1897R</i>	TCGCTCCTGAACGTATGGGG	Esta tesis
<i>SCO97-01F</i>	GTCACAATTGGGCGACCACGCGAGAAACC	Esta tesis
<i>SCO97-01R</i>	GTCAACATGTACCCCCACGGGCTGTA	Esta tesis
<i>Int-1898F</i>	CCACCCTCTCCAACACTACGAG	(Gonzalez-Quinonez et al., 2016)
<i>Int-1900R</i>	ACGTCCGTCCACTTCTTCAC	Esta tesis
<i>q1897F</i>	GGTGAGCTTCTGCCGGTT	Esta tesis
<i>q1897R</i>	GAGGAGGGAGTAGCGGTGG	Esta tesis

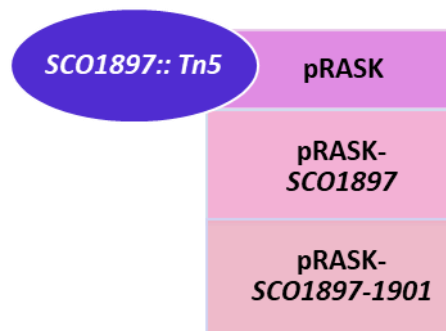
## II. METODOLOGÍA

**Tabla 11.** Continuación.

PRIMERS	SECUENCIA	REFERENCIA
<i>q1898F</i>	AAGGAGACCGGCATCAA	Esta tesis
<i>q1898R</i>	CGTAGATGGGTATCTCGTAGT	Esta tesis
<i>q1899F</i>	TCGATCTACATCGTCCAGAA	Esta tesis
<i>q1899R</i>	TGGTAGAAGCTCTGGTAGAC	Esta tesis
<i>q1900F</i>	GTCCTGTTCTTCTCCTGTC	Esta tesis
<i>q1900R</i>	CAGCATGTCCGGTGTCTT	Esta tesis
<i>q1901F</i>	CCGTACCGCATCTACAAC	Esta tesis
<i>q1901R</i>	CGGTCGCTGATGAAGAC	Esta tesis
<i>qSCO4848F</i>	CCGTCTCCTGGTTCCTGCTC	Esta tesis
<i>qSCO4848R</i>	GCCCGCTGCCGTCTT	Esta tesis
<i>SP44F</i>	TCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC	Esta tesis
<i>SP44R</i>	CATATGCTCGAGCAGCCT	Esta tesis
<i>1897FS</i>	ATGAGCACGCGGACGAGG	Esta tesis
<i>1897RS</i>	TGGTGCTCAGACGCGGAT	Esta tesis
<i>1900FS</i>	ATGAGCGCCACCGCCGTA	Esta tesis
<i>1900RS</i>	ATGAAGGCCGCGTCATCGA	Esta tesis
<i>1901FS</i>	ATGAAGGCCGCGTCATCGA	Esta tesis
<i>1901RS</i>	CTGTACGGTCACGGCACGA	Esta tesis

### II.4.1. Diseño de las construcciones de complementación del mutante *SCO1897::Tn5*

El mutante *SCO1897::Tn5* fue complementado con las siguientes construcciones: *SCO1897::Tn5* [pRASK], *SCO1897::Tn5* [pRASK *SCO1897*] y *SCO1897::Tn5* [pRASK *SCO1897-1901*]. (Figura 14).



**Figura 14.** Construcciones de complementación en el mutante *SCO1897::Tn5*.

Las construcciones de complementación se introdujeron en el mutante *SCO1897::Tn5* mediante conjugación siguiendo el protocolo de *Kiesser et al.*, (*Kieser, 2000*) tal como se describe en el apartado II.3.3.a) de metodología. Las colonias resultantes se seleccionaron con kanamicina. La comprobación del sitio de integración de las construcciones del plásmido pRASK en el mutante *SCO1897::Tn5* se realizó como se detalla en el apartado de II.3.4. d) de metodología.

Además, para asegurarnos del fenotipo que vemos en nuestro mutante *SCO1897::Tn5* corresponde al gen *SCO1897*, realizamos un experimento donde tratamos de revertir el fenotipo del mutante a nivel del salvaje. Para ello, conjugamos las esporas del mutante *SCO1897:: Tn5* con el cósmido st 157 (el cual contiene una copia del gen *SCO1897*), cedido por el profesor Paul Dyson de la Universidad de Swansea. Por sobrecruzamiento, se sustituye el gen mutado *SCO1897* por una copia intacta del mismo. Finalmente, los exconjugantes se comprueban con selección de

## II. METODOLOGÍA

---

antibiótico y por PCR utilizando los primers *SCO1897F/ SCO1897R* (tabla 7) utilizando la polimerasa *BIOTAQ™ DNA Polymerase* (Bioline). El ciclo de PCR empleado fue: desnaturalización a 94°C, 2 min; 30 ciclos de: 94°C 30 s, 63°C 30 s, y 72°C 35 s; y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min.

### **a) Construcción pRASK 1897**

Se amplificó por PCR el gen *SCO1897* (1142 pb en total) dejando margen suficiente aguas arriba del codón de inicio del gen para incluir algún posible promotor, utilizando los cebadores *SCO1897F* (incluye sitio de corte *EcoRV*) y *SCO1897R* (incluye sitio de corte *SpeI*) (Tabla 11), utilizando como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor M145*.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (*Thermo Scientific*). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 63-69 °C 30 s, 72 °C 35 s.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-*SCO1897*, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores *M13F/R*. El fragmento *SpeI-SCO1897-EcoRV* se obtuvo mediante digestión *SpeI/EcoRV* de pTOPO-*SCO1897* y se clonó entre los sitios *SpeI/EcoRV* de pRASK, obteniéndose pRASK-*SCO1897*.

### **b) Construcción pRASK-SCO1897-1901**

Se amplificó por PCR la región desde el gen *SCO1897* hasta el gen *SCO1901* (5300 pb en total), dejando margen suficiente aguas arriba del ATG de inicio para incluir algún posible promotor, y utilizando los -cebadores *SCO1897-01F* (incluye sitio de corte *MfeI*) y *SCO1897-01R* (incluye sitio de corte *PciI*) (Tabla 11), utilizando como ADN molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor M145*.

## II. METODOLOGÍA

---

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo con las especificaciones para la polimerasa Phusion High-Fidelity (*Thermo Scientific*). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 30 s, 67-72 °C 30 s, 72 °C 6 min.; extensión final 72 °C 10 min.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR™-Blunt II™TOPO® obteniéndose el plásmido pTOPO-SCO1897-1901, el cual se comprobó por secuenciación de Sanger con los cebadores M13F/R. El fragmento *MfeI*-SCO1897-*PciI* se obtuvo mediante digestión *MfeI*/*PciI* de pTOPO-SCO1897-1901 y se clonó entre los sitios *MfeI*/*PciI* pRASK, obteniéndose pRASK-SCO1897-1901. Los genes clonados en este plásmido se comprobaron utilizando los cebadores *int-1898F/int-1900F* para la secuenciación Sanger.

### II.4.2. Microscopía láser confocal y de fluorescencia

El ciclo de vida del mutante *SCO1897::Tn5*, así como el de las cepas complementadas se analizaron al microscopio láser confocal tal como se describe en el apartado II.2.2. Para el estudio de la germinación de las esporas en experimentos de *time lapse*, sembramos las esporas frescas en medio GYM, el cual cortamos y colocamos invertido en la placa de cultivo (Ibidi GmbH) y colocamos la tapa sin que cierre herméticamente permitiendo la ventilación. Pre-incubamos la placa dos horas a 30 °C. Las imágenes del *time lapse* se tomaron con el microscopio láser confocal LEICA TCS-SP8 cada 15 minutos durante 16 horas. Se tomaron las imágenes de transmitancia excitando con un láser de 631 nm de longitud de onda y 3% de intensidad. Es importante excitar con la menor intensidad posible para conseguir que las esporas germinen (631 nm). Las imágenes se procesaron con el programa Image J.

### **II.4.3. Análisis del diámetro de las esporas durante la fase de hinchamiento de la germinación**

Para estudiar el hinchamiento de las esporas durante la germinación en las cepas salvaje (WT), WT [pRAS], *SCO1897::Tn5* [pRASK], *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*] y *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897-1901*], partimos de un cultivo de  $3,5 \cdot 10^6$  esporas frescas sembradas en placas Petri de 5 cm de diámetro con 8,6 mL de medio sólido GYM y las incubamos durante 6h 30 min a 30 °C. Las esporas se tiñeron con IP y SYTO-9 (*LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, L-13152*). Estas muestras se observaron en el microscopio láser confocal LEICA TCS-SP8, 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*).

Para medir el diámetro de las esporas, las imágenes se trataron con plugin Stardist2D en el programa Image J (Fiji) (*Schmidt et al., 2018*). Para cada cepa se analizaron 3 réplicas biológicas de las que se contaron al menos 100 esporas por réplica. El análisis estadístico que se realizó fue una prueba t para media de dos muestras emparejadas estableciendo como p valor < 0.05.

### **II.4.4. Cuantificación de esporas germinadas**

La germinación se cuantificó en medios sólidos GYM con discos de celofán a las 6h. Se cortaron pedazos de discos de celofán y se procesaron para microscopía confocal como se describe en el punto II.2.2 de metodología. Se analizaron tres réplicas biológicas de los cultivos. El porcentaje de germinación teniendo en cuenta al menos 100 esporas en cada réplica biológica. Se consideró que las esporas estaban germinadas cuando se pudo observar el tubo germinativo. Para la estadística se realizó una prueba t para medias de dos muestras emparejadas considerando como p valor  $\leq 0.05$

### **II.4.5. Cuantificación de la producción de antibiótico y de proteína**

El estudio de la producción de antibiótico y de proteína del mutante *SCO1897::Tn5* y de las cepas de complementación se realizó tal cual se detalla en el apartado II.3.5. de metodología de esta tesis.

### **II.4.6. Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir de muestras de cultivos de 16, 24, 48 y 65 horas, crecidos en medio sólido GYM con celofán, de la cepa *S. coelicolor M145* (cepa WT). También se realizó la extracción de ARN total muestras de cultivos de 24 y 65h de la cepa mutante *SCO1897::Tn5*, y solo de 65 h de las cepas complementadas *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*] y *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897-1901*].

La extracción de RNA se realizó según se detalla en el apartado II.3.7. de metodología de esta tesis.

### **II.4.7. Síntesis de ADN complementario mediante transcripción inversa**

La síntesis de ADNc mediante transcripción inversa de las cepas *SCO1897::Tn5*, *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897] y *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897-1901] se realizó como se especifica en el apartado II.3.10 de metodología de esta tesis.

### **II.4.8. Análisis de la expresión de los genes *SCO1897-1901* y *SCO4848* mediante PCR cuantitativa**

Para analizar la expresión génica de los genes *SCO1897*, *SCO1898*, *SCO1899*, *SCO1900*, *SCO1901* y *SCO4848* llevamos a cabo una cuantificación absoluta, como se

## II. METODOLOGÍA

---

precisa en el apartado II.3.9. de metodología de esta tesis, debido a la gran variabilidad cebadores. Como gen control se analizó también la expresión del gen constitutivo *SCO4758* (Li et al., 2015) (Tabla 7).

Para cada gen, amplificamos por PCR el producto de interés utilizando los cebadores *q1897F/q1897R*, *q1898F/q1898R*, *q1899F/q1899R*, *q1900F/q1900R*, *q1901F/q1901R* y *qSCO4848F/qSCO4848R* (Tabla 9). La amplificación se realizó con la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific) y las reacciones se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la polimerasa. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 98 °C 30 s; 30 ciclos de 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 4 s; extensión final 72 °C 10 min. El producto se aisló en un gel de agarosa (2%), se purificó y se cuantificó en un equipo Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific). Posteriormente, se prepararon las diluciones de estos fragmentos de ADN para realizar las curvas estándar de cada gen a estudiar. Las qPCRs se realizaron tal como se detalla en el apartado II.3.9. de metodología de esta tesis.

### II.4.9. Cuantificación de fósforo en esporas

Una de nuestras hipótesis se basa en estudiar la relación que tiene nuestro mutante, *SCO1897::Tn5*, con el almacenamiento de fósforo en las esporas, por lo que decidimos comprobar qué cantidad de fósforo tiene las esporas del mutante respecto a las esporas de la cepa salvaje (método *single cell*) y asimismo, analizar el tamaño de las partículas de fósforo (gránulos de volutina) (método *single particle*).

En principio nos centramos en estudiar la cantidad de fósforo (*single cell*) en las cepas salvaje (WT), WT [pRAS], *SCO1897::Tn5* [pRASK], *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*] y *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897-1901] y *single particle*, solamente en la cepa salvaje y en el mutante *SCO1897::Tn5*.

Para la preparación de la muestra se obtuvo una suspensión de 15-20 mL esporas frescas en agua destilada a partir de cultivos sólidos, esporulados en medio SFM. Se filtró la suspensión de esporas utilizando puntas de pipeta p5000 estériles rellenas con algodón hidrófilo, para eliminar cualquier resto de micelio. Después, se



## II. METODOLOGÍA

---

centrifugó la suspensión filtrada a 8500 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados de 10 mL con buffer de lavado (10 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA) y en el último lavado, la muestra se resuspendió en 10 mL de TBS (buffer sin fosfato). En función de uso posterior se separan:

- **Muestras para *single cell*:** del pellet obtenido del lavado se separan 3-5 mL que se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se verificó que la concentración de esporas estuviera entre  $10^7$  y  $10^8$  esporas/mL.
- **Muestras para *single particle*:** las esporas se rompen en fastprep (FastPrep-24, MP™) realizando 4 ciclos de 20 segundos a 6,5 m/s de velocidad, dejando las esporas en hielo durante 1 minuto entre cada ciclo. Para lisar, se utilizan bolas de cristal de  $\leq 106$   $\mu\text{m}$  de diámetro, previamente lavadas con  $\text{HNO}_3$  al 65% para eliminar impurezas. Finalmente, se centrifuga a 2500x g durante 10 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante.

En el caso de la preparación de muestras para *single particle*, para comprobar la eficiencia de ruptura de las esporas, las analizamos mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Utilizamos 500  $\mu\text{l}$  de una dilución a  $1 \times 10^5$  de las esporas, rotas e intactas, y se tiñeron con 6  $\mu\text{l}$  de SYTO9 (Invitrogen) y se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse Ci-L equipado con un CoolLED pE-300white y una cámara Nikon DS-Fi3 con un filtro FITC-A-Basic000 (Semrock) (excitación 450–490 nm y 505–560 nm de emisión). Las esporas se cuantificaron en las muestras teñidas con SYTO9 utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter). Los datos se procesaron utilizando el software CytExpert 2.3. Como control, se utilizaron muestras sin teñir. La eficiencia de ruptura de esporas se estimó como el porcentaje de esporas que se rompieron.

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

## II. METODOLOGÍA

---

Para las medidas de fósforo en esporas individuales (*single cell-ICP-MS*), se utilizó un sistema de introducción de muestras para el análisis de células individuales (*Glass Expansion*), que consiste en un nebulizador concéntrico neumático de microflujos y una cámara de nebulización de consumo total que permite elevadas eficiencias de introducción de células y partículas individuales. Los detalles de esta preparación y las condiciones empleadas pueden consultarse en Corte-Rodríguez et al. (2017). Las suspensiones de esporas a una concentración de 10<sup>5</sup> esporas/mL se bombearon a una velocidad de flujo baja, 10 µL/min, utilizando una bomba de jeringa SP101i ajustada con una jeringa Hamilton de 1 mL. Los datos se registraron en el modo de análisis resuelto en el tiempo, ajustando el tiempo de integración de 5 ms y el tiempo de adquisición de cada muestra fue generalmente de 2 min. Las calibraciones externas se realizaron con patrones de cobre elemental a partir de un estándar con calidad suficiente para su uso en ICP-MS (1000 mg/mL, CertiPur de Merck).

Las muestras para medir fósforo en esporas lisadas por ICP-MS (*single particle-ICP-MS*) se diluyeron en agua ultrapura mili-Q hasta una concentración final de 10<sup>5</sup> esporas/mL, para asegurar el funcionamiento óptimo del nebulizador de acuerdo a las indicaciones del fabricante y a trabajos previos (Corte Rodriguez et al., 2017). Las medidas de ICP-MS de los extractos de esporas, se hicieron en un sistema ICP-MS de triple cuadrupolo iCAP™-TQ (Thermo Fisher Scientific) ajustado en el modo triple cuadrupolo y usando oxígeno como gas de reacción para evitar la interferencia de  $^{14}\text{N}_{16}\text{OH}^+$  sobre el isótopo  $^{31}\text{P}^+$ , generando su óxido ( $^{31}\text{P}_{16}\text{O}^+$ ). El sistema de introducción de muestras consistió en un nebulizador concéntrico neumático de tipo Micro Mist y una cámara de nebulización ciclónica, ambos de ESI Elemental Service & Instruments GmbH (Alemania), y también un muestreador automático ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies).

Se analizaron tres muestras réplicas biológicas de cada cepa tanto para *single cell* como para *single particle*. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante una prueba t para muestras dos muestras suponiendo varianzas desiguales considerado un p valor  $\leq 0,05$ .

### II.4.10. Resistencia de esporas a condiciones fisicoquímicas

Estudiamos la resistencia de las esporas de las cepas salvaje (WT), WT [pRAS], *SCO1897::Tn5* [pRASK], *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*] y *SCO1897::Tn5* [pRASK *SCO1897-1901*] a diversos tratamientos como sonicación, congelación, la adición de lisozima o ácido o la resistencia al calor (*Riostras et al., 2016*).

Para cada tratamiento se prepararon suspensiones de esporas frescas en agua destilada estéril a una concentración de  $10^8$  esporas/mL, obtenidas de placas esporuladas de SFM.

- **Tratamiento de sonicación:** se trataron 2 ml de esporas en un MSE Soniprep (6 ciclos de 15 segundos de sonicación con esperas de 1 minuto en hielo entre cada ciclo).
- **Tratamiento con lisozima:** se trató 1 ml de esporas con una concentración de 50 µg/ml de lisozima recién preparada (Sigma-Aldrich, L6876) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
- **Tratamiento con ácido:** se incubaron 0,2 ml de esporas con 0,125 N de HCl durante 5 minutos a 25 °C; el ácido se neutralizó con un tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,1).
- **Tratamiento con calor:** se calentaron 0,5 mL de esporas a 55 °C durante 90 minutos.
- **Tratamiento de congelación:** 0,5 mL de esporas se congelaron a -20 °C durante 24 horas.

La germinación de las esporas se analizó sembrando en placas antes y después del tratamiento y cuantificando el número de unidades formadoras de colonias. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas biológicas y el análisis estadístico que se realizó fue una prueba t para media de dos muestras emparejadas estableciendo como p valor < 0.05.

### II.4.11. Análisis de secuencias del gen *SCO1897*

Los genes *SCO1897-SCO1901* de las especies de *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. lividans* se obtuvieron de la página web StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Las similitudes de nucleótidos estimadas se obtuvieron utilizando el programa Lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)). Las alineaciones de las secuencias fueron realizadas utilizando el software MUSCLE disponible en la plataforma online gratuita Phylemon (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es/>).

## **III. OBJETIVOS**



### III. OBJETIVOS

---

- **Objetivo 1.** Crear una librería de mutantes aleatorios en *Streptomyces coelicolor* y analizar sus fenotipos.

Esta tesis comenzó con el objetivo general de profundizar en la caracterización de los genes y proteínas controlando la muerte celular programada y la diferenciación (MI/MII) de *Streptomyces* que aún son bastante desconocidos y generar conocimiento en cuanto a la regulación de otras fases del desarrollo como la germinación o la esporulación. Para ello, creamos una librería de mutantes aleatorios utilizando el sistema de mutagénesis de *Xu et al., 2017 (Xu et al., 2017)*.

De los mutantes que se generaron por mutagénesis aleatoria, seleccionamos dos (en los genes *SCO2103::Tn5* y *SCO1897::Tn5*) que mostraban fenotipos muy importantes en esporulación, producción de metabolitos secundarios y germinación. La caracterización de los mutantes en estos dos genes, y el mecanismo molecular por el que regulan la diferenciación y desarrollo de *Streptomyces*, han sido el núcleo central de esta tesis (objetivos 2-7).

- **Objetivo 2.** Caracterizar de forma minuciosa los fenotipos de los mutantes en los genes *SCO2103::Tn5* y *SCO1897::Tn5*. En el caso del mutante *SCO2103::Tn5*, además eliminar la ORF de *SCO2103* y la ORF de su gen adyacente, *SCO2102*, de forma independiente por el método CRISPR-Cas9 (*Tong et al., 2015*).
- **Objetivo 3.** Identificar el gen/es responsables de los fenotipos de los mutantes *SCO2103::Tn5* y *SCO1897::Tn5* mediante el diseño de construcciones de complementación utilizando plásmidos integrativos con diferentes dosis de los genes *SCO2102/2103*, *SCO1897* y sus genes aguas debajo, cuya expresión también podría estar afectada en los mutantes. Se analizará la restauración de los fenotipos de los mutantes y la regulación de la expresión génica de estos genes mediante experimentos de qPCR.

### III. OBJETIVOS

---

- **Objetivo 4.** Caracterizar el posible papel de los genes *SCO2102* y su gen aguas abajo (*SCO2103*) en la replicación del ADN y la división celular durante la esporulación, así como la posible participación de ambas proteínas en el divisoma de esporulación. Se fusionarán *SCO2102* y *SCO2103*, a proteínas fluorescentes para analizar su dinámica durante la esporulación.
- **Objetivo 5.** Estudiar la cantidad de fósforo en las esporas del mutante *SCO1897::Tn5*, valiéndonos de experimentos de *single cell* y *single particle* ICP-MS. Tal como se describirá en los resultados, el efecto de plásmidos integrativos  $\Phi$ C31, que se integran en el gen *SCO4848* y que afectan al gen *SCO4849* (una posible fosfatasa) (Gonzalez-Quinonez et al., 2016), en el fenotipo del mutante *SCO1897::Tn5*, nos hizo sospechar de un posible efecto de *SCO1897* en la acumulación de fósforo durante la esporulación.
- **Objetivo 6.** Plantear un modelo/s que integre/n los resultados obtenidos sobre la función de los genes *SCO2102/2103* y *SCO1897-1901* en la diferenciación fisiológica (activación del metabolismo secundario) y morfológica (esporulación) de *Streptomyces coelicolor*.



## **IV. RESULTADOS**



### IV.1. LIBRERÍA DE MUTANTES ALEATORIOS

Tal como se detalla en métodos, hemos creado una librería de mutantes aleatorios utilizando el sistema de mutagénesis desarrollado por *Xu et al., 2017 (Xu et al., 2017)*. Brevemente, este sistema consiste en usar un transposón tipo *Tn5* codificado en un plásmido que contiene el origen de replicación de *E. coli* en el propio transposón, lo que facilita mucho la identificación del gen mutado (apartado II.2.1. de metodología).

De los mil mutantes que se generaron por mutagénesis aleatoria, analizamos el fenotipo de 127 (Tabla 12). Este primer escrutinio de los mutantes se basó principalmente en observaciones macroscópicas y microscópicas (apartado II.2.2 de metodología). Algunos mutantes mostraron fenotipos en la producción de antibióticos o en alguna fase del desarrollo (MI, MII, micelios sustrato y aéreo, esporulación). Hemos seleccionado dos mutantes, en los genes *SCO2103* y *SCO1897* (mutantes *SCO2103::Tn5* y *SCO1897::Tn5*) que mostraban fenotipos muy importantes en esporulación y producción de metabolitos secundarios (en el caso del mutante en *SCO2103*) y en germinación y producción de antibióticos (en el caso del mutante en *SCO1897*).

#### IV. RESULTADOS

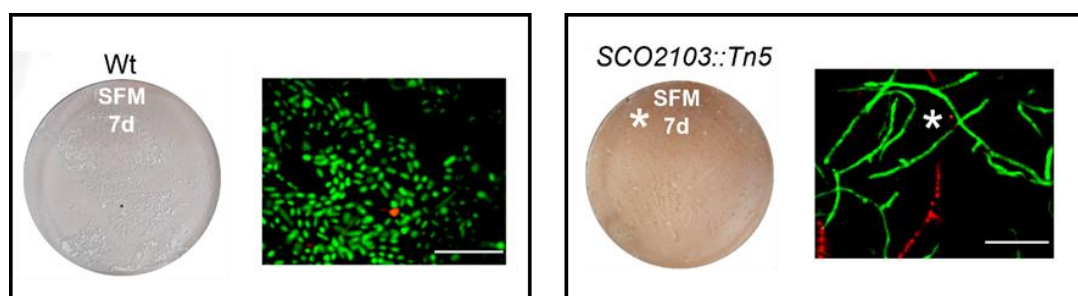
**Tabla 12.** Número de mutantes aleatorios analizados en esta tesis. El fenotipo siempre se ha comparado con la cepa salvaje (Bld indica fenotipo *bald*, carente de formación de micelio aéreo). La inserción exacta del transposón se identificó para alguno de estos mutantes (Tabla suplementaria 1).

Número de mutantes (127 en total)	Fenotipo
9	Germinación
12	Esporulación
4	Bld en GYM
24	Producción de antibiótico
16	Esporulación y producción de antibiótico retrasada
4	Retraso en esporulación y producción de antibiótico adelantada
16	Retraso en germinación y producción de antibiótico
3	Retraso en germinación y producción de antibiótico adelantada
3	Geminación y producción de antibiótica acelerada
36	No muestran fenotipo

## IV.2. MUTANTE *SCO2103::Tn5*

### IV.2.1. Fenotipo del mutante *SCO2103::Tn5*

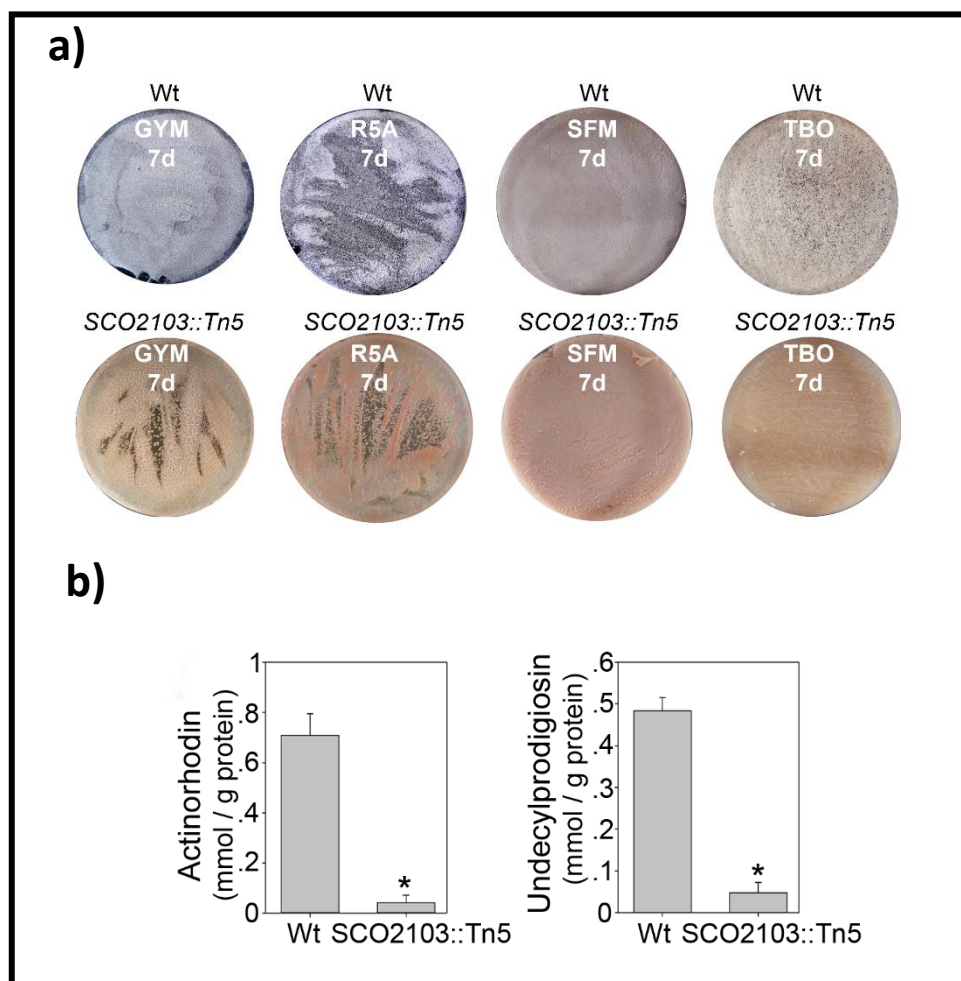
El mutante *SCO2103::Tn5* no forma micelio aéreo ni produce esporas, por lo que se trata de un mutante “*bald*” (*bld*) (Figura 15).



**Figura 15.** Fenotipo del mutante *SCO2103::Tn5* en comparación a la cepa salvaje (WT). Se muestra la apariencia macroscópica de los cultivos en medio de esporulación SFM y las imágenes de microscopía de fluorescencia láser confocal de las hifas teñidas con SYTO9 y PI. El color gris en las placas de cultivo de la cepa salvaje corresponde a las esporas. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas. El asterisco indica la ausencia de esporulación. Las barras de escala muestran 5  $\mu$ m.

Decidimos comprobar si el fenotipo *bld* del mutante *SCO2103::Tn5* dependía del medio de cultivo utilizado. Este mutante no fue capaz de esporular en ningún medio de los probados (GYM, R5A, SFM, TBO) (Figura 16A). Además, en cuanto a la producción de antibióticos, este mutante tiene muy reducida la producción de undecilprodigiosina y actinorrodina (Figura 16B).

## IV. RESULTADOS



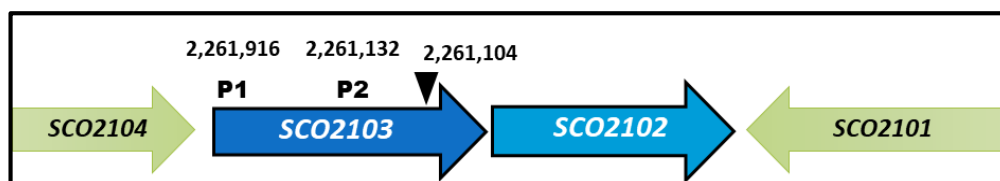
**Figura 16. (a)** Fenotipo del mutante *SCO2103::Tn5* y de la cepa salvaje (WT) en placa macroscópica. La coloración gris en el salvaje indica esporulación. **(b)** Producción de antibiótico del mutante *SCO2103::Tn5* en cultivos líquidos de medio R5A sin sacarosa al tiempo de máxima producción (168 horas).

### IV.2.2. Inserción de *Tn5* en el mutante *SCO2103::Tn5*

La inserción del transposón en el mutante *SCO2103::Tn5* se encuentra en la posición 2,261,104 del cromosoma de *S. coelicolor*, justo al final de la ORF de *SCO2103* (ilustrada con un triángulo en la Figura 17). El gen *SCO2103* tiene dos promotores: P2 en la posición 2,261,32 y P1 justo al principio del gen (posición 2,261,916) (se trata de un promotor *leader-less*) ambos identificados en el trabajo de Jeong et al. (2016)

## IV. RESULTADOS

(Jeong *et al.*, 2016) (Figura 17). La inserción del transposón en *SCO2103* podría afectar por tanto también a la transcripción de *SCO2102* a partir de estos dos promotores.



**Figura 17.** Esquema ilustrando de la inserción del transposón *Tn5* en la ORF de *SCO2103* (indicado con un triángulo) y la posición de los promotores P1 y P2 identificados por Jeong *et al.* (Jeong *et al.*, 2016).

### IV.2.3. Los genes *SCO2102* y *SCO2103* se encuentran altamente conservados en *Streptomyces*

*SCO2102* codifica para una posible proteína transmembrana que tiene un dominio homólogo a uno de los dominios de DnaA (SCO3879), una proteína de iniciación de la replicación cromosómica (Figura 18). Por otro lado, *SCO2103* codifica una metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Figura 18) previamente estudiada en *S. lividans*, involucrada en la biosíntesis de metionina (Blanco *et al.*, 1998).

En las cepas *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans*, *S. clavuligerus* y *S. venezuelae*, las proteínas SCO2102 y SCO2103 muestran una similitud de aminoácidos promedio de 72.5% y 96.14%, respectivamente (Figura 18A). SCO2102 alberga un dominio transmembrana que tiene un promedio del 100% de similitud en su extremo amino, y un dominio DnaA, con un promedio de 70,4% de similitud ubicado en el centro de la proteína. Por otro lado, la proteína SCO2103 alberga un dominio MTHFR que se encuentra conservado con un promedio de 96,5% de similitud en *Streptomyces*.

Como hemos descrito en el apartado I.5a, la proteína iniciadora de la replicación cromosómica DnaA de *S. coelicolor* (SCO3879) alberga 4 dominios (Saxena *et al.*, 2013). El dominio SCO2102 DnaA muestra una similitud del 46,6% con el dominio II, que está implicado en la interacción proteína-proteína. Un punto a resaltar es que el dominio II

#### IV. RESULTADOS

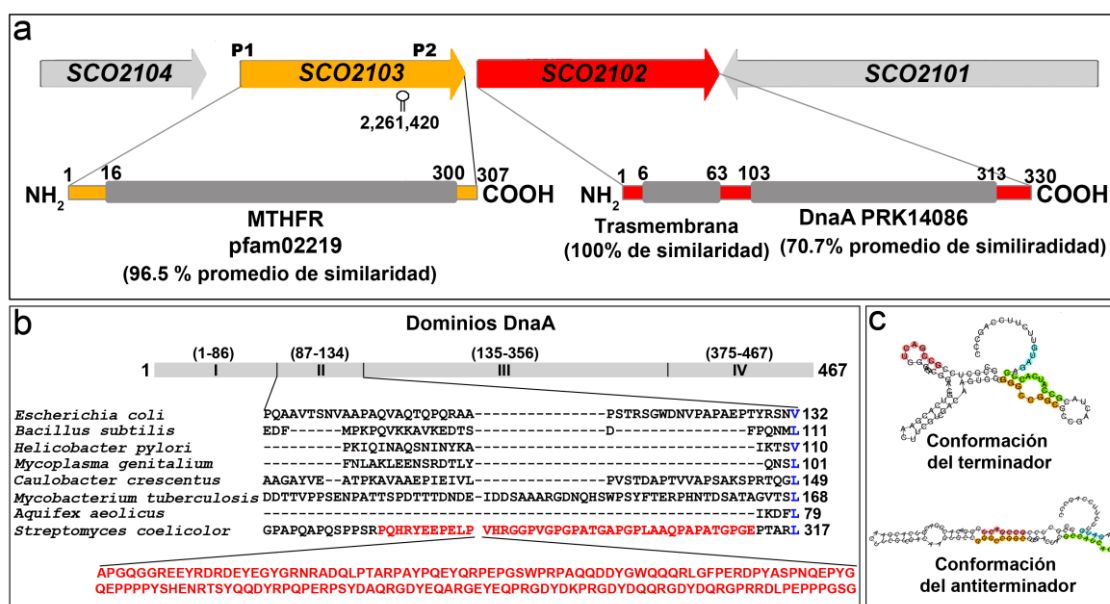
---

de la DnaA de *S. coelicolor* presenta una inserción de 160 aminoácidos que no está presente en otras bacterias (Zawilak-Pawlik *et al.*, 2013). Esta región adicional también está presente en el dominio tipo DnaA presente en la proteína SCO2102 (Figura 18b).

La sintenia de los genes *SCO2102* y *SCO2103* se mantiene en las cepas modelo de *Streptomyces* mencionadas anteriormente, y probablemente en todos los *Streptomyces*. La transcripción de los genes *SCO2102* y *SCO2103* es compleja y está modulada por al menos dos promotores. Se ha visto que el ortólogo de *S. lividans* *SCO2103* se transcribió a partir de un ARNm sin líder (*leader-less*) (etiquetado como P1 en la Figura 18A) (Blanco *et al.*, 1998), y además Jeong *et al.* (2016) (Jeong *et al.*, 2016), describieron la existencia de al menos otro promotor ubicado dentro de la ORF de *SCO2103* en *S. coelicolor* (P2 en la Figura 18A). Además, mediante análisis informáticos basados en algoritmo desarrollado por Millman *et al.* 2017 (Millman *et al.*, 2017), hemos descubierto la existencia de un posible terminador condicional justo antes de P2 (Figura 18C), lo que aumentaría la complejidad de la transcripción de *SCO2102* y *SCO2103*.



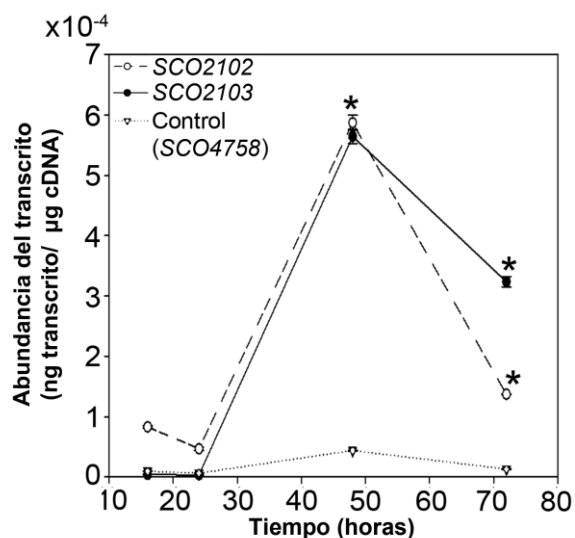
## IV. RESULTADOS



**Figura 18.** Esquema de la región genética *SCO2102* y *SCO2103*, homologías génicas y elementos reguladores. **(a)** Región cromosómica *SCO2102/03* y homologías. **(b)** Alineación de la proteína DnaA de diferentes bacterias (adaptado de Zawilak-Pawlik et al. (Zawilak-Pawlik et al., 2017a)). La numeración de aminoácidos en el esquema de DnaA corresponde a *E. coli* (Saxena et al., 2013b). La región homóloga de DnaA (*SCO3879*) en *S. coelicolor* al dominio DnaA presente en *SCO2102* está resaltado en rojo. **(c)** Conformaciones de terminador/antiterminador del posible terminador condicional identificado en el ORF *SCO2103* (utilizando el algoritmo en línea desarrollado por Millman et al. (Millman et al., 2017)).

### IV.2.4. Los genes *SCO2102* y *SCO2103* se expresan durante la esporulación

A continuación, hicimos un estudio mediante qPCR de la expresión de los genes *SCO2102* y *SCO2103* a lo largo del desarrollo de *Streptomyces* (Figura 19). Ambos genes están más expresados en las hifas esporulantes del micelio aéreo (48 horas en GYM) en comparación con el micelio del sustrato (16 y 24 horas en medio GYM). (Figura 19).



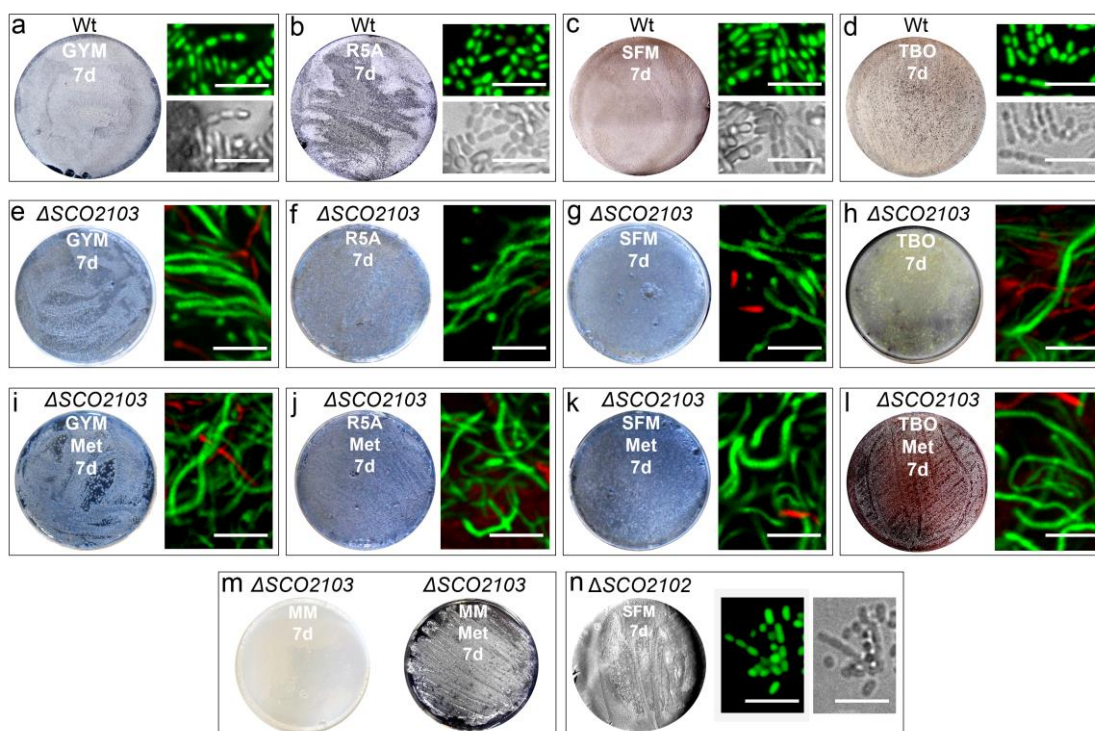
**Figura 19.** Expresión de los genes *SCO2102* y *SCO2103* en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Abundancia de los transcritos de *SCO2102* y *SCO2103* en cultivos sólidos GYM. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la muestra de 16h. El gen *SCO4758*, gen de expresión *housekeeping* (Li et al., 2015)], se utilizó como control. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada tiempo de desarrollo.

#### IV.2.5. Fenotipo de los mutantes $\Delta SCO2102$ y $\Delta SCO2103$

Dado que la inserción del transposón en el mutante *SCO2103::Tn5* puede afectar tanto a la expresión del gen *SCO2103* como a la del *SCO2102* (Figuras 17 y 18 a), con el fin de identificar el efecto de los genes por separado, lo siguiente que hicimos fue hacer los mutantes *knockout* en los genes *SCO2102* y *SCO2103* por separado (mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ ).

#### IV. RESULTADOS

El mutante  $\Delta SCO2103$  se caracteriza por la ausencia de micelio aéreo (color blanco) y de esporulación (color gris), es decir, tiene un fenotipo *bld*, en todos los medios de cultivo analizados (GYM, R5A, SFM, TBO) (Figura 20 e-h). En cambio, el mutante  $\Delta SCO2102$  sí es capaz de esporular (Figura 20n, se muestra la esporulación en el medio de esporulación, SFM).



**Figura 20.** Esporulación y ausencia de la misma en cultivos sólidos de los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ . **(a-d)** Imágenes de la cepa salvaje en diferentes medios de cultivo. **(e-h)** Fenotipo *bld* de  $\Delta SCO2103$  en diferentes medios de cultivo. **(i-l)** Fenotipo *bld* de  $\Delta SCO2103$  en medios modificados con metionina. **(m)** Ausencia de crecimiento de  $\Delta SCO2103$  en medio mínimo sin metionina. **(n)** Esporulación de  $\Delta SCO2102$  en cultivos sólidos SFM. Imágenes macroscópicas de las placas de Petri (el color gris indica esporulación), imágenes de fluorescencia láser confocal de hifas teñidas con SYTO9 y PI e imágenes en contraste de la fase correspondiente. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas. Las barras de escala indican 5  $\mu\text{m}$ .

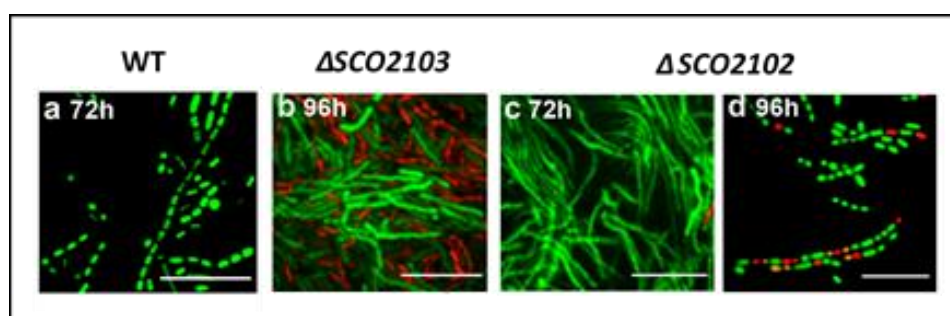
La producción de actinorrodina (color azul en las placas de Petri de la Figura 19) es mayor en cultivos sólidos GYM, R5A y SFM del mutante  $\Delta SCO2103$  que, en la cepa

#### IV. RESULTADOS

salvaje, lo que podría ser consecuencia del fenotipo *bld* de este mutante. En la cepa salvaje, las hifas esporulantes detendrían el metabolismo y la producción de antibióticos, pero en la cepa  $\Delta SCO2103$ , las hifas que no esporulan producirían antibióticos durante más tiempo.

Teniendo en cuenta el estudio del ortólogo de *SCO2103* en *S. lividans* donde se muestra que el gen *SCO2103* codifica una metiltetrahidrofolato reductasa involucrada en la síntesis de metionina (Blanco *et al.*, 1998), investigamos si la metionina pudiera restaurar el fenotipo de nuestro *knockout*  $\Delta SCO2103$  en *S. coelicolor*. Sin embargo, la esporulación no se restauró añadiendo metionina al medio de cultivo (Figura 19 i-l). Como era de esperar, el *knockout*  $\Delta SCO2103$  no pudo crecer en medio mínimo sin metionina (Figura 20 m), corroborando el hallazgo que la actividad de la metiltetrahidrofolato reductasa *SCO2103* participa en la biosíntesis de la metionina biosíntesis (Blanco *et al.*, 1998).

En contraste con  $\Delta SCO2103$ , el mutante *knockout*  $\Delta SCO2102$  puede esporular, pero en comparación con la cepa salvaje, muestra un retraso en la esporulación, ya que el mutante no esporula hasta las 96 horas en medio GYM (Figura 21 c-d), mientras que la cepa salvaje lo hace a las 72h (Figura 21 a).



**Figura 21.** Esporulaci3n de la cepa salvaje,  $\Delta SCO2103$  y  $\Delta SCO2102$  en cultivos s3lidos. **(a)** Esporulaci3n de la cepa salvaje a las 72h. **(b)** Mutante *bld*  $\Delta SCO2103$ . **(c-d)** Esporulaci3n retrasada a las 72 y 96 h del mutante  $\Delta SCO2102$ . Im3genes de fluorescencia l3ser confocal de hifas teñidas con SYTO9 e IP. Se muestran im3genes representativas de al menos tres r3plicas biol3gicas. Las barras de escala indican 8  $\mu$ m.

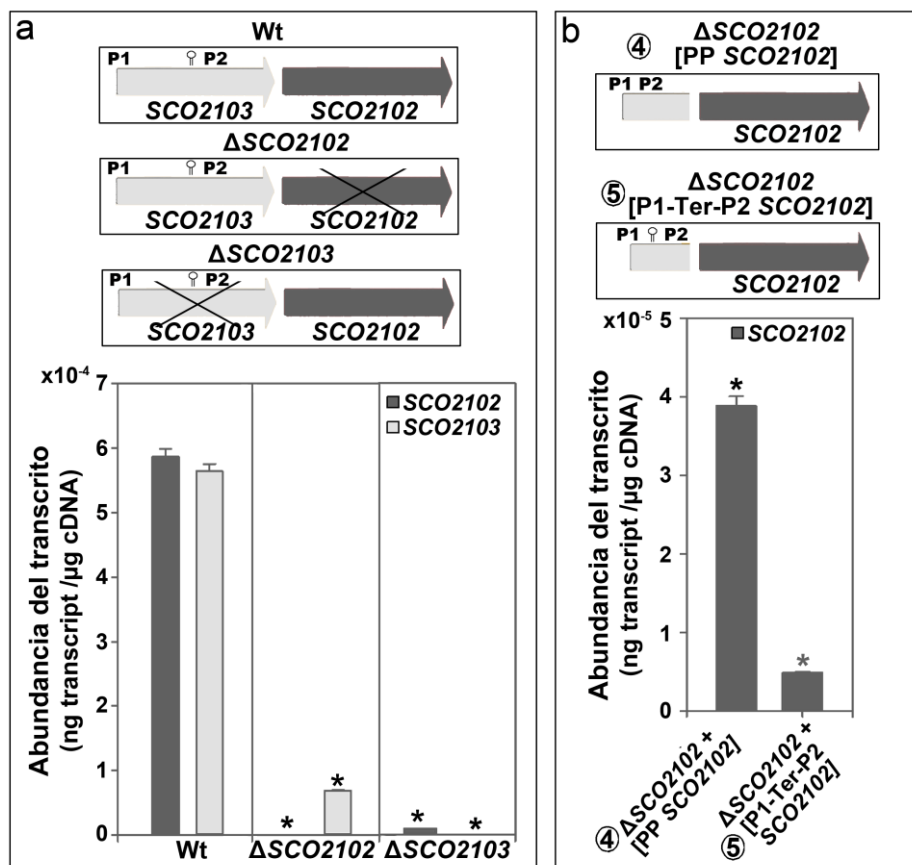
### IV.2.6. Expresión y regulación génica de los genes *SCO2102* y *SCO2103*

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes *SCO2102* y *SCO2103* está altamente regulada e involucra al menos dos promotores (P1 y P2) (Blanco *et al.*, 1998, Jeong *et al.*, 2016) y quizá un terminador transcripcional condicional que hemos identificado mediante bioinformática situado entre ambos promotores (Figura 18 a). Para comprender mejor la transcripción de los genes *SCO2102* y *SCO2103*, cuantificamos las abundancias de sus transcritos en la cepa salvaje y los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$  (Figura 22 a). Se analizó el tiempo de máxima expresión (48 h en medio GYM, Figura 19). Como era de esperar, el mutante  $\Delta SCO2102$  y carecía del transcrito *SCO2102* y  $\Delta SCO2103$  carecía del transcrito *SCO2103* (Figura 22 a). La expresión del gen *SCO2102* estaba muy reducida en el mutante  $\Delta SCO2103$  (98% menos que la cepa salvaje), lo que no es raro, ya que hay al menos un promotor (P2, Figura 18 a) que falta en este mutante (Figura 22 a). La expresión del gen *SCO2103* estaba muy reducida en el mutante  $\Delta SCO2102$  (87% menos que la cepa salvaje), lo que indica que hay alguna regulación extra además de los promotores P1 y P2, quizás el terminador transcripcional condicional que hemos identificado por bioinformática justo antes de P2.

Con el fin de comprobar si el terminador condicional era funcional o no, cuantificamos la abundancia de ARNm de *SCO2102* en el mutante  $\Delta SCO2102$  complementado con *SCO2102* y controlado por los promotores P1 y P2 (cepa  $\Delta SCO2102$  [pNG3-PP-*SCO2102*]), y por otro, el mutante  $\Delta SCO2102$  complementado con *SCO2102*, P1, P2 y el posible terminador condicional (cepa  $\Delta SCO2102$  [pNG3 P1-Ter-P2-*SCO2102*]) (Figura 22 b). La expresión del gen *SCO2102* en el mutante  $\Delta SCO2102$  complementado con *SCO2102* con los dos promotores y el terminador condicional (cepa  $\Delta SCO2102$  [pNG3 P1-Ter-P2-*SCO2102*]) es 33% menor que en la construcción sin el terminador (cepa  $\Delta SCO2102$  [pNG3 PP-*SCO2102*]), demostrando que el terminador condicional es funcional. Curiosamente, la expresión de *SCO2102* en el mutante  $\Delta SCO2102$  complementado con P1 y P2-*SCO2102* fue unas diez veces menor que en la cepa salvaje ( $3,8 \times 10^{-5}$  frente a  $5,9 \times 10^{-4}$ , respectivamente). Este

#### IV. RESULTADOS

resultado indica la existencia de una posible regulación desconocida adicional que no pudo reproducirse en el mutante  $\Delta SCO2102$  complementado con P1 y P2- $SCO2102$  (Figura 22 b).



**Figura 22.** Abundancia de los transcritos de *SCO2102* y *SCO2103* en cultivos sólidos GYM de 48h. **(a)** Abundancia de transcritos de *SCO2102* y *SCO2103* en los mutantes *knockout* de cada gen y en la cepa salvaje. **(b)** Abundancia de los transcritos de *SCO2102* en el *knockout*  $\Delta SCO2102$  complementado con el gen *SCO2102* controlado por P1 y P2 con y sin el terminador transcripcional condicional. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se procesaron tres réplicas biológicas.

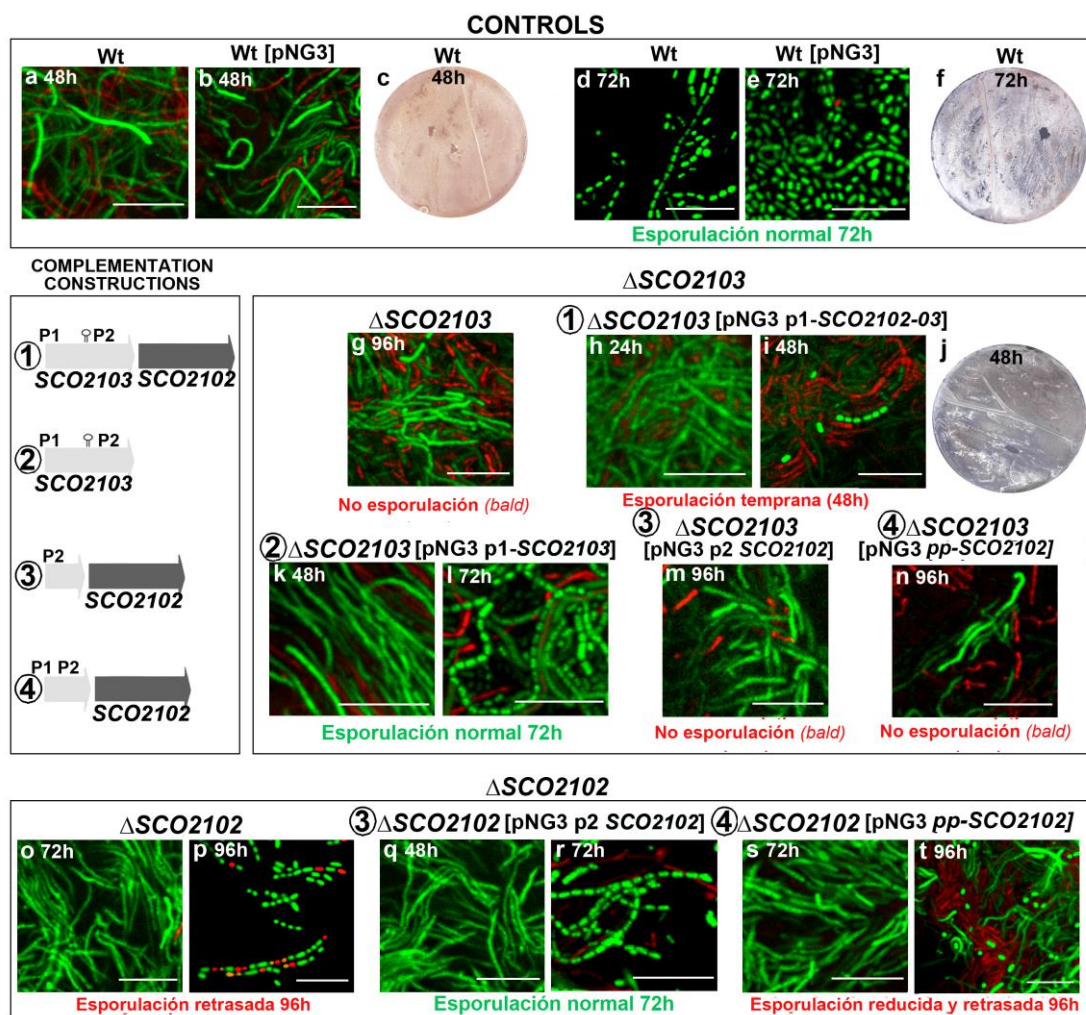
### IV.2.7. Complementación de los mutantes $\Delta SCO2102$ y $\Delta SCO2103$

Como se indicó en el apartado anterior, la eliminación de las ORFs de  $SCO2102$  o  $SCO2103$  afecta a la expresión de ambos genes, ya que su transcripción está controlada por elementos reguladores comunes. Por ello, para complementar los fenotipos de los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$  se utilizaron cuatro combinaciones de los genes  $SCO2102$  y  $SCO2103$  con los promotores P1 y P2 y el terminador transcripcional condicional (construcciones de complementación 1-4 en la Figura 23).

El fenotipo *bld* (ausencia de esporulación) del mutante  $\Delta SCO2103$  se restauró al fenotipo de la cepa salvaje (esporulación a las 72 horas en medio GYM) con el gen  $SCO2103$  (cepa  $\Delta SCO2103+$  pNG3-P1- $SCO2103$ ) (construcción 2 en la Figura 23) (comparar la Figura 23 d, e con la Figura 23 l). Sin embargo, en el mutante  $\Delta SCO2103$  que se complementó con los genes  $SCO2102$  y  $SCO2103$  juntos (construcción 1 en la Figura 23), la esporulación se aceleró a 48 horas (Figura 23 i, j). El gen  $SCO2102$  por sí solo no pudo restaurar la esporulación de  $\Delta SCO2103$  (Figura 23 m, n). Estos resultados indican que  $SCO2103$  es el gen responsable del fenotipo *bld* y que, un aumento en la dosis del gen  $SCO2102$  en el mutante  $\Delta SCO2103$  complementado con  $SCO2102$  y  $SCO2103$  de algún modo acelera el tiempo de esporulación.

El retraso en la esporulación del mutante *knockout*  $\Delta SCO2102$  se intentó complementar con dos construcciones, una que contaba con el promotor P2 y otra, con los dos promotores (construcciones 3 y 4 en la Figura 23). La esporulación de  $\Delta SCO2102$  ocurre a las 96 h en GYM (Figura 23 p) en comparación con las 72 h en la cepa salvaje (Figura 23 d, e). Este retraso en la esporulación se restauró cuando el *knockout*  $\Delta SCO2102$  se complementó con la construcción que contiene P2 (Figura 23 r). Curiosamente, cuando se utilizaron los dos promotores en la complementación, el retraso en la esporulación no se complementó e incluso se retrasó aún más que en el mutante  $\Delta SCO2102$ , ya que a las 96 h apenas se observaban esporas (Figura 23 t). Estos resultados indican de nuevo un efecto dependiente de la dosis de  $SCO2102$  sobre la esporulación.

## IV. RESULTADOS



**Figura 23.** Tiempo de esporulación en cultivos sólidos GYM de los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 y sus cepas complementadas. **(a-f)** Imágenes de la cepa salvaje con y sin pNG3 (cepa control). **(g-n)** Imágenes de esporulación de  $\Delta$ SCO2103 con y sin diferentes combinaciones de P1, P2 y los genes SCO2102 y SCO2103 clonados en pNG3. **(o - t)** Imágenes de esporulación de  $\Delta$ SCO2102 con y sin diferentes combinaciones de P1, P2 y SCO2102 clonadas en pNG3. La esporulación normal (cultivo de 72 h) está marcada en verde. La esporulación retrasada está marcada en rojo. Las construcciones utilizadas para complementar los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 se muestran y numeran del 1 al 4. Imágenes macroscópicas de las placas de Petri (el color gris indica esporulación) e imágenes de fluorescencia láser confocal de hifas teñidas con SYTO9 e IP. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas. Las barras de escala indican 8  $\mu$ m.



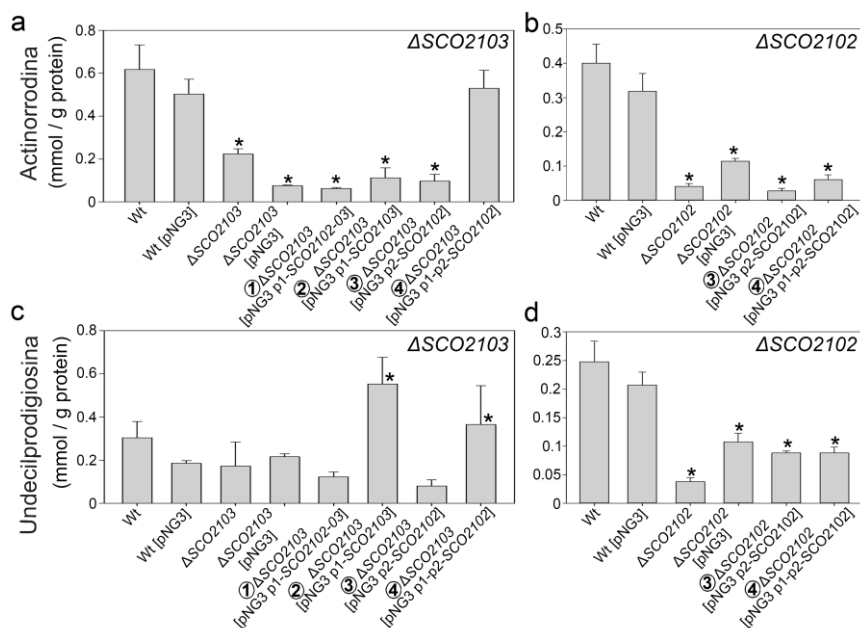
### **IV.2.8. Producción de antibiótico en los mutantes $\Delta SCO2102$ y $\Delta SCO2103$**

En cuanto a la producción de antibiótico, tanto los niveles de actinorrodina como los de undecilprodigiosina se vieron alterados en los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$  en comparación con la cepa salvaje (Figura 24).

La producción de actinorrodina se reduce ligeramente en el mutante  $\Delta SCO2103$ . Este fenotipo sólo se complementa con el gen  $SCO2102$  con los promotores  $P1$  y  $P2$  (cepa 4 en Figura 24 a). La producción de undecilprodigiosina no se altera significativamente en el mutante  $\Delta SCO2103$  en comparación con la cepa salvaje. Sin embargo, algunas de las cepas complementadas del mutante  $\Delta SCO2103$  mostraron un aumento en la producción de undecilprodigiosina (Figura 24 c).

La producción de actinorrodina y de undecilprodigiosina se redujeron considerablemente en el mutante  $\Delta SCO2102$  (Figura 24 b, d). La producción de antibióticos no pudo restaurarse a los niveles del salvaje en ninguna de las dos cepas de complementación (con uno y con dos promotores) en el mutante  $\Delta SCO2102$ .

## IV. RESULTADOS

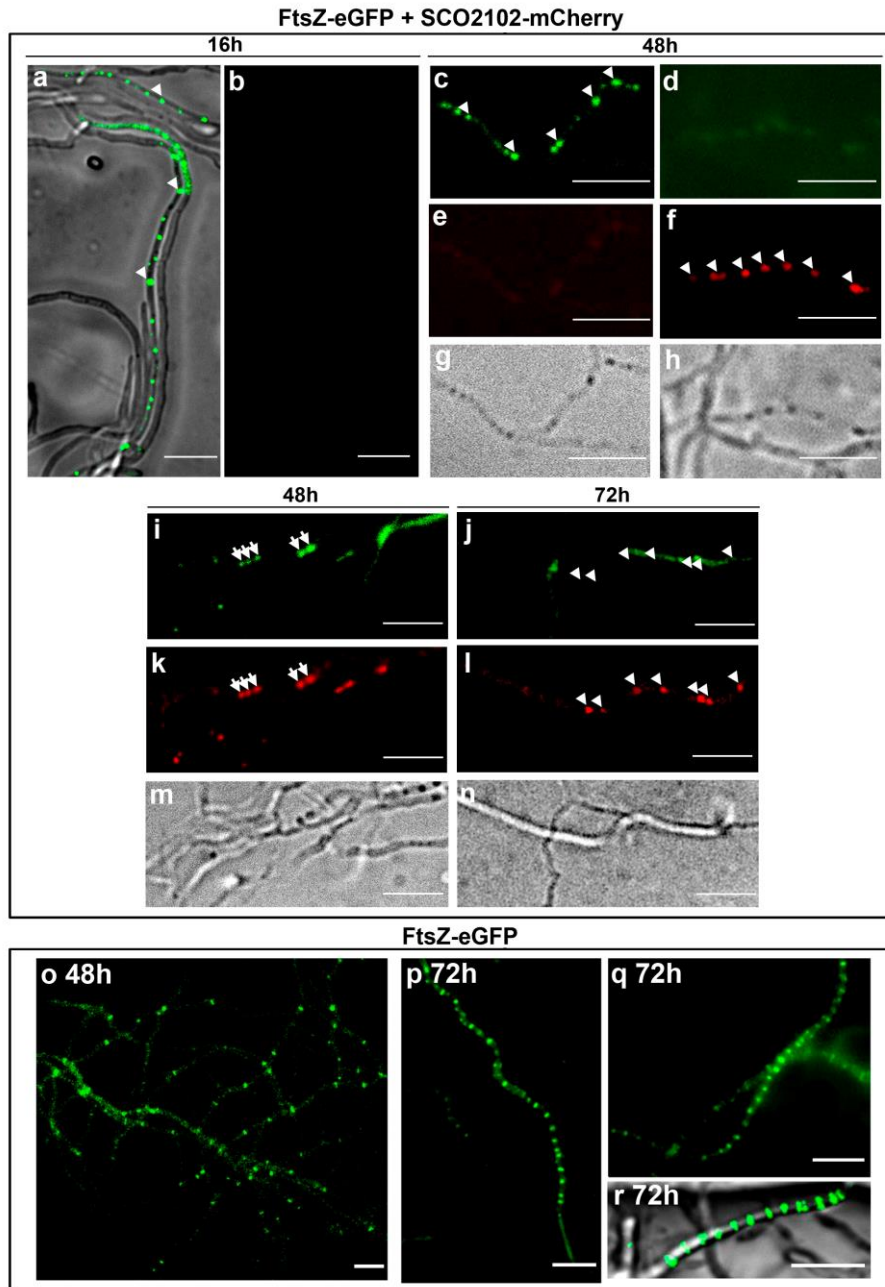


**Figura 24.** Producción de antibióticos en los mutantes  $\Delta$ SCO2102,  $\Delta$ SCO2103 y sus cepas complementadas. La producción de antibióticos se midió en tres réplicas biológicas en medio líquido R5A sin sacarosa a las 168 h una vez alcanzada la producción máxima. **(a-b)** Actinorrodina. **(c- d)** Undecilprodigiosina. Las construcciones utilizadas para complementar los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 están numeradas como en la Figura 23. Las diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje están marcadas con asteriscos.

### IV.2.9. SCO2102 colocaliza con FtsZ durante la esporulación

DnaA es una proteína compleja, compuesta por 4 dominios, que es esencial para la replicación cromosómica de las bacterias. Se encarga de ubicar la posición en la que FtsZ iniciará la formación del divisoma, el complejo proteico que dirige la división celular (apartado 1.5 de introducción). El dominio II de la proteína DnaA está involucrado en la interacción proteína-proteína. Este es el dominio presente en SCO2102. Nos planteamos la posibilidad de que SCO2102 podría interactuar con FtsZ durante la esporulación. Para analizar esta posibilidad, utilizamos *S. coelicolor* FM145, una cepa de baja autofluorescencia (Willemse and van Wezel, 2009), para expresar SCO2102-mCherry (color rojo) y FtsZ- eGFP (color verde). Esta cepa fue creada como se detalla en apartado II.3.3 de la metodología, y observamos su desarrollo en un microscopio de fluorescencia (Figura 25).

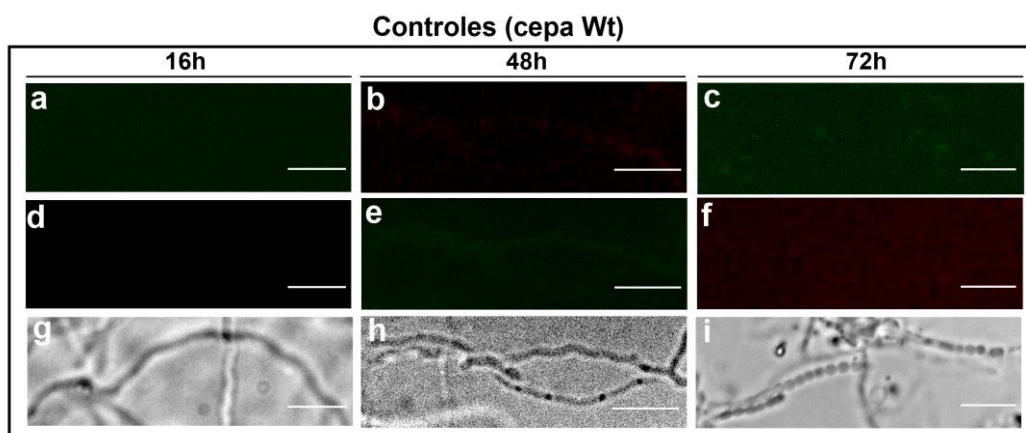
#### IV. RESULTADOS



**Figura 25.** Imágenes de FtsZ-eGFP y SCO2102-mCherry en fase de esporulación visto en cultivos sólidos en medio SFM. **(a-n)** Expresión conjunta y localización celular de FtsZ-eGFP (verde) y SCO2102-mCherry (rojo). Las flechas indican puntos de colocalización de FtsZ-eGFP y SCO2102-mCherry. Las puntas de flecha indican puntos FtsZ-eGFP o SCO2102-mCherry que no colocalizan. **(o-r)** Expresión de FtsZ-eGFP (verde) en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Se observaron “Z-ladders” (anillos Z con una separación de 1  $\mu$ m) durante la esporulación (cultivo de 72 h). Se muestran imágenes de microscopio de contraste de fases y de fluorescencia. Las barras de escala indican 5  $\mu$ m.

#### IV. RESULTADOS

En tiempos tempranos (16 h), se observaron puntos de FtsZ-eGFP dentro de algunas hifas (puntas de flecha en la Figura 25a), pero no hubo rastro de fluorescencia de la proteína roja mCherry. A las 48 h, cuando comienza la replicación del ADN asociada con la esporulación en cultivos confluentes de *S. coelicolor* (Yague et al., 2016), algunas hifas mostraron puntos fluorescentes de eGFP-FtsZ- o SCO2102-mCherry (puntas de flecha en la Figura 25 c, f). También hubo hifas en las que se colocaron *spots* verdes y rojas (flechas en la Figura 25 i, k), lo que indica que FtsZ y SCO2102 pueden colocalizar formando parte de la compleja sucesión de proteínas que modulan la esporulación. Cabe mencionar que, dentro de estas condiciones de cultivo, en tiempos de desarrollo analizados y con los parámetros del microscopio de fluorescencia detallados en métodos, no se detectó autofluorescencia en los cultivos de control de la cepa salvaje de *S. coelicolor* FM145 (Figura 26). A pesar de que la fluorescencia de SCO2102-mCherry y FtsZ-eGFP no fue muy intensa, esta fue sin lugar a duda superior a la fluorescencia de los controles sin las proteínas fluorescentes observados en las mismas condiciones (Figura 26).



**Figura 26.** Imágenes de la cepa salvaje de *S. coelicolor* FM145 sin las proteínas fluorescentes. Las imágenes fueron obtenidas simultáneamente y bajo las mismas condiciones del microscopio láser-confocal que aquellas mostradas en la Figura 25 para la cepa expresando FtsZ-eGFP y SCO2102-mCherry.

## IV. RESULTADOS

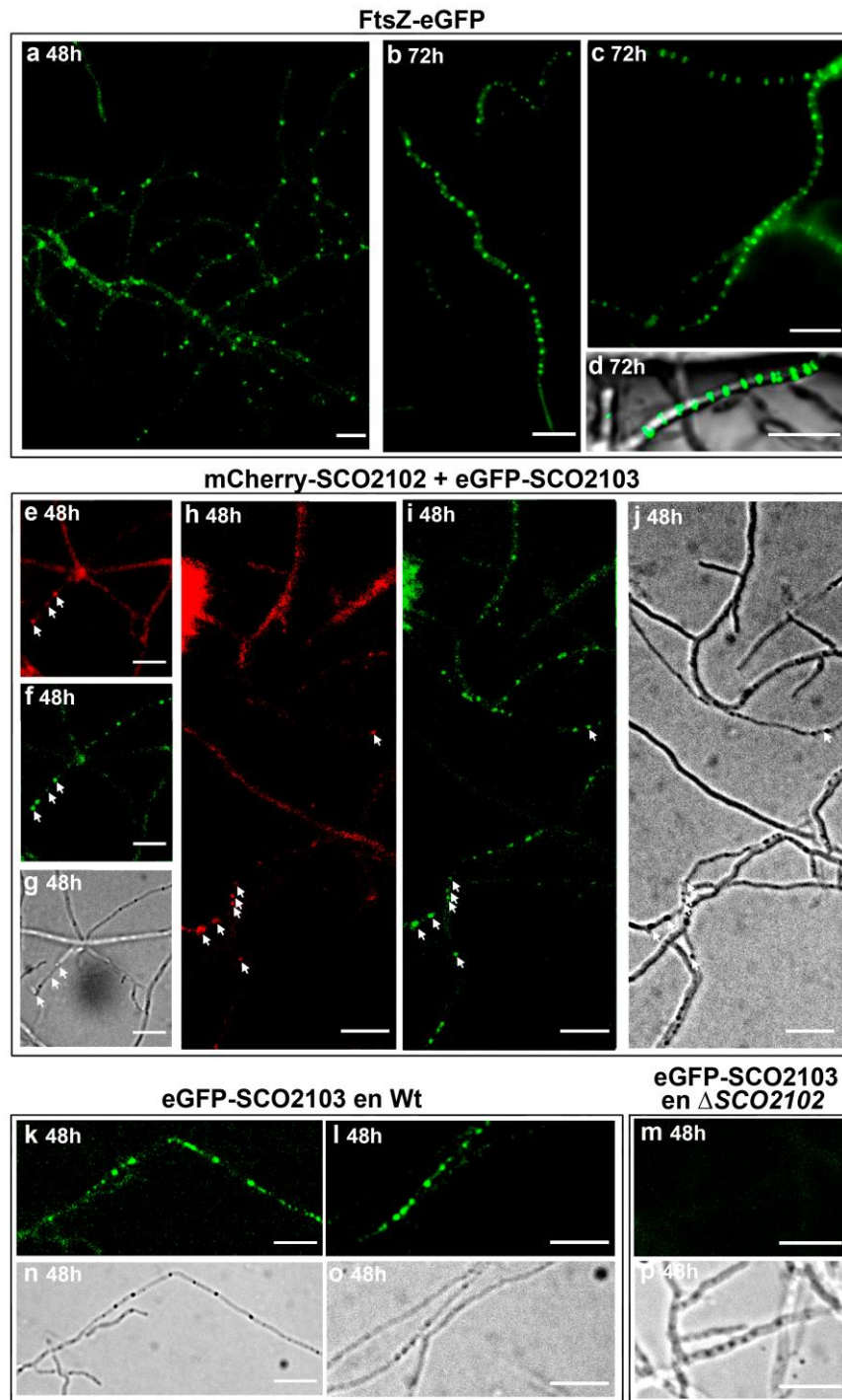
---

Es posible que exista algún tipo de interferencia entre SCO2102-mCherry y FtsZ-eGFP que impide, o al menos disminuye, la polimerización de FtsZ-eGFP ya que la escalera de FtsZ (la sucesión de anillos Z separados por 1  $\mu\text{m}$ ) se observaron fácilmente en la cepa *S. coelicolor* FM145 que expresaba FtsZ-Egfp (Figura 25 p-r), pero no estaban presentes en las hifas en esporulación de la cepa *S. coelicolor* que expresaba FtsZ-eGFP y SCO2102-mCherry (Figura 25 j).

### **IV.2.10. SCO2102 y SCO2103 colocalizan durante la esporulación**

Para analizar la posible interacción entre las proteínas SCO2102 y SCO2103, analizamos la dinámica de SCO2102-mCherry y SCO2103-eGFP durante la esporulación mediante microscopía de fluorescencia.

#### IV. RESULTADOS



**Figura 27.** Imágenes de SCO2102-mCherry y SCO2103-eGFP expresados en la cepa salvaje de *S. coelicolor* durante la fase de esporulación en cultivos sólidos en medio SFM. **(a-f)** Localización celular de SCO2103-eGFP (verde) y SCO2102-mCherry (rojo) en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Todos los puntos de SCO2102-mCherry se ubican junto con los puntos SCO2103-eGFP (flechas), pero hay “spots” de SCO2103-eGFP que no se ubican junto con los de SCO2102-mCherry. **(g-l)** SCO2103-eGFP expresada en la cepa salvaje y en el mutante  $\Delta$ SCO2102. En el mutante  $\Delta$ SCO2102 SCO2103-eGFP no puede formar spots visibles. Las imágenes mostradas son de microscopía de fluorescencia y contraste de fase. Barras de escala 5  $\mu$ m.

## IV. RESULTADOS

---

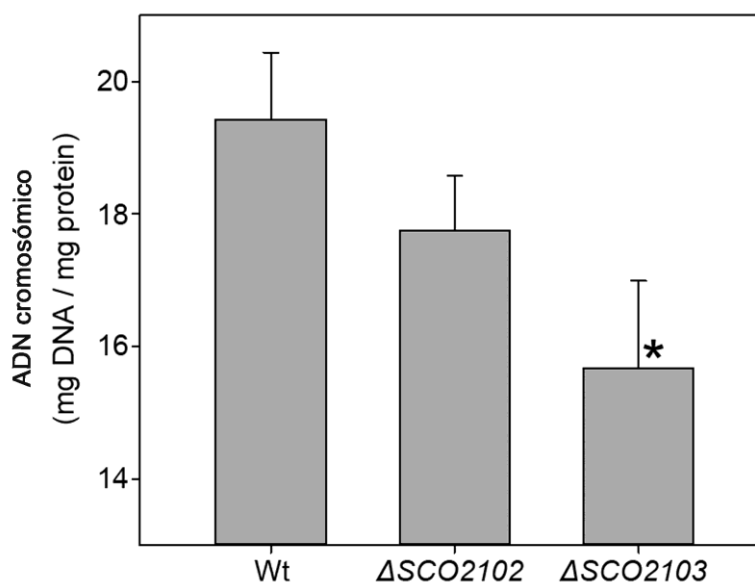
Como resultado, vimos que todos los *spots* de SCO2102-mCherry en las hifas de esporulación (48 horas) colocalizaban con SCO2103-eGFP (Figura 27 a- b, d- e) cuando ambos genes se expresaban en la cepa salvaje. Sin embargo, hay *spots* de SCO2103-eGFP que no colocalizan con SCO2102-mCherry. Interesantemente, cuando expresamos SCO2103-eGFP en el mutante  $\Delta$ SCO2102 no se formaban los *spots* (Figura 27 i), que si aparecen en la cepa salvaje (Figura 27 g, h). Estos resultados revelan que SCO2102 es esencial para la formación de *spots* de SCO2103 y que ambas proteínas, SCO2103 y SCO2102, interactúan durante la esporulación. La cepa control observada bajo la misma configuración de microscopio de fluorescencia, pero sin las proteínas SCO2102-mCherry y SCO2103-eGFP, no mostró fluorescencia observable (Figura 26).

### **IV.2.11. Cuantificación de ADN cromosómico en los mutantes $\Delta$ SCO2102 y $\Delta$ SCO2103**

La metiltetrahidrofolato reductasa SCO2103 participa en la biosíntesis de metionina (Blanco *et al.*, 1998), lo cual se corroboró en este estudio, ya que el mutante  $\Delta$ SCO2103 no puede crecer en un medio sin metionina (Figura 20 m). Las metiltetrahidrofolato reductasas también participan en más rutas biosintéticas como la biosíntesis de dTTP, que es necesaria para la biosíntesis de ADN (Shetty & Varshney., 2021).

Con el fin de comprobar si SCO2103 tiene algún papel en la biosíntesis de ADN durante la esporulación, comparamos la cantidad de ADN cromosómico en los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 y la cepa salvaje durante la esporulación. Como resultado, vimos que la cantidad de ADN cromosómico se redujo mucho (un 19,4 %) en las hifas esporulantes del mutante  $\Delta$ SCO2103 en comparación con la cepa salvaje lo que indica un papel de SCO2103 en la síntesis de ADN necesaria para la esporulación (Figura 28). El ADN cromosómico también se redujo en el mutante  $\Delta$ SCO2102, sin embargo, la diferencia con la cepa de tipo salvaje no fue significativa (Figura 28). La reducción del ADN cromosómico en el mutante  $\Delta$ SCO2102 se correlacionaría con la reducción observada en la expresión de SCO2103 en este mutante (Figura 22 a).

## IV. RESULTADOS



**Figura 28.** Cantidad de ADN cromosómico en las hifas esporulantes de la cepa salvaje y los mutantes  $\Delta$ SCO2102 y  $\Delta$ SCO2103 en cultivos en medio GYM (48 horas). Las diferencias significativas respecto a la cepa de tipo salvaje están marcadas con un asterisco.

### IV.3 MUTANTE *SCO1897::Tn5*

#### IV.3.1 Inserción del transposón en el mutante *SCO1897::Tn5*

La inserción del transposón en el mutante *SCO1897::Tn5* se encuentra en la posición 2.032.120 del cromosoma de *S. coelicolor*, dentro de la ORF de *SCO1897* (Figura 29) y podría afectar a varios, o todos, los genes aguas abajo (Figura 29 a). En nuestro conocimiento, no hay ningún trabajo que describa los promotores que controlan la expresión de esta región génica. Hemos realizado análisis bioinformáticos para intentar encontrar posibles promotores en esta región utilizando la herramienta bioinformática BDGP ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) y sólo hemos sido capaces de encontrar un posible promotor entre los genes *SCO1902* y *SCO1903* (marcado como P en la Figura 29 a). Trabajos como el de Jeong et al. (Jeong et al., 2016) que secuenciaron los inicios de transcripción del transcriptoma de *S. coelicolor* no consiguieron identificar ningún promotor en esta región génica. Las ORFs



## IV. RESULTADOS

---

de *SCO1898* a *SCO1901* están seguidas, sin ningún nucleótido separando el codón de STOP de un gen del inicio del gen siguiente. Incluso estas ORFs se solapan en sus tripletes, lo que hace difícil pensar que haya terminadores de la transcripción entre estos ORFs, ya que harían inviable la transcripción completa de la ORF y por tanto la traducción de la proteína correspondiente. Por ello, es de esperar que las ORFs de *SCO1898* a *SCO1901* se transcriban juntas como un operón, solas, o con sus ORFs colindantes.

Tal como se describe en el apartado IV.2.3 en el caso de los genes *SCO2102/2103* nos encontramos con la existencia de un terminador condicional de la transcripción que identificamos por bioinformática y luego, demostramos que era funcional mediante experimentos de qPCR (apartado IV.2.6. de resultados). Por ello, planteamos la hipótesis de que también podrían existir terminadores condicionales dentro de la región *SCO1898-SCO1901* e hicimos los análisis bioinformáticos correspondientes. Interesantemente, encontramos cuatro posibles terminadores de transcripción condicionales localizados en las ORFs de los genes *SCO1899* y *SCO1900*, que de ser funcionales añadirían un factor de complejidad muy importante a la regulación de la transcripción de estos genes (Figura 29).

Con el fin de entender mejor la expresión de estos genes cuantificamos la expresión de 5 fragmentos de esta región génica en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Estos fragmentos génicos están localizados antes y después de los hipotéticos terminadores de la transcripción, durante distintas fases del desarrollo (16, 24, 48 y 65 horas de cultivo en medio sólido GYM). Los transcritos de 4 de estos fragmentos muestran diferencias significativas (indicadas con asteriscos en la Figura 29 c) con respecto al transcrito del primer gen del operón (*SCO1897*) al menos en alguno de los tiempos analizados. En el caso de los fragmentos 3 y 4, también hay diferencias de expresión significativas entre ellos a las 48 horas. Esto indica la existencia de una regulación compleja de la expresión de estos genes. La última región génica analizada, la número 5, está al final del operón y tiene una expresión muy baja comparada con el resto de genes, lo que parece indicar que al menos alguno de los terminadores condicionales encontrados por bioinformática justo antes de esta región, podría ser funcional. Con la excepción del transcrito número 5, que tiene una abundancia similar

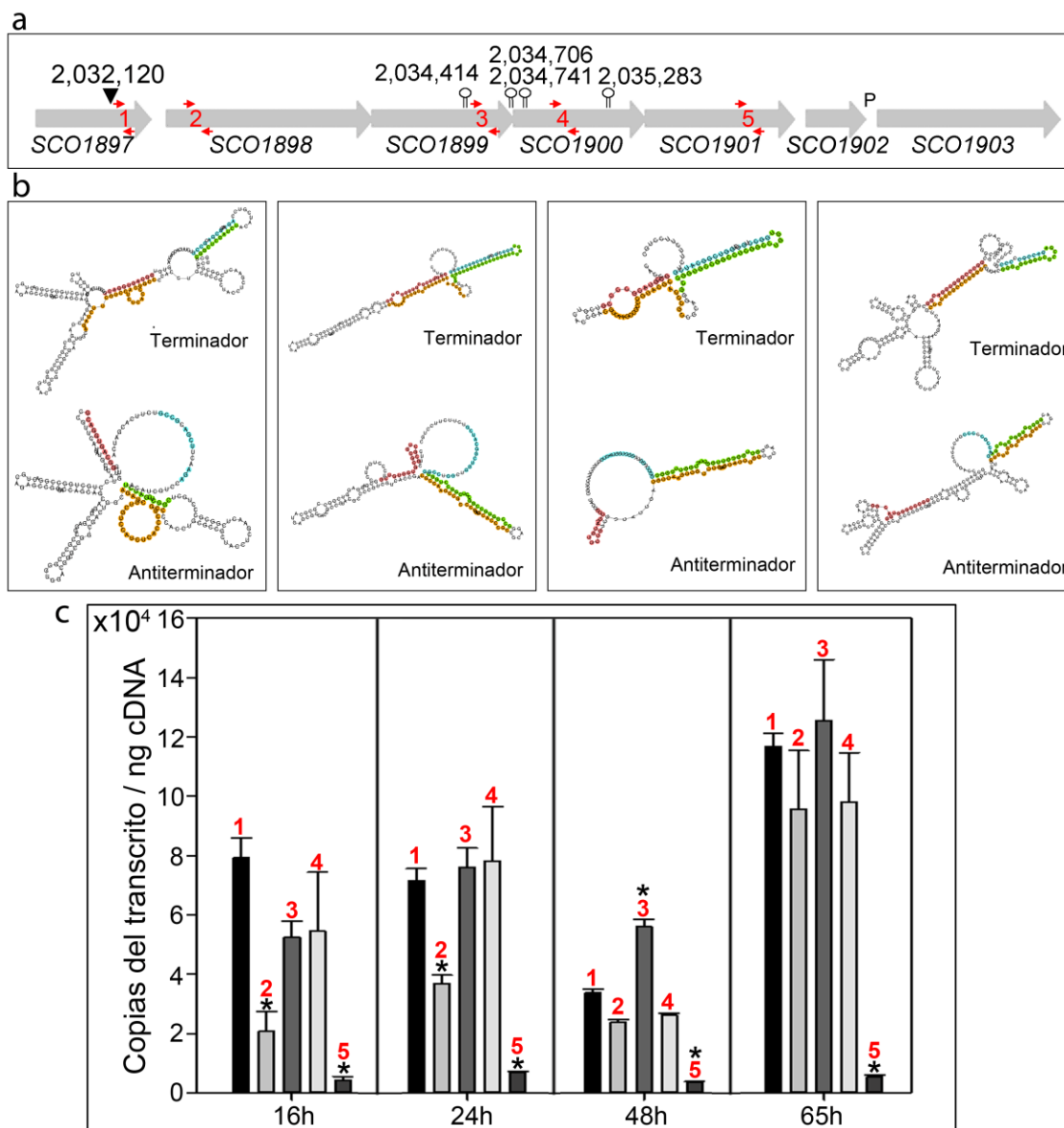
#### IV. RESULTADOS

---

en todos los tiempos, el resto de genes están más expresados en el tiempo de esporulación (65 horas en medio GYM) en comparación con el micelio del sustrato y aéreo (16, 24 y 48 horas en medio GYM) (Figura 29 c).

Como resultado podemos concluir que la expresión de la región *SCO1897-SCO1901* es compleja y debe implicar la existencia de promotores, terminadores, represores y/o activadores de la transcripción desconocidos. Cualquiera de estos genes, o todos, podrían ser responsables de los fenotipos observados en este mutante insercional. Por ello, tal como se describe en el siguiente apartado, llevamos a cabo experimentos de complementación del fenotipo de la cepa mutada con distintas combinaciones de estos genes para poder identificar el o los genes responsables del fenotipo.

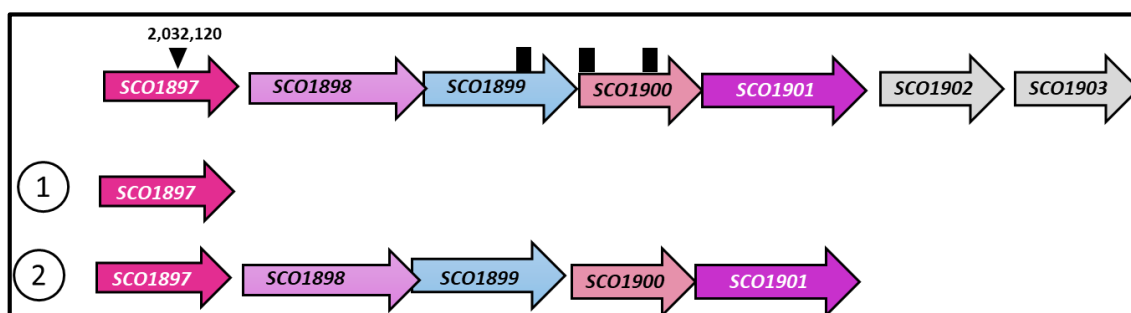
## IV. RESULTADOS



**Figura 29. (a)** Esquema representativo de la región genética de los genes *SCO1897-1901*, donde los números 1-5 indican los fragmentos analizados en la qPCR y P, sería el promotor identificado. **(b)** Conformaciones de los terminadores/ antiterminadores de los distintos posibles terminadores condicionales identificados en la región genética *SCO1897-1901* utilizando herramientas bioinformáticas. **(c)** Abundancia de los transcritos 1-5 de la región genética *SCO1897-1901* en cultivos sólidos GYM de 65h. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se procesaron tres réplicas biológicas.

### IV.3.2. Complementación del mutante *SCO1897::Tn5*

Con el fin de identificar el gen o los genes responsables de los fenotipos observados en el mutante *SCO1897::Tn5*, hemos diseñado dos construcciones de complementación: la primera con sólo el gen *SCO1897*, y la segunda con los 5 genes (*SCO1897-1901*) (construcciones 1 y 2 en la Figura 30). Estas construcciones de complementación se introdujeron en la cepa mutante, y los fenotipos de estas cepas complementadas con uno y con cinco genes, se analizaron en paralelo a las cepas mutante y salvaje. Además, hicimos otra cepa de complementación en la que restauramos el cromosoma de la cepa silvestre en el mutante *SCO1897::Tn5* mediante recombinación homóloga utilizando un cósmido que contenía esta región génica (los detalles metodológicos están descritos en el apartado II.4.1).



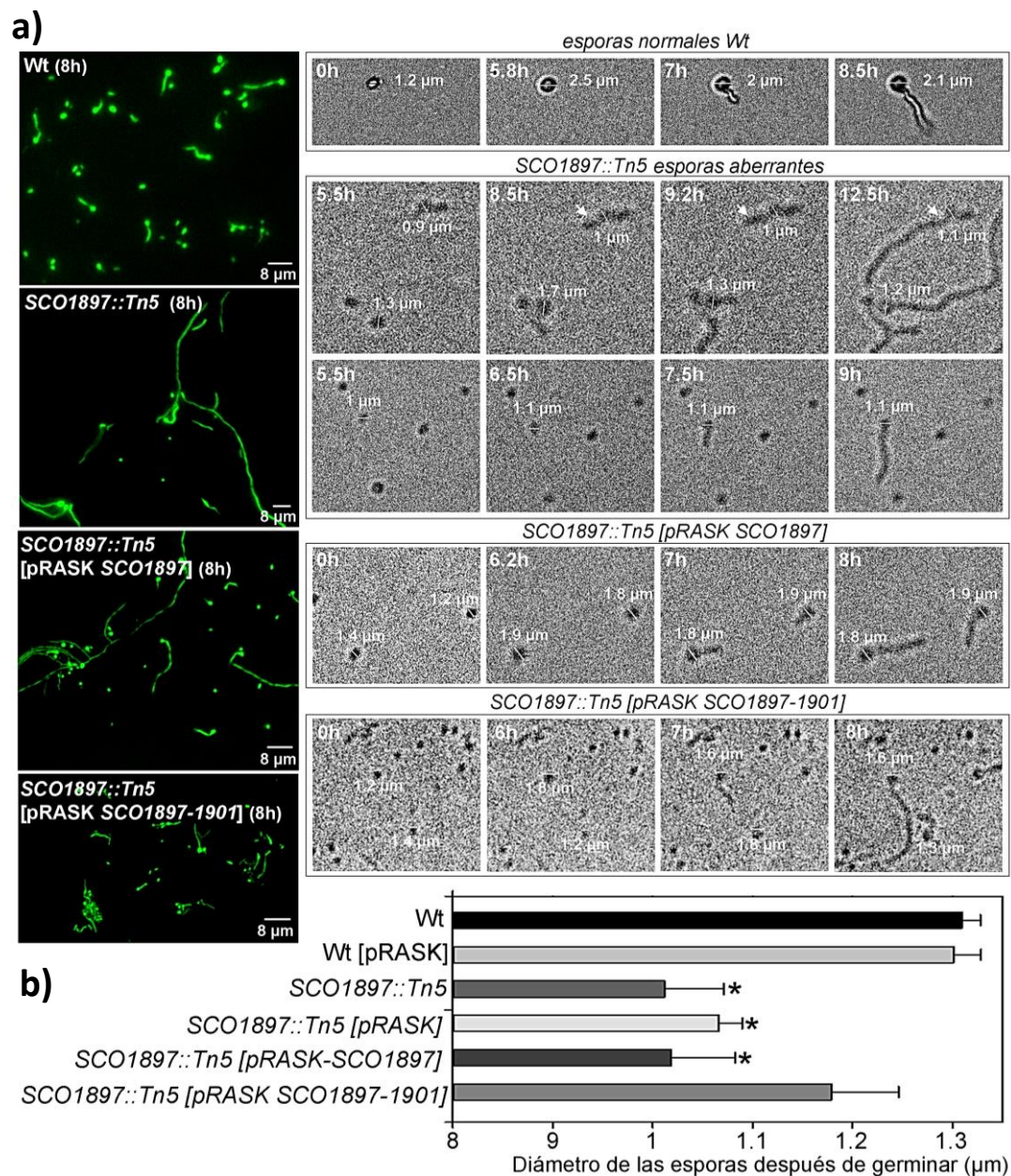
**Figura 30.** Construcciones de complementación del mutante *SCO1897:: Tn5*, con un gen (construcción 1) y con cinco genes (construcción 2). Los posibles terminadores condiciones aparecen marcados con un rectángulo negro sobre los genes *SCO1899/1900*.

Tal como muestra en los apartados siguientes y se discute en el apartado V. B), los fenotipos del mutante *SCO1897:Tn5* se restaurarán con cinco genes, por lo que aún nos queda pendiente identificar cuál, o cuáles, de estos genes es/son responsables de los fenotipos observados.

### **IV.3.3. El mutante *SCO1897::Tn5* tiene afectada la morfología de las esporas, la fase de hinchamiento de las esporas durante la germinación y el tiempo de germinación**

La morfología de las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* es mucho más variable que las esporas de la cepa salvaje. Muchas de las esporas del mutante son alargadas (marcadas con flechas en la figura 31), mostrando una forma alargada que la hace más parecido a un fragmento de hifa que a una espora, pero se comportan como esporas en el sentido de que tardan unas 5-8 horas antes de comenzar a crecer como las esporas (Figura 31). En la cepa salvaje, las esporas se hinchan antes de la emisión del tubo germinativo alcanzando hasta las 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (*Rioseras et al., 2016*). En contraste, el hinchamiento de las esporas de nuestro mutante *SCO1897::Tn5* ronda una micra de diámetro, incluidas las esporas alargadas. De hecho, buena parte de las esporas germinadas no se diferencian de su tubo germinativo, ya que tienen su mismo diámetro. La única forma de saber que esas hifas se han formado a partir de esporas que germinaron, es seguir su dinámica en los experimentos de time-lapse (Figura 31). En el mutante *SCO1897::Tn5* no hemos encontrado esporas que alcancen más de 1,7  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 31 a). En las cepas complementadas con uno y con cinco genes el máximo diámetro que observamos en las esporas hinchadas fue 1,9  $\mu\text{m}$  (los *time lapses* completos de la germinación de todas estas cepas están en las figuras suplementarias).

#### IV. RESULTADOS



**Figura 31.** (a) Morfología de las esporas de las cepas WT, *SCO1897:: Tn5*, *SCO1897:: Tn5 [pRASK 1897]* y *SCO1897:: Tn5 [pRASK SCO1897-1901]* vistas en microscopia confocal (tinción SYTO e IP) a las 8h y en experimento de *time lapse*. (b) Gráfica del diámetro de las esporas después de germinar. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se procesaron tres réplicas biológicas.

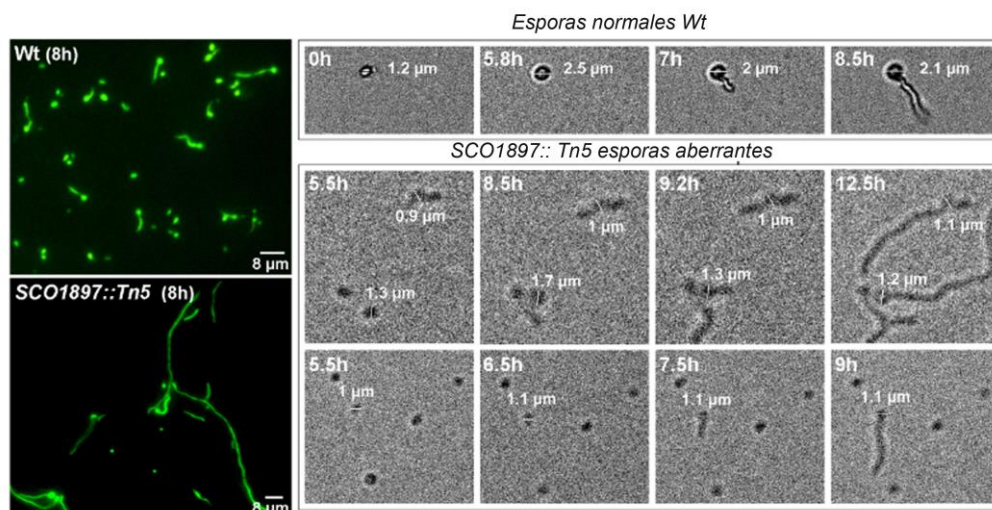
## IV. RESULTADOS

---

El hinchamiento máximo de las esporas es muy transitorio y precede a la emisión del tubo germinativo (*Rioseras et al., 2016*), por lo que la única forma de cuantificarlo es mediante experimentos de *time lapse* como los mostrados en la Figura 31 a, de forma que podamos tomar la imagen del punto exacto previo a la emisión del tubo germinativo. Cuantificar el hinchamiento de números elevados de esporas en este tipo de experimentos de *time lapse* es tedioso y hacer una estadística de las diferencias en el hinchamiento de las cepas salvaje, mutante y complementadas, es inviable. Por ello, y con el fin de precisar y analizar la significancia estadística de las diferencias observadas en el hinchamiento de las esporas cuantificamos el diámetro de las esporas de las hifas germinadas en tres réplicas biológicas de las cepas en fotografías tomadas durante los tiempos de germinación, midiendo el diámetro de las esporas que ya tenían tubos germinativos (véase apartado II.4.3. de métodos) (Figura 31 b). De este modo no estamos midiendo el máximo hinchamiento, que es anterior a la emisión del tubo germinativo, pero es concebible pensar que las esporas que más se hinchen durante la germinación, mantendrán volúmenes mayores tras la emisión del tubo germinativo. El menor hinchamiento de las esporas del mutante y del mutante complementado con el gen *SCO1897* (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK *SCO1897*]) es estadísticamente significativo. Aunque la media del hinchamiento de las esporas del mutante complementado con los cinco genes (cepa *SCO1897:: Tn5* [pRASK 1897-1901]) es menor que el de las esporas de la cepa salvaje, su diferencia no es significativa (Figura 31 b), por lo que los cinco genes restauran este fenotipo en el mutante.

El tiempo de germinación del mutante *SCO1897::Tn5* dista mucho de la cepa salvaje. Las esporas de la cepa salvaje, a las 8 horas están prácticamente todas germinadas. En cambio, en el mutante, en este tiempo hay muchas esporas no germinadas y curiosamente, algunas de las que han germinado, presentan tubos germinativos llamativamente largos en comparación con la cepa salvaje (Figura 32).

## IV. RESULTADOS



**Figura 32. (a)** Morfología de las esporas de las cepas WT, y *SCO1897:: Tn5* vistas en microscopia confocal (tinción SYTO e IP) a las 8h y en experimento de *time lapse*.

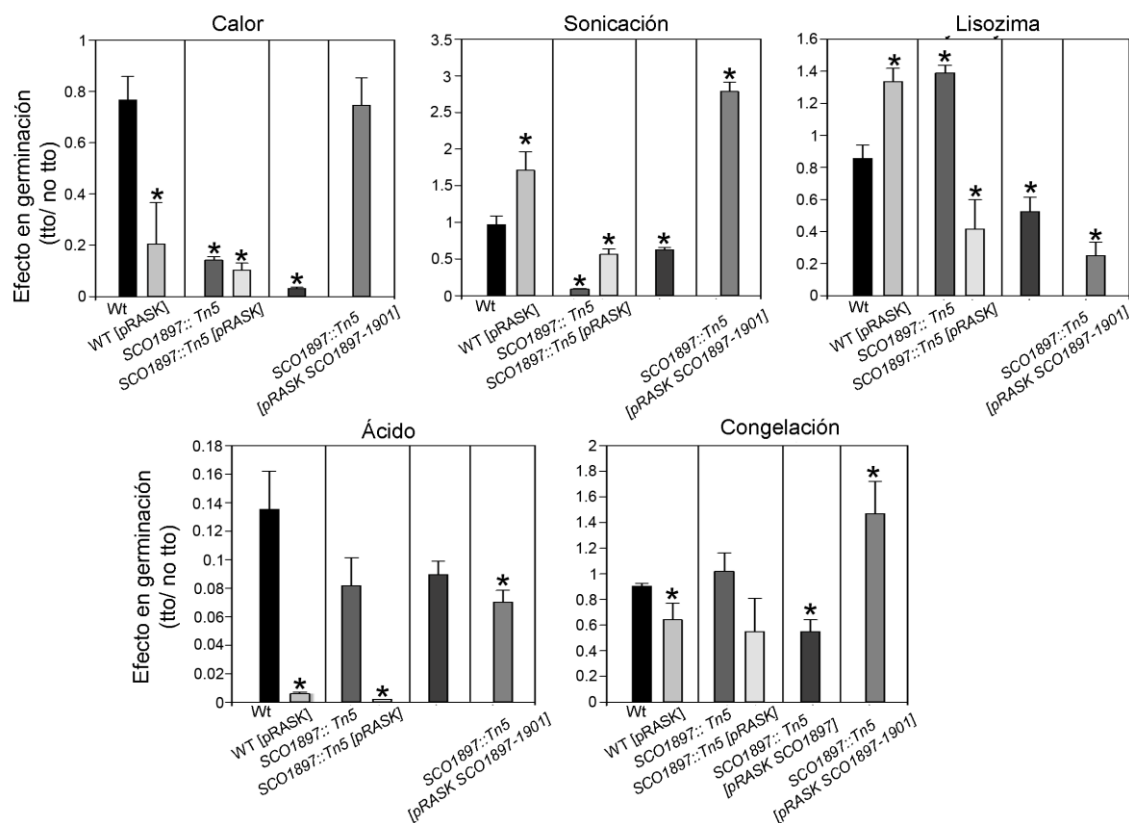
En definitiva, las esporas del mutante *SCO1897:: Tn5* son muy heterogéneas en cuanto a su germinación, lo que puede ser un reflejo de una heterogeneidad en algún componente/s celular/es. Tal como se describirá más abajo, esta heterogeneidad es uno de los motivos por los que hicimos experimentos de *single cell* ICP-MS (apartado IV.3.8 de resultados). Estos fenotipos de germinación se complementan al introducir una copia de los cinco genes (*SCO1987-1901*), pero no con un solo gen (*SCO1897*).

### **IV.3.4. La resistencia de las esporas al calor, sonicación, lisozima, ácido y congelación está afectada en el mutante *SCO1897:: Tn5***

Debido al fenotipo observado en la morfología y la germinación de las esporas del mutante, nos planteamos la hipótesis de si estas esporas tuviesen afectada su resistencia a condiciones físico-químicas. Para ello analizamos su resistencia a calor, frío, ácido, lisozima y sonicación (Figura 33).



## IV. RESULTADOS



**Figura 33.** Resultados del experimento de resistencia de las esporas en las cepas: WT, WT [pRASK], *SCO1897::Tn5*, *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897] y *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897-1901]. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se procesaron tres réplicas biológicas.

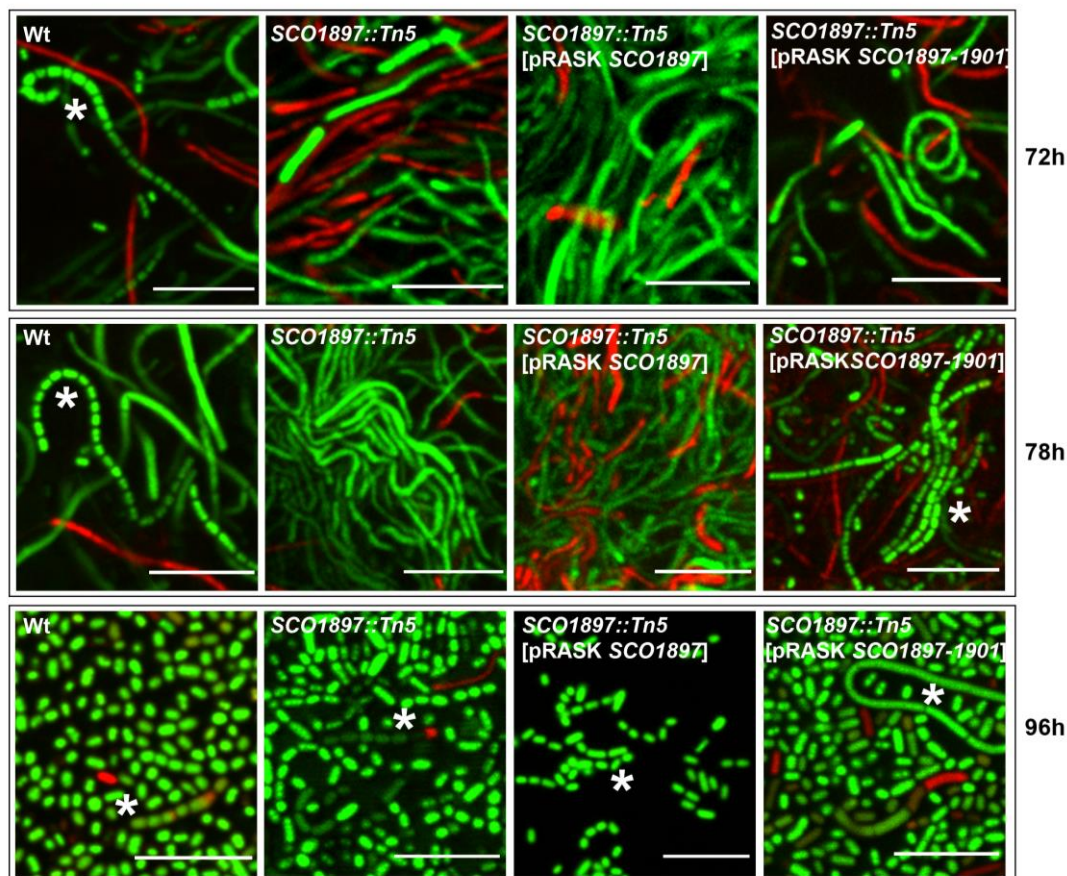
El mutante *SCO1897::Tn5* muestra una menor resistencia en el tratamiento de calor respecto a la cepa salvaje, que se recupera en la cepa complementada con cinco genes (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897-1901]). La resistencia a la sonicación es menor en la cepa mutante que en la salvaje, y se complementa con uno y cinco genes, aunque con cinco, la resistencia es incluso mayor que en la cepa salvaje (Figura 33). El tratamiento con lisozima favorece la germinación de las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* dando lugar a una diferencia significativa respecto a la cepa salvaje que se restaura con uno y cinco genes (Figura 33). En cambio, los tratamientos con ácido o la congelación parecen no afectar a las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* que se comportan igual que las de la cepa salvaje (Figura 33).

### **IV.3.5. Esporulaci3n del mutante *SCO1897::Tn5* y sus cepas de complementaci3n**

El mutante *SCO1897::Tn5* muestra un retraso en la esporulaci3n ya que esporula a las 96 horas en medio GYM mientras que la cepa salvaje lo hace a las 72 horas (Figura 34). Este retraso en la fase de esporulaci3n no se restaura en ninguna de las dos cepas de complementaci3n, ya que, a las 72 horas, tanto la cepa complementada con un gen (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*]) como la complementada con los cinco genes (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897-1901*]) no esporulan (Figura 34).

Cabe mencionar que, a las 78h, en el mutante complementado con cinco genes (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897-1901*]) ya se aprecian cadenas de esporas y alguna espora suelta, siendo similar al fenotipo del salvaje en el mismo tiempo (Figura 34). La cepa mutante complementada s3lo con el gen *SCO1897* (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK-*SCO1897*]) a3n no ha esporulado a las 78 horas. Finalmente, a las 96 horas todas las cepas est3n esporuladas (Figura 34). Por lo tanto, el retraso en la esporulaci3n se complementa con cinco genes, aunque la esporulaci3n sigue algo retrasada comparada con la cepa salvaje.

## IV. RESULTADOS



**Figura 34.** Esporulaci3n de la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas complementaci3n en distintos tiempos (72, 78 y 96h). Im3genes de fluorescencia l3aser confocal de hifas teñidas con SYTO9 e IP. Se muestran im3genes representativas de al menos tres r3plicas biol3gicas. Las barras de escala indican 8 μm. Los asteriscos indican la esporulaci3n.

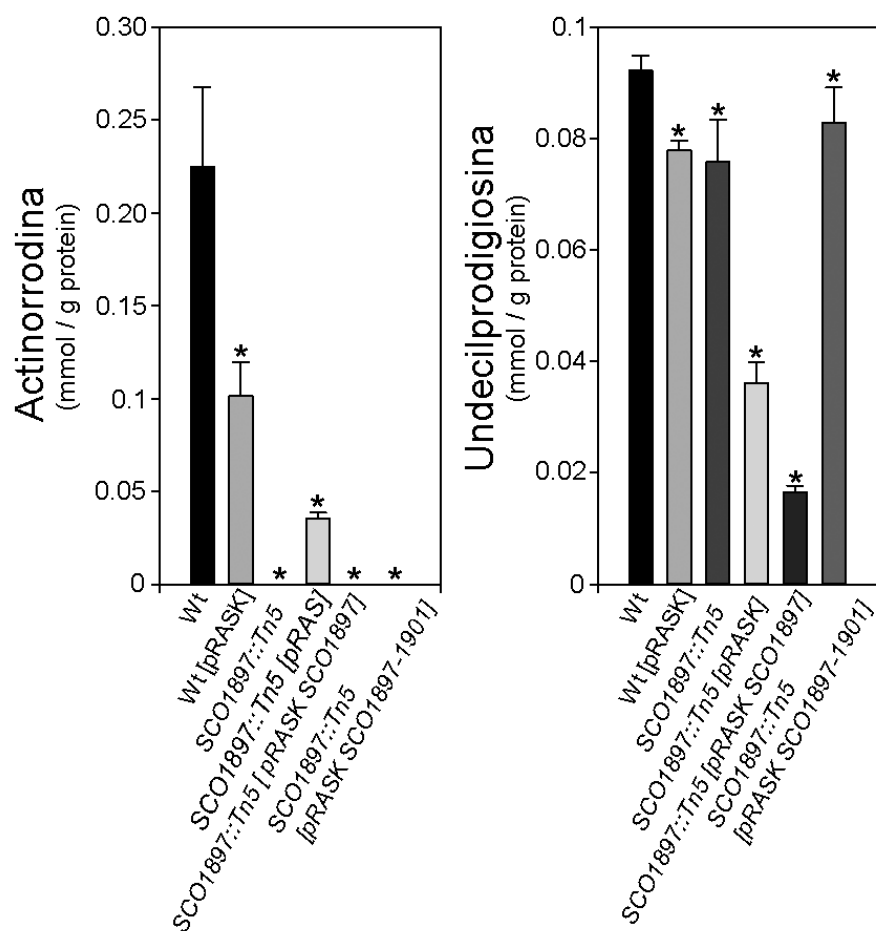
### IV.3.6. Producci3n de antibi3tico del mutante *SCO1897::Tn5* y sus cepas de complementaci3n

El mutante *SCO1897::Tn5* no es capaz de producir actinorrodina, pero produce undecilprodigiosina en los mismos niveles que la cepa salvaje (Figura 35).

Sorprendentemente el pl3smido usado para la complementaci3n (pRASK) increment3 la s3ntesis de actinorrodina y disminuy3 la s3ntesis de undecilprodigiosina en el mutante *SCO1897::Tn5*, pero no en la cepa salvaje. Las construcciones de

#### IV. RESULTADOS

complementación con uno y con cincogenes no pudieron restaurar la producción de actinorrodina, aunque si afectaron a la expresión de ambos antibióticos en comparación a la cepa mutante con el plásmido pRASK (Figura 35). Tal como se discutirá más adelante, estos resultados parecen indicar un efecto de la dosis de los genes *SCO1897* y *SCO1897-1901* en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, aunque aún no entendamos su mecanismo.



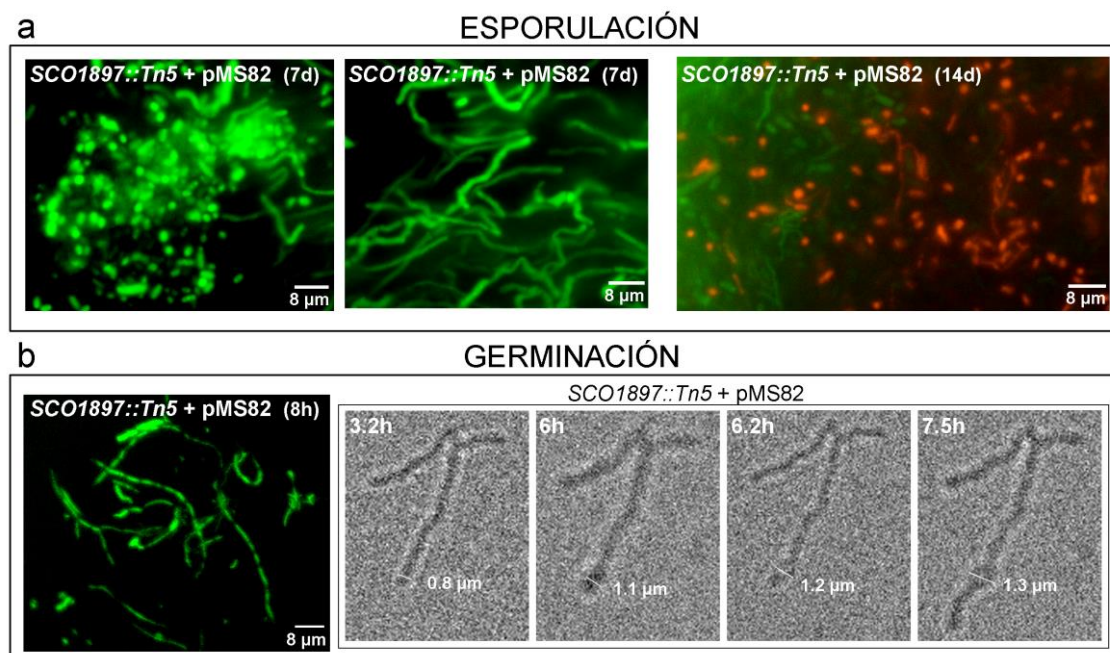
**Figura 35.** Producción de antibióticos de la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas complementación y sus respectivos controles. La producción de antibióticos se midió en tres réplicas biológicas en medio líquido R5A sin sacarosa a las 168 h una vez alcanzada la producción máxima. **a)** Actinorrodina. **b)** Undecilprodigiosina. Las diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje están marcadas con asteriscos.

### **IV.3.7. El fenotipo del mutante *SCO1897::Tn5* está afectado por plásmidos integrativos tipo $\Phi$ BT1**

El primer plásmido que nos planteamos usar para la complementación del fenotipo del mutante *SCO1897::Tn5* fue pMS82 (Gregory et al., 2003), un vector integrativo que se integra en el sitio  $\Phi$ BT1 que en *S. coelicolor* se integra en el gen *SCO4848* afectando a la expresión de este gen, y su gen aguas abajo (*SCO4849*) (Gonzalez-Quinonez et al., 2016). La integración de pMS82 produce un cambio muy drástico en el mutante *SCO1897::Tn5*. Al igual que en el mutante sin pMS82, la cepa *SCO1897::Tn5* [pMS82] tiene una esporulación retrasada y produce esporas con morfología alargada y presenta restos de hifas en la suspensión de esporas. La diferencia es que las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* portando el plásmido pMS82, tienen una germinación muy adelantada, estando todas germinadas a las 8 horas (Figura 36). Experimentos de *time-lapse* revelaron que la germinación de las esporas en esta cepa empieza en tiempos tan tempranos como 3 horas, y es muy sincrónica, germinando todas las esporas en un lapso muy pequeño de tiempo (Figura 36) (*time-lapse* completo en material suplementario).

Es interesante que los pequeños trozos de hifa se comportan como esporas, en el sentido de que no comienzan a germinar hasta las 3 horas tras la siembra, e incluso llegan a hincharse (Figura 36 b). Esto parece indicar que quedan compartimentos celulares en estas hifas que se comportan como esporas (Figura 36 b).

## IV. RESULTADOS



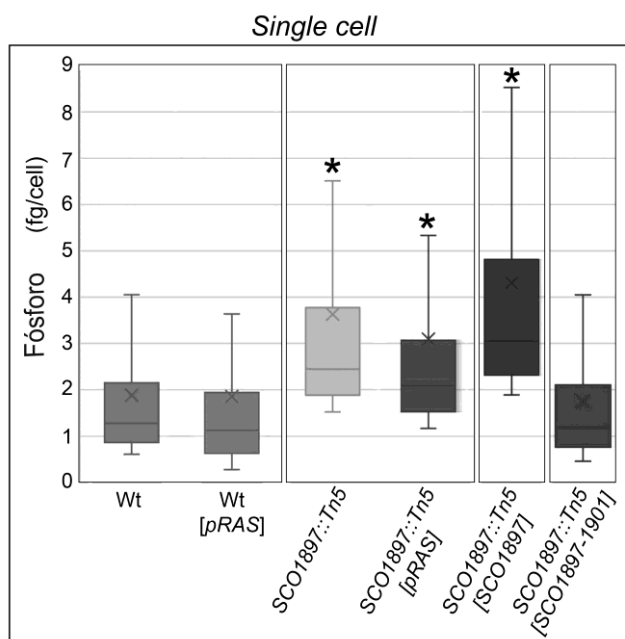
**Figura 36. (a)** Esporulaci3n de la cepa *SCO1897::Tn5* [pMS82] visto en microscopía confocal (tinci3n con SYTO9e IP). **(b)** Germinaci3n de la cepa *SCO1897::Tn5* [pMS82] visto en *time-lapse* a las 8h.

Estos resultados parecen indicar alg3n tipo de interacci3n entre los genes mutados por la inserci3n de pMS82 (*SCO4848* y/o *SCO4849*) y el mutante.

La funci3n de las prote3nas *SCO4848* y *SCO4849* es desconocida, pero sabemos que su mutaci3n genera un retraso en la germinaci3n (*Gonzalez-Quinonez et al., 2016*). *SCO4848* es una prote3na de peque1o tama1o que no da homolog3as con nada conocido. *SCO4849* da homolog3as con una fosfatasa que podr3a estar implicada en la homeostasis del f3sforo. Esta fue la primera pista de que el f3sforo podr3a estar implicado en los fenotipos del mutante *SCO1897::Tn5*, y este fue el motivo por el que el siguiente paso de esta tesis fue analizar los niveles de f3sforo en el mutante en comparaci3n con la cepa salvaje (apartado siguiente).

IV.3.8. El mutante *SCO1897::Tn5* acumula fósforo en las esporasa) Cuantificación de los niveles de fósforo total en esporas individuales (experimentos de *single cell*)

Analizamos si la acumulación de fosfatos y poli-P se ve alterada por la inactivación del regulador transcripcional *SCO1897* en experimentos de *single cell* ICP-MS. Como resultado, vimos que las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* acumulan más fósforo en el interior de sus esporas, respecto a la cepa salvaje, llegando casi a duplicar los valores (Figura 37). En el caso de las cepas de complementación, la cepa complementada con un gen (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897]) muestra los mismos niveles que el mutante, por lo que esta cepa no restaura los niveles de fósforo respecto a la cepa salvaje (Figura 37). En contraste, la cepa complementada con cinco genes (cepa *SCO1897::Tn5* [pRASK 1897-1901]), disminuye el acúmulo de fósforo siendo similar al de la cepa salvaje (Figura 37).



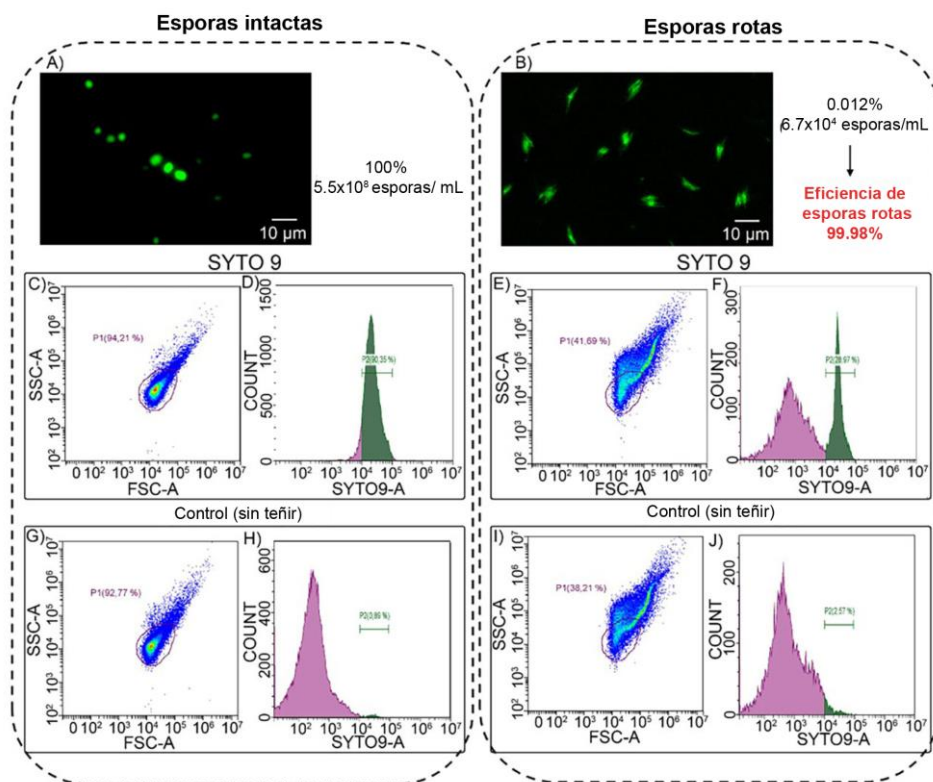
**Figura 37.** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo por célula en la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5*, las cepas de complementación y sus respectivos controles en experimentos de *single-cell*. Las diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje están marcadas con asteriscos. Se analizaron tres muestras biológicas.

### **b) Estudio de los acúmulos de fósforo intracelular (experimentos de *single particle*)**

Con el fin de caracterizar la posible formación de partículas fósforo intracelular, hicimos experimentos de *single particle* ICP-MS. Tal como se describe en metodología (apartado II.4.9.), comprobamos la eficiencia de rotura de las esporas mediante citometría de flujo xxxx (Figura 38). Para ello, las suspensiones de esporas se tiñeron con SYTO9 antes y después de la ruptura. La población de esporas intactas mostró un tamaño y distribución (Figura 38 c y 38 g) completamente diferente a la de las esporas rotas (Figura 38 e y 38 i). Esta diferencia en tamaño y complejidad pudo observarse directamente al microscopio. Las esporas rotas mostraban nubes irregulares de ADN unido a restos de las paredes celulares (Figura 38 b), mientras que las esporas intactas eran redondas y con bordes muy definidos (Figura 38 a). La señal fluorescencia del SYTO9 se filtró para eliminar la fluorescencia presente en los controles no teñidos de la fluorescencia real del SYTO9 (compárese Figura. 38 c, e con Figura 38 c, g). Estimamos que en la muestra procesada quedaban un 0,012% de esporas intactas, siendo la eficiencia de ruptura del 99,99%. En los experimentos de *single particle* es importante tener una buena eficiencia de ruptura celular para estar seguros de que las partículas que se cuantifican son partículas intracelulares en lugar de esporas intactas.

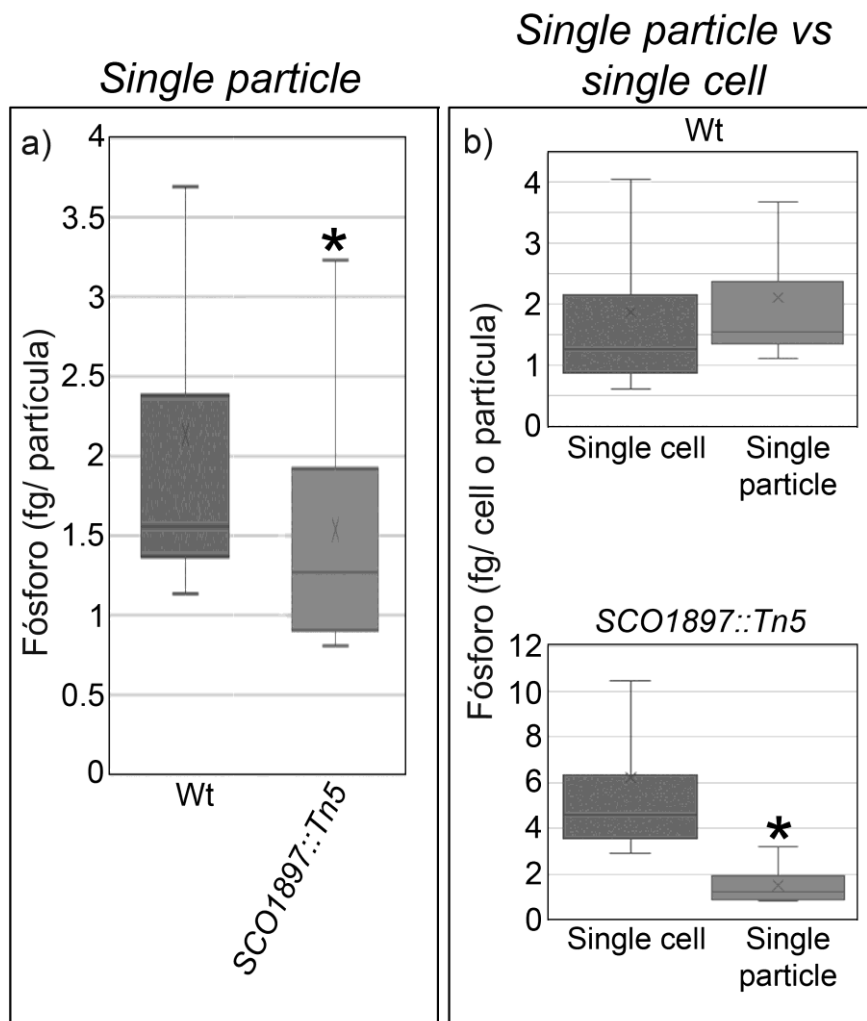


#### IV. RESULTADOS



**Figura 38.** Resultados de las esporas vistas en citometría de flujo. **a)** Esporas sin romper vistas en un microscopio confocal **b)** Esporas rotas vistas en microscopio confocal. **c-g)** Población y distribución de las esporas sin romper. **e-i)** Población y distribución de las esporas rotas.

Una vez que comprobamos que la ruptura de las esporas era correcta, procedimos a realizar los experimentos de *single particle* ICP-MS. La cantidad de fósforo en las partículas citosólicas del mutante fue significativamente menor que el de las partículas de fósforo de la cepa salvaje. Estos resultados indican que las esporas del mutante acumulan más fósforo total que el salvaje (Figura 37), pero este fósforo forma partículas de menor tamaño en la cepa mutante (Figura 39 a). La cantidad de fósforo en las partículas de la cepa salvaje no mostraba diferencias significativas con la de las esporas (Figura 39 b), lo que indica que la cantidad de partículas de fósforo por espora es pequeña. Por el contrario, en el mutante *SCO1897::Tn5* la cantidad de fósforo en las esporas fue significativamente mayor que en las partículas, lo que indica que en esta cepa la cantidad de partículas de fósforo por célula/espora, es elevada (Figura 39 b).



**Figura 39. (a)** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo por célula en la cepa salvaje frente al mutante *SCO1897::Tn5* en experimentos de *single-particle*. **(b)** Comparativa de los experimentos de *single cell vs single particle* del salvaje y del mutante. Los asteriscos marcan las diferencias significativas. Se analizaron tres muestras biológicas.

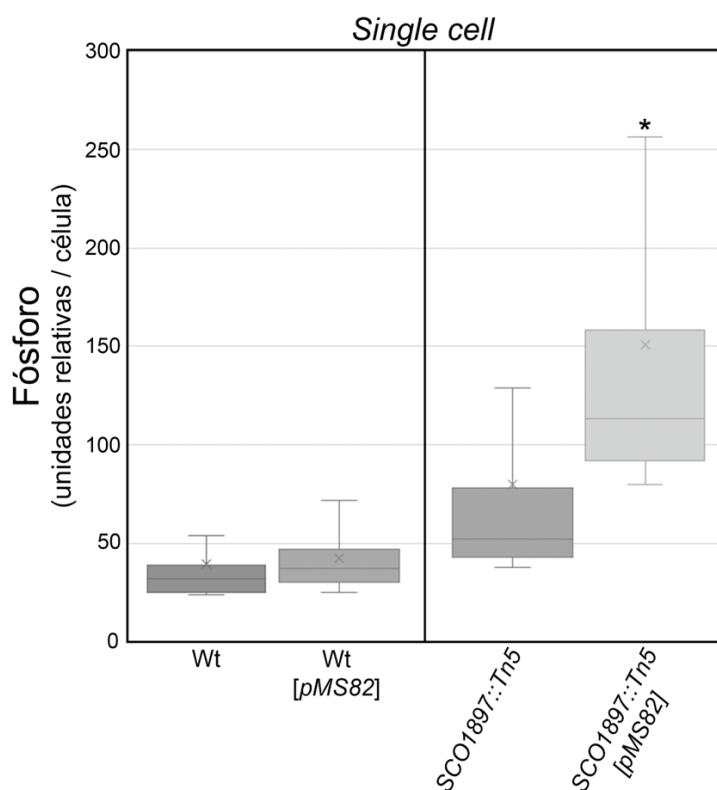
### **IV.3.9. La mutación de los genes *SCO4848/ 4849* potencia los fenotipos del mutante *SCO1897::Tn5***

*SCO4848* codifica una proteína de función desconocida, mientras que *SCO4849* codifica para una proteína que porta un posible dominio fosfatasa (número de acceso de la *Conserved Domain Database* cd07385), y podría estar relacionado con la degradación y/o formación de los gránulos de poli-P de las esporas. Aún nos quedan experimentos por hacer para acabar de entender la homeostasis del fosfato en el mutante *SCO1897::Tn5*, pero parece claro que las mutaciones de los genes *SCO4848/ 4849* son importantes en todos los fenotipos observados. El mutante tiene reducida la expresión de estos genes (Figura 41 b), y la inactivación de los mismos por la integración del plásmido pMS82 potencia todos los fenotipos del mutante *SCO1897::Tn5*: retrasa aún más y reduce la esporulación (Figura 36 a), aumenta la formación de esporas con morfología aberrante (alargadas) que además son menos resistentes ya que a las dos semanas de cultivo se mueren en cantidades elevadas (Figura 36 a) y aumenta la proporción de esporas aberrantes de germinación temprana (a las 8 horas todas las esporas están germinadas) (Figura 36 b).

Un punto interesante es que, la inserción del plásmido pMS82 en la cepa salvaje también desencadena los fenotipos observados en el mutante *SCO1897::Tn5*, aunque en mucha menor medida, que con la cepa salvaje: la cepa salvaje con pMS82 muestra un retraso en la germinación (*Gonzalez-Quinonez et al., 2016*), y en tiempos de 8 horas muestra un número reducido, pero reproducible, de hifas con los tubos germinativos muy largos como los observados en el mutante *SCO1897::Tn5* que nunca se observan en la cepa salvaje (datos no mostrados), además la acumulación de fósforo en las esporas también es mayor que en la cepa salvaje (Figura 40). Todo ello nos lleva a plantear la hipótesis de que alguna de las proteínas codificadas por los genes *SCO1897-1901* (los genes alterados en el mutante *SCO1897::Tn5*) interacciona con *SCO4848* o *SCO4849* y modulan la acumulación de fósforo intracelular, que a su vez modularía el resto de los fenotipos observados. Las proteínas que mejor encajarían en esta hipótesis son *SCO1900* (posible transportador de fósforo) y *SCO4849* (posible

#### IV. RESULTADOS

fosfatasa), aunque tal como se detalla en el apartado V.11 de discusión, hará falta más experimentación para comprobar si esta hipótesis es correcta.

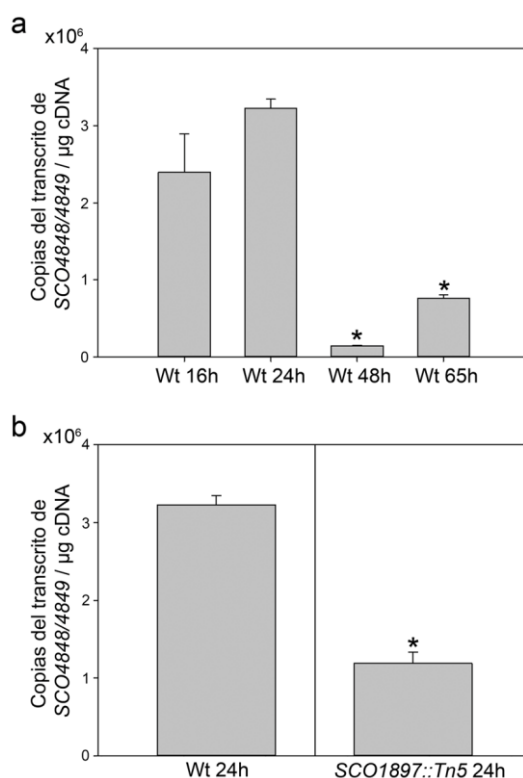


**Figura 40.** Gráfica de caja y bigotes donde se representa la cantidad de fósforo en unidades relativas de las cepas WT, WT [pMS82], *SCO1897::Tn5* y *SCO1897::Tn5* [pMS82]. Los asteriscos muestran las diferencias significativas de las cepas comparadas dos a dos. Se analizaron tres muestras biológicas.

Tal como vimos anteriormente (Figura 37), las esporas del mutante tienen el doble de fósforo intracelular que las esporas de la cepa salvaje (Figura 37). El plásmido *pMS82* no tuvo efecto en la acumulación de fósforo en la cepa salvaje (Figura 40).

### IV.3.10. La expresión de los genes *SCO4848/4849* está disminuida en el mutante *SCO1897::Tn5*

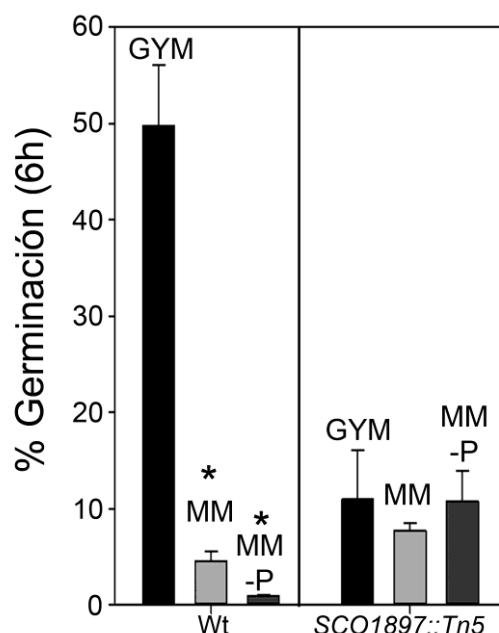
Los genes *SCO4848* y *SCO4849* se cotranscriben como un operón (Gonzalez-Quinonez *et al.*, 2016). Dado que hemos comprobado que la inactivación de la expresión de estos genes por la inserción del plásmido pMS82 en el mutante *SCO1897::Tn5* afecta al fenotipo y a la acumulación de fósforo en las esporas (Figuras 36 y 40), nos preguntamos si la expresión de este gen podría estar afectada en el mutante. Para ello cuantificamos la expresión de estos genes mediante qPCR. Las 24 horas se corresponden con el tiempo de máxima expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849* en la cepa salvaje de *S. coelicolor* (Figura 41 a), y este es el tiempo en el que analizamos la expresión diferencial de estos genes entre la cepa salvaje y mutante (Figura 41 b).



**Figura 41. a)** Abundancia génica de *SCO4848* analizada en el salvaje en todos los tiempos en medio GYM, siendo el punto máximo de expresión las 24h. **b)** Abundancia del gen de *SCO4848* en la cepa salvaje vs el mutante *SCO1897::Tn5* en medio GYM a las 24h. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se procesaron tres réplicas biológicas

### IV.3.11. Germinación de las cepas salvaje y mutante en medios de cultivo con y sin fósforo

Una vez que vimos que los niveles de fósforo intracelulares y la germinación son muy diferentes en las esporas de la cepa salvaje, el mutante *SCO1897::Tn5* y el mutante *SCO1897::Tn5 [pMS82]*, nos planteamos si el fósforo presente en el medio de cultivo podría condicionar la germinación. Analizamos la germinación en medio mínimo (MM) con y sin fósforo. El medio mínimo es un medio muy definido y entre sus componentes se encuentra el fósforo. Por tanto, en este medio podemos estar seguros que en el medio sin suplementar los niveles de fósforo son cercanos a 0. En MM con y sin fósforo, la germinación es mucho más rápida en el mutante que en la cepa salvaje (Figura 42). La cepa salvaje germina mucho más lento en MM sin fósforo, aunque en la cepa mutante no hay diferencias significativas en la germinación en MM con o sin fósforo (Figura 42). De hecho, en el mutante no hay mucha diferencia entre la germinación en MM o GYM (Figura 42). Esto parece indicar que, a diferencia de la cepa salvaje, las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* tienen suficiente fósforo acumulado para germinar independientemente del fósforo del medio de cultivo.



**Figura 42.** Germinación de la cepa salvaje vs el mutante *SCO1897::Tn5* a las 6h en diferentes medios: GYM, medio mínimo con fósforo (MM) y medio mínimo sin fósforo (MM-P). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Se contaron al menos 100 esporas de tres réplicas biológicas.

### **IV.3.12. Homologías, conservación y posibles funciones de los genes *SCO1897-1901***

Tal como se indicó en los párrafos anteriores y se discute en el apartado V.10, los genes *SCO1897-1901* complementan el fenotipo del mutante y, por tanto, alguno de estos genes, o todos, tiene/n que ser responsable/s del fenotipo observado. Por ello a continuación estudiamos las homologías de estos genes, con el fin de intentar comprender mejor sus posibles funciones.

*SCO1897* codifica para un posible regulador transcripcional que alberga un dominio *deoR* (número de acceso Pfam PF00455). y está altamente conservado en *Streptomyces* mostrando una similitud de aminoácidos promedio de similaridad de 92,2% entre cepas de *Streptomyces* modelo como *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans*, y *S. clavuligerus*.

*SCO1898* y *SCO1899* codifican para un posible transportador de tipo ABC, *SCO1898* da homologías con proteínas periplásmicas de unión a azúcares, y *SCO1899* da homologías con proteínas integrales de membrana relacionadas con el transporte de azúcares. Su promedio de similaridad entre *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans* y *S. clavuligerus* es del 88,2% y el 86,1% respectivamente.

*SCO1900* codifica una posible proteína integral de membrana con homologías con transportadores de tipo ABC. Interesantemente, *SCO1900* porta un dominio tipo PstA (número de acceso en la *Conserved Domain Database* COG0581). PstA es un transportador tipo ABC de fosfato. Su promedio de similaridad entre *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans* y *S. clavuligerus* es del 89.1%. *SCO1901* codifica una posible dehidrogenasa de función desconocida. Su promedio de similaridad entre *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans* y *S. clavuligerus* es del 91.6%.

La sintenia de estos cinco genes se mantiene en las cuatro especies de *Streptomyces* modelo analizadas (*S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans* y *S. clavuligerus*). Hasta el momento sabemos que la interrupción del gen *SCO1897* por el mini transposón *Tn5* afecta la germinación, la esporulación, la acumulación de fósforo en las esporas y la producción de metabolitos secundarios. También sabemos que el

#### IV. RESULTADOS

---

fenotipo de este mutante se restaura cuando introducimos los genes *SCO1897-1901* en un plásmido integrativo. Podemos concluir que los fenotipos observados dependen de alguno, o de todos, estos genes. Pero tal como se discutirá en el apartado V.11, actualmente estamos haciendo experimentos que nos permitan identificar el gen o genes responsables de los fenotipos observados. No nos ha dado tiempo a completar estos experimentos antes de la escritura y defensa de esta tesis doctoral.



## **V. DISCUSIÓN**



Esta tesis se centra en la caracterización de dos mutantes obtenidos por mutagénesis aleatoria, el mutante *SCO2103::Tn5* y el mutante *SCO1897::Tn5*. Por ello, se dividió la discusión en dos grandes apartados (A y B), uno para cada mutante.

### **A) *SCO2102* Y *SCO2103* SON ESENCIALES PARA LA ESPORULACIÓN DE *STREPTOMYCES***

#### **V.1. LA EXPRESIÓN DE *SCO2102* Y *SCO2103* ESTÁ ALTAMENTE REGULADA E INCLUYE, AL MENOS, DOS PROMOTORES Y UN TERMINADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN CONDICIONAL**

La expresión de los genes *SCO2103* y *SCO2102* está modulada por dos promotores identificados por Blanco et al., (*Blanco et al., 1998*) y Jeong et al., (*Jeong et al., 2016*) (P1 y P2 en la Figura 18 a). En este estudio, demostramos la existencia un terminador condicional aguas arriba de P2 y dentro del ORF *SCO2103* (Figura 22 b), que reduce la expresión de *SCO2102* cuando está presente (Figura 22 b). La terminación condicional de la transcripción es una estrategia de regulación basada en ARN que actúa en cis sobre la expresión génica. Un terminador condicional consiste en dos estructuras de ARN terminador y antiterminador mutuamente excluyentes, que dependiendo de una señal específica (pequeños ligandos, agotamiento de aminoácidos o antibióticos), pueden activar la terminación prematura de la transcripción. La conformación antiterminador sería necesaria para permitir la expresión completa de la ORF del gen *SCO2103*. Es necesario seguir trabajando para caracterizar la señal o las señales que modulan la pareja terminador / antiterminador condicional identificado en la ORF *SCO2103*.

Aunque *SCO2102* está aguas abajo de *SCO2103*, la expresión de *SCO2103* se redujo considerablemente en el mutante  $\Delta$ *SCO2102* (87 % menos en comparación con la cepa de tipo salvaje) (Figura 23a), lo que indica la existencia de una regulación adicional, más allá de los promotores P1 y P2 y el terminador condicional.

Esta compleja regulación modula la dosis de los transcritos de *SCO2102* y *SCO2103* produciendo un retraso (Figura 23 s, t) o una aceleración (Figura 23 i) de la esporulación en las cepas complementadas de los mutantes  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$ . Curiosamente, no pudimos crear el doble mutante *SCO2102-03*, es decir, delecionando los dos genes al mismo tiempo, lo que podría indicar que la actividad combinada de las proteínas *SCO2102* y *SCO2103* pudiera ser esencial para la viabilidad de *Streptomyces*. Tampoco pudimos sobreexpresar el gen *SCO2102*, lo que nuevamente sugiere que la dosis de transcripción de *SCO2102* podría determinar el desarrollo y la viabilidad.

### **V.2. SCO2102 COLOCALIZA CON FtsZ Y CON SCO2103 DURANTE LA ESPORULACIÓN**

En nuestro trabajo, *SCO2102* colocalizó con frecuencia con *FtsZ* (*SCO2082*) durante la esporulación (Figura 25). *FtsZ* es el primer componente de los divisomas vegetativos y de esporulación, es decir, las proteínas que controlan la invaginación de la envoltura celular durante la citocinesis (revisado en (den Blaauwen et al., 2017)). Aunque no hemos podido determinar con exactitud la cinética de la interacción entre *FtsZ* y *SCO2102*, es decir, si *FtsZ* comienza primero o continúa después de la acumulación de *SCO2102* en las hifas en esporulación, nuestros resultados indican que *SCO2102* participa, junto con *FtsZ*, en la compleja sucesión de proteínas que regulan la esporulación de *Streptomyces* (den Blaauwen et al., 2017).

*SCO2102* siempre colocalizó con *SCO2103* durante la esporulación (Figura 27 e, f) y además es esencial para el posicionamiento de la metiltetrahidrofolato reductasa *SCO2103* en las hifas esporulantes, ya que los spots fluorescentes de *SCO2103*-eGFP están ausentes en el *knockout*  $\Delta SCO2102$  (Figura 27 i). Las metiltetrahidrofolato reductasas participan en la biosíntesis de dTTP (Shetty and Varshney, 2020), y *SCO2103* podría ser imprescindible para proporcionar el dTTP necesario para la biosíntesis de ADN que acompaña a las hifas esporulantes. La cantidad de ADN cromosómico fue, de hecho, significativamente menor en el mutante no esporulante  $\Delta SCO2103$  (Figura 28).

FtsZ es el primer componente del divisoma, el complejo macromoleculoso necesario para la escisión de dos células hijas a partir de una célula madre (*Schwedock et al., 1997*), y la colocalización de FtsZ con SCO2102, y la de SCO2102 con SCO2103 durante la esporulación, parecen indicar que SCO2102 y SCO2103 son componentes activos del divisoma de esporulación.

### **V.3. LA INSERCIÓN DEL DOMINIO DnaAII DE STREPTOMYCES PODRÍA ESTAR RELACIONADA CON EL POSICIONAMIENTO DE DnaA Y OTRAS PROTEÍNAS EN EL DIVISOMA DE LAS HIFAS ESPORULANTES**

Tal como se detalló en la figura 18 b, el dominio DnaAII de la proteína DnaA (SCO3879) de *Streptomyces coelicolor* tiene una inserción de 160 aminoácidos que no está presente en otras bacterias. Esta inserción que es mucho mayor que el resto del dominio DnaA, es la que está en el dominio DnaA presente en SCO2102, y ambas regiones muestran un grado de conservación muy alto (Figura 43).



## V. DISCUSIÓN

---

El dominio DnaAll participa en la interacción de DnaA con otras proteínas (*Saxena et al., 2013a, Zawilak-Pawlik et al., 2017b*). En este trabajo hemos demostrado que *SCO2102* colocaliza con FtsZ en el divisoma de esporulación, y es de esperar, que esta interacción entre *SCO2102* y FtsZ dependa del dominio DnaAll. Si esto fuera así, sería concebible pensar que la inserción en el dominio DnaAll de las proteínas DnaA de *Streptomyces* también faciliten la interacción de las mismas con los divisomas de esporulación, facilitando así la localización de DnaA en las hifas esporulantes, y facilitando por tanto la replicación masiva del ADN que precede a la esporulación.

Una de las características más claras de *Streptomyces* que la diferencian de otras bacterias, es su esporulación sincrónica y masiva durante la fase de esporulación. Sería razonable pensar por tanto, que esta bacteria haya generado mecanismos específicos que faciliten los procesos de esporulación, en los cuales la división rápida del ADN es fundamental. Por ello, el dominio DnaAll de *Streptomyces* podría haber evolucionado a localizar esta proteína en el divisoma de las hifas esporulantes. En nuestro conocimiento, *Streptomyces* es la única bacteria en la que se ha descrito una duplicación del dominio DnaAll, en este caso en los ortólogos de *SCO2102*. Esto podría ser un mecanismo adicional evolutivo para facilitar la esporulación de forma que, *SCO2102* interaccionaría con proteínas clave para la esporulación (como *SCO2103* y quizá otras) facilitando su posicionamiento en las hifas esporulantes.

Harán falta experimentos futuros para analizar si estas hipótesis son ciertas, por ejemplo, hacer experimentos que permitan identificar las proteínas que interaccionan con *SCO2102* (experimentos de inmunoprecipitación, sistemas de dos híbridos de levadura, etc.). También se podría analizar la esporulación de un mutante de *dnaA* en el que hayamos eliminado la inserción del dominio DnaAll manteniendo la ORF y expresión de la proteína DnaA troncada sin esta inserción de 160 aminoácidos; etc.

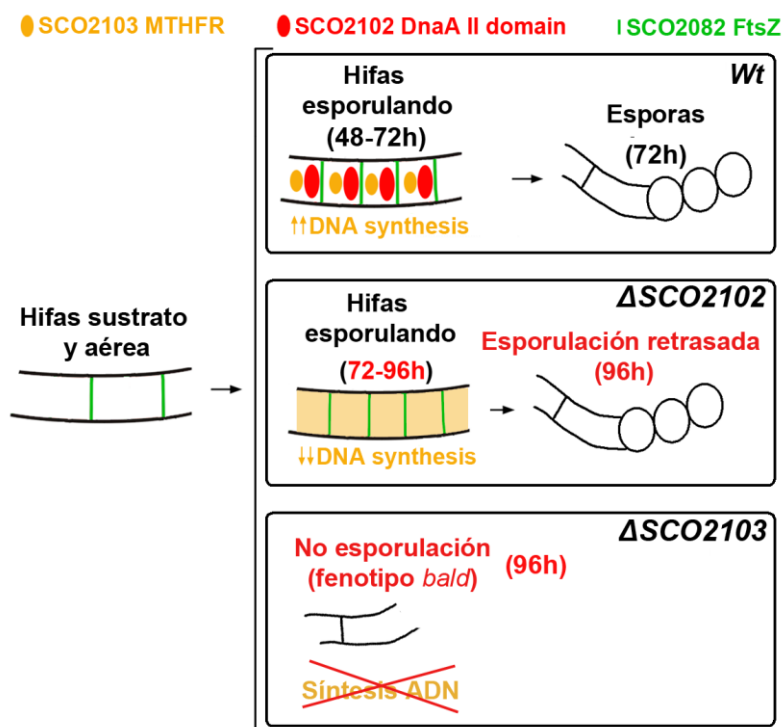
### **V.4. LOS MUTANTES $\Delta SCO2102$ Y $\Delta SCO2103$ TIENEN AFECTADA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO**

La producción de antibiótico, tanto la de actinorrodina como la de undecilprodigiosina, se vieron afectadas en los mutantes knockout  $\Delta SCO2102$  y  $\Delta SCO2103$  (Figura 24). Este efecto sobre la producción de antibióticos podría ser consecuencia de la reducción en la síntesis de metionina dependiente de SCO2103 MTHFR, ya que la metionina es importante para la síntesis de muchos antibióticos (por ejemplo, a través de SAM), incluida la actinorrodina (*Kim et al., 2003*). El efecto sobre la producción de antibióticos también podría ser indirecto, debido al impacto de SCO2102 y SCO2103 en la diferenciación y la esporulación, ya que la diferenciación de hifas, la esporulación y la producción de antibióticos están muy interconectadas.

### **V.5. MODELO ILUSTRANDO LA DINÁMICA E INTERACCIÓN ENTRE FTSZ, SCO2102 Y SCO2103 DURANTE LA ESPORULACIÓN**

El principal hallazgo de este trabajo se basa en que *SCO2102* (que alberga un dominio de interacción de proteína DnaA II) es esencial para el posicionamiento de la metiltetrahidrofolato reductasa *SCO2103* en las hifas durante la esporulación, y que la ausencia de *SCO2103* disminuye la cantidad de ADN cromosómico durante la esporulación.





**Figura 44.** Modelo propuesto para la descripción de la dinámica de FtsZ (verde), SCO2102 (rojo) y SCO2103 (naranja) durante la esporulación de hifas. SCO2102 y FtsZ colocalizan en las hifas esporulantes en la cepa salvaje. SCO2102 es esencial para posicionar SCO2103 en las hifas en esporulación, aumentando la actividad de MTHFR y la síntesis de nucleótidos (dTMP), mejorando la replicación del ADN cromosómico que acompaña a la esporulación. SCO2103 no está posicionado en las hifas que esporulan en el mutante  $\Delta$ SCO2102, lo que reduce la accesibilidad de dTMP y retrasa la esporulación. La ausencia de actividad SCO2103 MTHFR en el mutante  $\Delta$ SCO2103 bloquearía la síntesis de ADN potenciada por SCO2103, que es esencial para la esporulación, generando un fenotipo no esporulante.

Tomando como base estos resultados, proponemos un modelo en el que SCO2102 posiciona a SCO2103 en las hifas en esporulación, lo que facilita la biosíntesis de nucleótidos (dTMP) necesaria para la replicación masiva del ADN cromosómico que acompaña la esporulación (Figura 44). La ausencia de SCO2102 en el mutante  $\Delta$ SCO2102 impide la localización de SCO2103 en las hifas en esporulación, lo que probablemente limita la síntesis de dTMP (Shetty and Varshney, 2020) en las hifas esporulantes y retrasa la esporulación. En el caso del mutante  $\Delta$ SCO2103, este carece de actividad SCO2103 MTHFR y presenta una gran reducción en la síntesis de ADN, que bloquearía la esporulación.

## **B) *SCO1897-1901* MODULAN LA GERMINACIÓN Y ACUMULACIÓN DE FÓSFORO EN LAS ESPORAS, ASÍ COMO EL METABOLISMO SECUNDARIO Y LA ESPORULACIÓN**

### **V.6. LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *SCO1897-1901* ES COMPLEJA Y MUY DESCONOCIDA**

La regulación de la transcripción de los genes *SCO1897-1901* es muy desconocida. En nuestro conocimiento no hay ningún promotor descrito en esta región, y tampoco se conoce ningún terminador transcripcional. El hecho de que el fenotipo del mutante *SCO1897::Tn5* no se restaure sólo con el gen *SCO1897* y necesite alguno, o todos, de sus cuatro genes aguas abajo, sugiere que estos genes deben cotranscribirse como un operón. La transcripción de estos cinco genes en la cepa salvaje varía a lo largo del desarrollo y hay diferencias significativas en la expresión de cuatro de ellos al menos en alguna de las fases de desarrollo analizadas (Figura 29 c). Este resultado demuestra la existencia de promotores, terminadores de la transcripción, represores y/o activadores de la transcripción desconocidos que modulan la expresión diferencial de los genes. Las ORFs de los genes *SCO1898* a *SCO1901* están contiguas llegando a solaparse en sus tripletes (Figura 29 a), lo que hace improbable la existencia de terminadores de la transcripción entre ellos, ya que harían imposible la transcripción de sus ORFs completas. Mediante análisis bioinformáticos, hemos sido capaces de identificar un posible promotor entre los genes *SCO1898* y *SCO1901*, y cuatro posibles terminadores condicionales situados entre los genes *SCO1899* y *SCO1900* (apartado IV.3.1 de resultados). Los terminadores condicionales existen en dos conformaciones excluyentes, terminadora y no terminadora, lo que hace que en función de señales específicas se active o reprima la transcripción (Millman et al., 2017).

Hará falta seguir trabajando en la caracterización de la regulación de la expresión de estos genes. Como se discute en el apartado V.6., entender esta regulación y definir cuál/es de estos cinco genes está/n modulando los fenotipos observados en el

mutante *SCO1897::Tn5* es el punto que nos falta para terminar este apartado de la tesis y poder publicar los resultados.

### **V.7. EL MUTANTE *SCO1897::Tn5* ACUMULA ALTOS NIVELES DE POLIFOSFATO EN LAS ESPORAS LO QUE PODRÍA ESTAR MODULANDO LA GERMINACIÓN**

La acumulación de fosfato aumenta mucho en las esporas del mutante *SCO1897::Tn5* (Figura 37), que además muestran un retraso drástico en la germinación (Figura 42). La acumulación de poli-P inhibe la germinación en *Clostridium* (Akhtar et al., 2008) o incluso altas concentraciones de nucleósidos polifosfatos inhiben la germinación de *Streptomyces galilaeus* (Hamagishi et al., 1980), por lo que el poli-P podría contribuir a modular la latencia de las esporas. La germinación de esporas depende de la activación de los efectores involucrados en la activación del metabolismo para salir de la etapa de latencia y romper las cubiertas de esporas y emitir el tubo de germinación (Strakova et al., 2013a). Se ha visto que el fósforo es un elemento crítico para la germinación en *Streptomyces*, y que el poli-P se acumula en las esporas de *Streptomyces* como reserva de fosfato (Strakova et al., 2013a). Sin embargo, no se pueden descartar otras funciones de los poli-P acumulados en las esporas de *Streptomyces*, además de la reserva de fosfato (Brown and Kornberg, 2008).

En nuestro mutante, *SCO1897::Tn5*, los altos niveles de poli-P aumentarían la latencia de las esporas, retrasando la germinación, mientras que los poli-P acumulados en la cepa salvaje serían óptimos para mantener la inactividad de las esporas y liberar el fosfato necesario para la germinación. En este sentido, es interesante que en un medio de cultivo sin fósforo, la germinación de las esporas de la cepa salvaje se ralentiza muchísimo, mientras las del mutante no cambia demasiado (Figura xx). Este resultado ratifica que el fósforo es importante para la germinación y que los niveles de fósforo son críticos para iniciar la germinación: si los niveles de fósforo intracelular son muy elevados, como en el mutante, la germinación se ralentiza; pero si son muy bajos, como en el salvaje en MM sin fósforo, la germinación se ralentiza, ya que el fósforo

sería limitante para el crecimiento. La ralentización de la germinación en el mutante, debe implicar mecanismos de represión de la esporulación por fósforo, y los genes *SCO1897-1901* podrían participar en esta regulación. La concentración óptima de fósforo sería por tanto la de las esporas de la cepa salvaje germinando en un medio que contenga fósforo (Figura 42).

Hemos descubierto que el bloqueo de la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849* por el plásmido integrativo *pMS82* incrementa la germinación en el mutante (Figura 36 b) e incrementa los niveles de fósforo intracelular (Figura 40). También hemos descubierto que la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849* está disminuida en el mutante *SCO1897::Tn5* (Figura 41 b). *SCO4848* codifica una proteína de función desconocida, mientras que *SCO4849* codifica para una proteína que porta un posible dominio fosfatasa (número de acceso de la *Conserved Domain Database* cd07385), y podría estar relacionado con la degradación y/o formación de los gránulos de polifosfato de las esporas.

Tal como se describe en el apartado V.11, aún nos quedan experimentos por hacer para acabar de entender la homeostasis del fosfato en el mutante *SCO1897::Tn5*.

### **V.8. EL MUTANTE *SCO1897::Tn5* TIENE ALTERADOS EL METABOLISMO SECUNDARIO Y LA ESPORULACIÓN**

El mutante *SCO1897::Tn5*, así como las cepas de complementación tienen afectada la producción de antibiótico, sobre todo la actinorrodina, cuya producción es nula en el mutante. Por tanto, el regulador transcripcional *SCO1897* y/o alguno de sus cuatro genes aguas abajo, podría/n estar involucrados en alguna vía de activación o represión del metabolismo secundario de *Streptomyces*.

Como hemos mencionado en el apartado I.3.6. de introducción, el fósforo es un elemento celular indispensable que interviene en multitud de procesos siendo alguno de ellos la síntesis de metabolitos primarios y secundarios (*Barreiro and Martinez-Castro, 2019*). Además, el transporte de fósforo realizado por los transportadores

específicos es clave para una correcta diferenciación y esporulación en medios sólidos (Díaz *et al.*, 2005, Martin and Liras, 2021). Las alteraciones en los niveles de fósforo podrían contribuir a los fenotipos observados en cuanto a la producción de metabolitos secundarios. Hará falta más trabajo para acabar de entender los mecanismos por los que el mutante *SCO18987::Tn5* tiene alterada la producción de antibióticos. Tal como se indica en el apartado V.10, entre otros experimentos, estamos haciendo experimentos de RNAseq del mutante, lo que nos permitirá identificar si la expresión de alguno de los genes implicados en la síntesis de antibióticos está alterada en el mutante, y por tanto regulada directamente por el regulador transcripcional *SCO1897*.

### V.9. IMPORTANCIA DEL MUTANTE *SCO1897::Tn5*

Tal como se introdujo en el apartado I.3.6, el fósforo es un nutriente esencial y un regulador global de la expresión génica que modula multitud de procesos en bacterias en general y en *Streptomyces* en particular. La homeostasis celular del fósforo está altamente regulada mediante transportadores y kinasas y fosfatasa de regulación muy compleja y aún no del todo conocida (Díaz *et al.*, 2005, Martin and Liras, 2021, Diaz *et al.*, 2013). El mutante *SCO1897::Tn5* tiene un fenotipo muy llamativo en cuanto a la acumulación de fósforo en las esporas, ya que es capaz de acumular hasta el doble de fósforo por espora que la cepa salvaje (Figura 37), aunque el tamaño de sus gránulos de fósforo (volutina) es menor que en la cepa salvaje (Figura xxx). En nuestro conocimiento este es el primer mutante que se ha descrito que es capaz de acumular niveles tan elevados de fósforo. Ninguno de los cinco genes (*SCO1897-1901*) alterados en este mutante y que son capaces de complementar los fenotipos observados, han sido caracterizados anteriormente. Sin duda, cuando acabemos de caracterizar este mutante, estaremos en condiciones de aportar nuevas claves sobre la homeostasis del fósforo y su papel en la regulación de la germinación, esporulación y el metabolismo secundario.

Por otro lado, y desde el punto de vista metodológico, los experimentos de *sinble cell* y *single particle* que hemns desarrollado para la medida de fósforo son muy

novedosos. En nuestro conocimiento, esta es la segunda vez que se hace *single cell-ICPMS* en esporas de *Streptomyces* (la primera fue en nuestro trabajo sobre la homeostasis del cobre) (Gonzalez-Quinonez *et al.*, 2019), y la primera que se mide específicamente fósforo. También somos los primeros en hacer experimentos de *single particle ICP-MS* en *Streptomyces* y los primeros en cuantificar partículas de fósforo por *single particle ICP-MS*.

### V.10. COMPLEMENTACIÓN DE LOS FENOTIPOS DEL MUTANTE *SCO1897::Tn5*

El mutante *SCO1897::Tn5* tiene afectado el hinchamiento de las esporas durante la germinación, el tiempo de esporulación, la producción de los antibióticos (actinorrodina y undecilprodigiosina), la resistencia de las esporas a estreses físico-químicos y los niveles de fósforo citosólico en las esporas. El hinchamiento, resistencia a tratamientos físico-químicos, y la acumulación de fósforo en las esporas se complementan con cinco genes (Figuras 31, 33 y 37); la resistencia de las esporas a la sonicación y la lisozima se complementan con un gen (Figura 33). La producción de antibióticos no se complementa con uno y con cinco genes, aunque se ve afectada por los mismos (Figura 35).

Todos los fenotipos se restauran a los niveles de la cepa salvaje en el mutante en el que eliminamos el transposón y restauramos el cromosoma de la cepa salvaje (datos no mostrados), lo que demuestra que los fenotipos dependen de la inserción del transposón *Tn5* y no de otras mutaciones que hayan podido producirse en otras regiones del cromosoma. En definitiva, sabemos que los fenotipos observados en el mutante *SCO1897::Tn5* dependen de alguno o todos los genes incluidos en la región cromosómica *SCO1897-1901*, pero aún no hemos podido definir el gen o genes específicos que controlan estos fenotipos.

### V.11. POSIBLES FUNCIONES DE LOS GENES *SCO1897-1901* Y EXPERIMENTOS FUTUROS

Lo que nos falta para finalizar la caracterización de los genes *SCO1897-1901*, es definir exactamente el gen/es responsables del fenotipo. El regulador transcripcional *SCO1897* es capaz de complementar el sólo el fenotipo en la resistencia de las esporas a la sonicación y al calor (Figura 33) y también modula la expresión de los genes *SCO4848* y *SCO4849* (Figura 41 b) que participan en los fenotipos observados en germinación (apartado IV.3.7). Por ello, está claro que el regulador transcripcional *SCO1897* participa en al menos parte de los fenotipos observados. También pudiera ser que *SCO1897* autorregule su propia expresión y/o la expresión de sus genes aguas abajo, aunque esto es algo que debemos explorar. De los genes aguas debajo de *SCO1897*, el más prometedor en cuanto a la regulación de los fenotipos observados es *SCO1900*, que codifica para un transportador de fósforo. Su inactivación en el mutante podría ser responsable de la acumulación de fósforo en las esporas, y quizá estos niveles de fósforo, podrían regular los efectos observados en germinación, producción de antibiótico y germinación. Tal como se introdujo en el apartado I.3.6, el fósforo es un regulador de control global que afecta a multitud de procesos de la biología de *Streptomyces*.

Teniendo en cuenta todo lo anterior los experimentos que estamos realizando para completar el estudio de los genes *SCO1897-1901* son los siguientes:

1. Haremos experimentos de RNAseq del mutante *SCO1897::Tn5* para intentar entender los genes cuya expresión está afectada por este regulador transcripcional. Dos de ellos ya sabemos que son *SCO4848* (de función desconocida) y *SCO4849* (posible fosfatasa que podría participar en la homeostasis del fósforo), pero podría haber muchos más. Será interesante ver si otros genes de la homeostasis del fósforo están afectados.
2. Analizaremos la expresión de los genes *SCO1897-1901* mediante qPCR en el mutante *SCO1897::Tn5* y el mutante complementada con uno y con cinco genes, con el fin de definir exactamente el gen o genes cuya expresión

disminuye en el mutante y se restaura en la cepa complementada con uno y cinco genes.

3. Sobreexpressaremos los genes *SCO1897* y *SCO1900* en la cepa salvaje y la cepa mutante. La sobreexpresión de *SCO1897* nos permitirá comprobar su posible efecto como regulador en *trans* de la transcripción en la expresión de sus genes aguas abajo (cuya expresión de los genes la analizaremos por qPCR). También nos permitirá identificar otros genes cuya transcripción esté modulada por este regulador transcripcional al igual que sucede por ejemplo con *SCO4848* y *SCO4849* (apartado IV.3.10.). La sobreexpresión de *SCO1900* nos permitirá ver su efecto en la cepa salvaje, y comprobar si es capaz de restaurar el fenotipo de la cepa mutante. Tal como se indicó arriba, *SCO1900* tiene homologías con transportadores de fósforo y su inactivación en el mutante *SCO1897::Tn5* podría ser la responsable del fenotipo observado en cuanto a la acumulación de fósforo.
4. Si los experimentos anteriores no dieran resultados claros, podríamos hacer los mutantes *knockout* en los genes *SCO1897* y *SCO1900* mediante CRISPR-Cas9 para evitar lo máximo posible los efectos polares entre genes.

Con los resultados de estos experimentos esperamos estar en condiciones de poder definir un modelo que explique el efecto de estos genes en la homeostasis del fósforo, la regulación de la germinación, la esporulación y la producción de metabolitos secundarios.



## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

---

1. Los mutantes *SCO2103::Tn5* y  $\Delta$ *SCO2103* muestran un fenotipo *bld* y tienen afectada la producción de antibiótico.
2. El mutante  $\Delta$ *SCO2102* muestra un retraso en la esporulación y tiene afectada la producción de antibiótico.
3. Los genes *SCO2102* y *SCO2103* se encuentran altamente conservados en *Streptomyces*.
4. La expresión de *SCO2102* y *SCO2103* es compleja: se cotranscriben a partir de dos promotores; su expresión está modulada por un terminador transcripcional condicional. Debe haber una regulación adicional que explique la baja expresión de *SCO2102* en el mutante  $\Delta$ *SCO2102* complementado con P1 y P2-*SCO2102*.
5. *SCO2102* colocaliza con FtsZ en las hifas esporulantes y *SCO2102*-mCherry reduce en gran medida la formación en escalera de los anillos FtsZ-eGFP, lo que indica algún tipo de interacción entre ambas proteínas en las hifas esporulantes.
6. *SCO2103* forma acúmulos en las hifas esporulantes que colocalizan con *SCO2102*. *SCO2102* es esencial para la formación de estos acúmulos, ya que su formación se bloquea en el mutante  $\Delta$ *SCO2102*.
7. *SCO2103* participa en la síntesis de ADN cromosómico durante la esporulación, ya que el mutante  $\Delta$ *SCO2103* tiene menor cantidad de ADN cromosómico que las hifas esporulantes de la cepa salvaje.
8. Proponemos un modelo en el que *SCO2102* posiciona a *SCO2103* junto FtsZ en las hifas en esporulación, lo que facilita la biosíntesis de nucleótidos necesaria para la replicación del ADN cromosómico que acompaña la esporulación.

## VI. CONCLUSIONES

---

9. El mutante *SCO1897::Tn5* tiene afectada la germinación, la producción de antibiótico y la esporulación.
10. El mutante *SCO1897::Tn5* presenta una acumulación de fósforo muy elevada en sus esporas, un fenotipo que en nuestro conocimiento es único. Esta acumulación de fósforo se duplica con la inactivación de los genes *SCO4848* y *SCO4849*.
11. Los fenotipos del mutante *SCO1897::Tn5* dependen de alguno de los genes *SCO1897-1901*. Harán falta experimentos futuros para definir el gen o los genes involucrados en los fenotipos observados.
12. Los genes *SCO1897-1901* se encuentran conservados en *Streptomyces*.
13. La expresión de los genes *SCO1897- SCO1901* es compleja y podría estar modulada por cuatro terminadores condicionales de la transcripción.



## **VII. REFERENCIAS**



## VII. REFERENCIAS

---

- AKANUMA, G., UEKI, M., ISHIZUKA, M., OHNISHI, Y. & HORINOUCI, S. 2011. Control of aerial mycelium formation by the BldK oligopeptide ABC transporter in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett*, 315, 54-62.
- AKHTAR, S., PAREDES-SABJA, D. & SARKER, M. R. 2008. Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiol*, 25, 802-8.
- 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*. *Mol Microbiol*, 39, 553-66.
- APARICIO, J. F., COLINA, A. J., CEBALLOS, E. & MARTIN, J. F. 1999. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J Biol Chem*, 274, 10133-9.
- BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., MEIER-KOLTHOFF, J. P., KLENK, H. P., CLEMENT, C., OUHDOUCH, Y. & VAN WEZEL, G. P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 1-43.
- BARREIRO, C. & MARTINEZ-CASTRO, M. 2019. Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103, 1643-1658.
- BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDENO-TARRAGA, A. M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N. R., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H., HARPER, D., BATEMAN, A., BROWN, S., CHANDRA, G., CHEN, C. W., COLLINS, M., CRONIN, A., FRASER, A., GOBLE, A., HIDALGO, J., HORNSBY, T., HOWARTH, S., HUANG, C. H., KIESER, T., LARKE, L., MURPHY, L., OLIVER, K., O'NEIL, S., RABBINOWITSCH, E., RAJANDREAM, M. A., RUTHERFORD, K., RUTTER, S., SEEGER, K., SAUNDERS, D., SHARP, S., SQUARES, R., SQUARES, S., TAYLOR, K., WARREN, T., WIETZORREK, A., WOODWARD, J., BARRELL, B. G., PARKHILL, J. & HOPWOOD, D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-7.
- 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, 4606-16.
- BIGNELL, D. R., FYANS, J. K. & CHENG, Z. 2014. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *J Appl Microbiol*, 116, 223-35.
- 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), 2161-73.
- BILYK, B., WEBER, S., MYRONOVSKIY, M., BILYK, O., PETZKE, L. & LUZHETSKYY, A. 2013. In vivo random mutagenesis of streptomycetes using mariner-based transposon Himar1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 351-9.
- BIMBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513-1523.
- BLANCO, J., COQUE, J. J. & MARTIN, J. F. 1998. The folate branch of the methionine biosynthesis pathway in *Streptomyces lividans*: disruption of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene leads to methionine auxotrophy. *J Bacteriol*, 180, 1586-91.



## VII. REFERENCIAS

---

- BOBEK, J., SMIDOVA, K. & CIHAK, M. 2017. A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 8, 2205.
- 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, 248-54.
- BRAUN, R. E., O'DAY, K. & WRIGHT, A. 1985. Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell*, 40, 159-169.
- BROWN, M. R. & KORNBERG, A. 2008. The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem Sci*, 33, 284-90.
- BURGER, A., SICHLER, K., KELEMEN, G., BUTTNER, M. & WOHLLEBEN, W. 2000. Identification and characterization of the *mre* gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet*, 263, 1053-60.
- BURTON, K. 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 62, 315-23.
- BUSH, M. J., GALLAGHER, K. A., CHANDRA, G., FINDLAY, K. C. & SCHLIMPERT, S. 2022. Hyphal compartmentalization and sporulation in *Streptomyces* require the conserved cell division protein SepX. *Nat Commun*, 13, 71.
- BYSTRYKH, L. V., FERNANDEZ-MORENO, M. A., HERREMA, J. K., MALPARTIDA, F., HOPWOOD, D. A. & DIJKHUIZEN, L. 1996. Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 178, 2238-44.
- CAPSTICK, D. S., WILLEY, J. M., BUTTNER, M. J. & ELLIOT, M. A. 2007. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 64, 602-613.
- CASTAÑO, A., PROSENKOV, A., BARAGAÑO, D., OTAEGUI, N., SASTRE, H., RODRÍGUEZ-VALDÉS, E., GALLEGO, J. L. R. & PELÁEZ, A. I. 2021. Effects of in situ remediation with nanoscale zero valence iron on the physicochemical conditions and bacterial communities of groundwater contaminated with arsenic. *Frontiers in microbiology*, 12, 580.
- CHAKRABURTTY, R., WHITE, J., TAKANO, E. & BIBB, M. 1996. Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 19, 357-368.
- CHAMPNESS, W. C. 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J Bacteriol*, 170, 1168-74.
- 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.
- CHATER, K. 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 72, 9-28.
- CHATER, K. F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial development*, 89-115.
- CHATER, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual review of microbiology*, 47(1), 685-711.
- CHATER, K. F., BIRO, S., LEE, K. J., PALMER, T. & SCHREMPF, H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 171-98.

## VII. REFERENCIAS

---

- CHON, J., STOVER, P. J. & FIELD, M. S. 2017. Targeting nuclear thymidylate biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 53, 48-56.
- CHOUAYEKH, H. & VIROLLE, M. J. 2002. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol*, 43, 919-30.
- CIHAK, M., KAMENIK, Z., SMIDOVA, K., BERGMAN, N., BENADA, O., KOFRONOVA, O., PETRICKOVA, K. & BOBEK, J. 2017. Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Front Microbiol*, 8, 2495.
- CLAESSEN, D., DE JONG, W., DIJKHUIZEN, L. & WOSTEN, H. A. 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol*, 14, 313-9.
- CLAESSEN, D., RINK, R., DE JONG, W., SIEBRING, J., DE VREUGD, P., BOERSMA, F. G., DIJKHUIZEN, L. & WOSTEN, H. A. 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev*, 17, 1714-26.
- COMBES, P., TILL, R., BEE, S. & SMITH, M. C. 2002. The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system. *J Bacteriol*, 184, 5746-52.
- CORTE RODRIGUEZ, M., ALVAREZ-FERNANDEZ GARCIA, R., BLANCO, E., BETTMER, J. & MONTES-BAYON, M. 2017. Quantitative Evaluation of Cisplatin Uptake in Sensitive and Resistant Individual Cells by Single-Cell ICP-MS (SC-ICP-MS). *Anal Chem*, 89, 11491-11497.
- COWAN, A. E., KOPPEL, D. E., SETLOW, B. & SETLOW, P. 2003. A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4209-4214.
- DALTON, K. A., THIBESSARD, A., HUNTER, J. I. & KELEMEN, G. H. 2007. A novel compartment, the 'subapical stem' of the aerial hyphae, is the location of a sigN-dependent, developmentally distinct transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 64, 719-37.
- 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. *Mol Microbiol*, 4, 1679-91.
- DE JONG, W., MANTECA, A., SANCHEZ, J., BUCCA, G., SMITH, C. P., DIJKHUIZEN, L., CLAESSEN, D. & WOSTEN, H. A. 2009. NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 71, 1591-603.
- DEN BLAAUWEN, T., HAMOEN, L. W. & LEVIN, P. A. 2017. The divisome at 25: the road ahead. *Curr Opin Microbiol*, 36, 85-94.
- 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.
- DÍAZ, M., ESTEBAN, A., FERNANDEZ-ABALOS, J. M. & SANTAMARÍA, R. I. 2005. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*, 151, 2583-2592.
- DIAZ, M., SEVILLANO, L., RICO, S., LOMBO, F., BRANA, A. F., SALAS, J. A., MENDEZ, C. & SANTAMARIA, R. I. 2013. High level of antibiotic production in a double polyphosphate

## VII. REFERENCIAS

---

- kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiol Lett*, 342, 123-9.
- ELLIOT, M. A. & FLÄRDH, K. 2012. Streptomycete Spores. *eLS*.
- ENGELBERG-KULKA, H., AMITAI, S., KOLODKIN-GAL, I. & HAZAN, R. 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet*, 2, e135.
- FEITELSON, J. S., MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D. A. 1985. Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol*, 131, 2431-41.
- FERNANDEZ, E., WEISSBACH, U., SANCHEZ REILLO, C., BRANA, A. F., MENDEZ, C., ROHR, J. & SALAS, J. A. 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, 4929-37.
- FLARDH, K. & BUTTNER, M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 7, 36-49.
- FLARDH, 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, 737-43.
- FLETT, F., MERSINIAS, V. & SMITH, C. P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 223-9.
- GHORBEL, S., SMIRNOV, A., CHOUAYEKH, H., SPERANDIO, B., ESNAULT, C., KORMANEC, J. & VIROLLE, M. J. 2006. Regulation of *ppk* expression and in vivo function of *Ppk* in *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol*, 188, 6269-76.
- GONZALEZ-QUINONEZ, N., CORTE-RODRIGUEZ, M., ALVAREZ-FERNANDEZ-GARCIA, R., RIOSEAS, B., LOPEZ-GARCIA, M. T., FERNANDEZ-GARCIA, G., MONTES-BAYON, M., MANTECA, A. & YAGUE, P. 2019. Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep*, 9, 4214.
- GONZALEZ-QUINONEZ, N., LOPEZ-GARCIA, M. T., YAGUE, P., RIOSEAS, B., PISCIOTTA, A., ALDUINA, R. & MANTECA, A. 2016. New *PhiBT1* site-specific integrative vectors with neutral phenotype in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 2797-808.
- GRAMAJO, H. C., TAKANO, E. & BIBB, M. J. 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol*, 7, 837-45.
- GREGORY, M. A., TILL, R. & SMITH, M. C. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage *phiBT1* and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol*, 185, 5320-3.
- 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.
- HAISER, H. J., YOUSEF, M. R. & ELLIOT, M. A. 2009. Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 191, 6501-12.
- HAMAGISHI, Y., TONE, H., OKI, T. & INUI, T. 1980. Effect of adenosine-5'-triphosphate-3'-diphosphate and related nucleoside polyphosphates on the spore germination of *Streptomyces galilaeus*. *Arch Microbiol*, 125, 285-9.

## VII. REFERENCIAS

---

- HANAHAN, D., JESSEE, J. & BLOOM, F. R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, 204, 63-113.
- 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, 203-14.
- 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.
- HIRSCH, C. & ENSIGN, J. 1976. Nutritionally defined conditions for germination of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *Journal of Bacteriology*, 126, 13-23.
- HODGSON, D. A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in microbial physiology*, 42, 47-238.
- HOPWOOD, D. A. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet*, 40, 1-23.
- HOPWOOD, D. A. 2007. *Streptomyces in nature and medicine : the antibiotic makers*, New York ; Oxford, Oxford University Press.
- 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, 716-28.
- ISHIYAMA, G., FINN, M., LOPEZ, I., TANG, Y., BALOH, R. W. & ISHIYAMA, A. 2005. Unbiased quantification of Scarpa's ganglion neurons in aminoglycoside ototoxicity. *J Vestib Res*, 15, 197-202.
- JAKIMOWICZ, D. & VAN WEZEL, G. P. 2012. Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Mol Microbiol*, 85, 393-404.
- JEONG, Y., KIM, J. N., KIM, M. W., BUCCA, G., CHO, S., YOON, Y. J., KIM, B. G., ROE, J. H., KIM, S. C., SMITH, C. P. & CHO, B. K. 2016. The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat Commun*, 7, 11605.
- JIANG, J., HE, X. & CANE, D. E. 2007. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat Chem Biol*, 3, 711-5.
- JONES, S. E. & ELLIOT, M. A. 2018. 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Curr Opin Microbiol*, 42, 25-30.
- KACZANOWSKI, S. 2016. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, 13, 031001.
- 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.
- KAPADIA, M., ROLSTON, K. V. & HAN, X. Y. 2007. Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Am J Clin Pathol*, 127, 619-24.
- 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), 1077-86.

## VII. REFERENCIAS

---

- 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, 4420-9.
- 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.
- KIESER, T. 2000. *Practical streptomyces genetics*, Norwich, John Innes Foundation.
- KIM, D. J., HUH, J. H., YANG, Y. Y., KANG, C. M., LEE, I. H., HYUN, C. G., HONG, S. K. & SUH, J. W. 2003. Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J Bacteriol*, 185, 592-600.
- 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, 1313-20.
- KIM, S. H., LEE, B. R., KIM, J. N. & KIM, B. G. 2012. NdgR, a common transcriptional activator for methionine and leucine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 194, 6837-46.
- KODANI, S., HUDSON, M. E., DURRANT, M. C., BUTTNER, M. J., NODWELL, J. R. & WILLEY, J. M. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 11448-11453.
- 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). *Mol Genet Genomics*, 267, 536-43.
- LAW, J. W.-F., PUSPARAJAH, P., AB MUTALIB, N.-S., WONG, S. H., GOH, B.-H. & LEE, L.-H. 2019. A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 2.
- LEBKOWSKI, T., WOLANSKI, M., OLDZIEJ, S., FLARDH, K. & ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. 2020. AfsK-Mediated Site-Specific Phosphorylation Regulates DnaA Initiator Protein Activity in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 202.
- LEDUC, D., GRAZIANI, S., MESLET-CLADIERE, L., SODOLESCU, A., LIEBL, U. & MYLLYKALLIO, H. 2004. Two distinct pathways for thymidylate (dTMP) synthesis in (hyper)thermophilic Bacteria and Archaea. *Biochem Soc Trans*, 32, 231-5.
- LEE, N., KIM, W., HWANG, S., LEE, Y., CHO, S., PALSSON, B. & CHO, B. K. 2020. Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Sci Data*, 7, 55.
- LI, Q., CHEN, X., JIANG, Y. & JIANG, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*.
- 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*. *Scientific reports*, 5, 1-11.
- LØBNER-OLESEN, A., SKARSTAD, K., HANSEN, F. G., VON MEYENBURG, K. & BOYE, E. 1989. The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell*, 57, 881-889.
- LU, Y., WANG, W., SHU, D., ZHANG, W., CHEN, L., QIN, Z., YANG, S. & JIANG, W. 2007. Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation

## VII. REFERENCIAS

---

- of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology*, 77, 625-635.
- 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, 61-8.
- MAIER, S. K., SCHERER, S. & LOESSNER, M. J. 1999. Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Applied and environmental microbiology*, 65, 3942-3949.
- MANTECA, A., ALVAREZ, R., SALAZAR, N., YAGUE, P. & SANCHEZ, J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3877-86.
- 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 microbiology letters*, 274, 118-125.
- 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 (Reading)*, 151, 3689-3697.
- 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.
- 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, 143-52.
- MANTECA, A. & SANCHEZ, J. 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2920-4.
- MANTECA, A. & YAGUE, P. 2018. *Streptomyces* Differentiation in Liquid Cultures as a Trigger of Secondary Metabolism. *Antibiotics (Basel)*, 7.
- MARTIN, J. F. & LIRAS, P. 2019. The Balance Metabolism Safety Net: Integration of Stress Signals by Interacting Transcriptional Factors in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *Front Microbiol*, 10, 3120.
- MARTIN, J. F. & LIRAS, P. 2021. Molecular Mechanisms of Phosphate Sensing, Transport and Signalling in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *Int J Mol Sci*, 22.
- MARTIN, J. F., SANTOS-BENEIT, F., RODRIGUEZ-GARCIA, A., SOLA-LANDA, A., SMITH, M. C., ELLINGSEN, T. E., NIESELT, K., BURROUGHS, N. J. & WELLINGTON, E. M. 2012. Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95, 61-75.
- MCBRIDE, M. J. & ENSIGN, J. 1987. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of bacteriology*, 169, 4995-5001.
- MCCORMICK, J. R. & FLARDH, K. 2012. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev*, 36, 206-31.
- MIGUÉLEZ, 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. *The Journal of cell biology*, 145, 515-525.

## VII. REFERENCIAS

---

- MILLAN-OROPEZA, A., HENRY, C., LEJEUNE, C., DAVID, M. & VIROLLE, M. J. 2020. Expression of genes of the Pho regulon is altered in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep*, 10, 8492.
- MILLMAN, A., DAR, D., SHAMIR, M. & SOREK, R. 2017. Computational prediction of regulatory, premature transcription termination in bacteria. *Nucleic Acids Res*, 45, 886-893.
- MOLLE, V. & BUTTNER, M. J. 2000. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Mol Microbiol*, 36, 1265-78.
- MONAHAN, L. G., LIEW, A. T., BOTTOMLEY, A. L. & HARRY, E. J. 2014. Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. *Front Microbiol*, 5, 19.
- MUELLER, J. H. 1922. A new sulphur-containing amino acid isolated from casein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 19, 161-163.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 20366-20375.
- 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.
- NOVELLA, I. S., BARBES, C. & SANCHEZ, J. 1992. Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can J Microbiol*, 38, 769-73.
- 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.
- ONAKA, H. 2017. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*, 70, 865-870.
- ONAKA, H., NAKAGAWA, T. & HORINOUCI, S. 1998. Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Mol Microbiol*, 28, 743-53.
- 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, 2158-65.
- PAGET, M. S., CHAMBERLIN, L., ATRI, A., FOSTER, S. J. & BUTTNER, M. J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 181, 204-11.
- PARK, S. S., YANG, Y. H., SONG, E., KIM, E. J., KIM, W. S., SOHNG, J. K. & ... & KIM, B. G. 2009. Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 1073-1083.
- PARK, U. 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.
- PARTE, A., WHITMAN, W. B., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M. E., LUDWIG, W. & SUZUKI, K.-I. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria*, Springer Science & Business Media.

## VII. REFERENCIAS

---

- PASSOT, F. M., CANTLAY, S. & FLÄRDH, K. 2022. Protein phosphatase SppA regulates apical growth and dephosphorylates cell polarity determinant DivIVA in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 117, 411-428.
- 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.
- PEREZ-REDONDO, R., SANTAMARTA, I., BOVENBERG, R., MARTIN, J. F. & LIRAS, P. 2010. The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology (Reading)*, 156, 1527-1537.
- PETZKE, L. & LUZHETSKYY, A. 2009. In vivo Tn5-based transposon mutagenesis of *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83, 979-86.
- 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.
- PROCOPIO, R. E., SILVA, I. R., MARTINS, M. K., AZEVEDO, J. L. & ARAUJO, J. M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*, 16, 466-71.
- RAJA, A., & PRABAKARANA, P 2011. Actinomycetes and drug-an overview. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(2), 75-84.
- RAMOS-LEON, F., BUSH, M. J., SALLMEN, J. W., CHANDRA, G., RICHARDSON, J., FINDLAY, K. C., MCCORMICK, J. R. & SCHLIMPERT, S. 2021. A conserved cell division protein directly regulates FtsZ dynamics in filamentous and unicellular actinobacteria. *Elife*, 10.
- RIGALI, S., NOTHAFT, H., NOENS, E. E., SCHLICHT, M., COLSON, S., MÜLLER, M. & ... & VAN WEZEL, G. P. 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.
- RIOSEAS, B., LOPEZ-GARCIA, M. T., YAGUE, P., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 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. *Bioresour Technol*, 151, 191-8.
- RIOSEAS, B., YAGUE, P., LOPEZ-GARCIA, M. T., GONZALEZ-QUINONEZ, N., BINDA, E., MARINELLI, F. & MANTECA, A. 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.
- RÜDIGER, H. & JAENICKE, L. 1973. The biosynthesis of methionine. *Molecular and cellular biochemistry*, 1, 157-168.
- RUTLEDGE, R. G. & COTE, C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*, 31, e93.
- SAINT-GIRONS, I., PARSOT, C., ZAKIN, M. M., BARZU, O. & COHEN, G. N. 1988. Methionine biosynthesis in Enterobacteriaceae: biochemical, regulatory, and evolutionary aspects. *CRC Crit Rev Biochem*, 23 Suppl 1, S1-42.
- SAITO, N., XU, J., HOSAKA, T., OKAMOTO, S., AOKI, H., BIBB, M. J. & OCHI, K. 2006. EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 188, 4952-61.



## VII. REFERENCIAS

---

- 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, 1316-23.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHEZ, C., BUTOVICH, I. A., BRANA, A. F., ROHR, J., MENDEZ, C. & SALAS, J. A. 2002. The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol*, 9, 519-31.
- SANTOS-BENEIT, F., RODRIGUEZ-GARCIA, A., FRANCO-DOMINGUEZ, E. & MARTIN, J. F. 2008. Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology (Reading)*, 154, 2356-2370.
- 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. *Mol Microbiol*, 72, 53-68.
- SAXENA, R., FINGLAND, N., PATIL, D., SHARMA, A. K. & CROOKE, E. 2013a. Crosstalk between DnaA Protein, the Initiator of *Escherichia coli* Chromosomal Replication, and Acidic Phospholipids Present in Bacterial Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8517-8537.
- SAXENA, R., FINGLAND, N., PATIL, D., SHARMA, A. K. & CROOKE, E. 2013b. Crosstalk between DnaA protein, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, and acidic phospholipids present in bacterial membranes. *Int J Mol Sci*, 14, 8517-37.
- SCHATZ, A. & WAKSMAN, S. A. 1944. Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57, 244-248.
- SCHLIMPERT, S., WASSERSTROM, S., CHANDRA, G., BIBB, M. J., FINDLAY, K. C., FLÄRDH, K. & BUTTNER, M. J. 2017a. Two dynamin-like proteins stabilize FtsZ rings during *Streptomyces* sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6176-E6183.
- SCHLIMPERT, S., WASSERSTROM, S., CHANDRA, G., BIBB, M. J., FINDLAY, K. C., FLÄRDH, K. & BUTTNER, M. J. 2017b. Two dynamin-like proteins stabilize FtsZ rings during *Streptomyces* sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E6176-E6183.
- SCHMIDT, U., WEIGERT, M., BROADDUS, C. & MYERS, G. Cell detection with star-convex polygons. International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, 2018. Springer, 265-273.
- SCHWEDOCK, J., MCCORMICK, J., ANGERT, E., NODWELL, J. & LOSICK, R. 1997. Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 25, 847-858.
- SEDIVY, E. L. 2020. *Regulation of DnaA as a transcription factor by modulation of cooperative binding, and by arrA, an antisense RNA*. Massachusetts Institute of Technology.
- SEIPKE, R. F., KALTENPOTH, M. & HUTCHINGS, M. I. 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev*, 36, 862-76.
- SHANER, N. C., CAMPBELL, R. E., STEINBACH, P. A., GIEPMANS, B. N., PALMER, A. E. & TSIEN, R. Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22, 1567-72.

## VII. REFERENCIAS

---

- SHETTY, S. & VARSHNEY, U. 2020. Regulation of translation by one-carbon metabolism in bacteria and eukaryotic organelles. *J Biol Chem*, 296, 100088.
- SHU, D., CHEN, L., WANG, W., YU, Z., REN, C., ZHANG, W. & ... & JIANG, W. 2009. afsQ1-Q2-sigQ is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 1149.
- SOLA-LANDA, A., MOURA, R. S. & MARTIN, J. F. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6133-8.
- STEINIGER, M., METZLER, J. & REZNIKOFF, W. S. 2006. Mutation of Tn 5 Transposase  $\beta$ -Loop Residues Affects All Steps of Tn 5 Transposition: The Role of Conformational Changes in Tn 5 Transposition. *Biochemistry*, 45, 15552-15562.
- STRAKOVA, E., BOBEK, J., ZIKOVA, A., REHULKA, P., BENADA, O., REHULKOVA, H., KOFRONOVA, O. & VOHRADSKY, J. 2013a. Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *J Proteome Res*, 12, 525-36.
- STRAKOVA, E., BOBEK, J., ZIKOVA, A. & VOHRADSKY, J. 2013b. Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. *PLoS One*, 8, e72842.
- 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, 3488-98.
- SÜSSTRUNK, U., PIDOUX, J., TAUBERT, S., ULLMANN, A. & THOMPSON, C. J. 1998. Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 30, 33-46.
- ŚWIĄTEK, M. A., GUBBENS, J., BUCCA, G., SONG, E., YANG, Y.-H., LAING, E., KIM, B.-G., SMITH, C. P. & VAN WEZEL, G. P. 2013. The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 195, 1236-1248.
- TAKANO, E., TAO, M., LONG, F., BIBB, M. J., WANG, L., LI, W., BUTTNER, M. J., BIBB, M. J., DENG, Z. X. & CHATER, K. F. 2003. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 50, 475-86.
- TONG, Y., CHARUSANTI, P., ZHANG, L., WEBER, T. & LEE, S. Y. 2015. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol*, 4, 1020-9.
- TORRIANI, A. 1990. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays*, 12, 371-376.
- 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 (Tokyo)*, 38, 128-31.
- 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*. *Mol Microbiol*, 58, 131-50.
- VAN WEZEL, G. P. & MCDOWALL, K. J. 2011. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep*, 28, 1311-33.
- WALSH, C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol*, 1, 65-70.

## VII. REFERENCIAS

---

- WANG, C., GE, H., DONG, H., ZHU, C., LI, Y., ZHENG, J. & CEN, P. 2007. A novel pair of two-component signal transduction system *ecrE 1/ecrE 2* regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Biologia* 62, 511-516.
- WILLEMSE, J. & VAN WEZEL, G. P. 2009. Imaging of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with reduced autofluorescence reveals a novel stage of FtsZ localization. *PLoS One*, 4, e4242.
- WOLANSKI, M., JAKIMOWICZ, D. & ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. 2012. AdpA, key regulator for morphological differentiation regulates bacterial chromosome replication. *Open Biol*, 2, 120097.
- XU, Z., WANG, Y., CHATER, K. F., OU, H. Y., XU, H. H., DENG, Z. & TAO, M. 2017. Large-Scale Transposition Mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* Identifies Hundreds of Genes Influencing Antibiotic Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 83.
- YAGUE, P., LOPEZ-GARCIA, M. T., RIOSEAS, 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.
- YAGÜE, P., MANTECA, A., SIMON, A., DIAZ-GARCIA, M. E. & SANCHEZ, J. 2010. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Applied and environmental microbiology*, 76, 3401-3404.
- YAGUE, P., RODRIGUEZ-GARCIA, A., LOPEZ-GARCIA, M. T., MARTIN, J. F., RIOSEAS, B., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 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.
- YAGUE, P., RODRIGUEZ-GARCIA, A., LOPEZ-GARCIA, M. T., RIOSEAS, B., MARTIN, J. F., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 2014. Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PLoS One*, 9, e86296.
- YAGUE, P., WILLEMSE, J., KONING, R. I., RIOSEAS, B., LOPEZ-GARCIA, M. T., GONZALEZ-QUINONEZ, N., LOPEZ-IGLESIAS, C., SHLIAHA, P. V., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A., KOSTER, A. J., JENSEN, O. N., VAN WEZEL, G. P. & MANTECA, A. 2016. Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces* hyphae. *Nat Commun*, 7, 12467.
- YANG, Y. H., SONG, E., KIM, J. N., LEE, B. R., KIM, E. J., PARK, S. H. & ... & KIM, Y. G. 2012. Characterization of a new ScbR-like  $\gamma$ -butyrolactone binding regulator (SlbR) in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 113-121.
- ZAWILAK-PAWLIK, A., NOWACZYK, M. & ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. 2017a. The Role of the N-Terminal Domains of Bacterial Initiator DnaA in the Assembly and Regulation of the Bacterial Replication Initiation Complex. *Genes (Basel)*, 8.
- ZAWILAK-PAWLIK, A., NOWACZYK, M. & ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA, J. 2017b. The Role of the N-Terminal Domains of Bacterial Initiator DnaA in the Assembly and Regulation of the Bacterial Replication Initiation Complex. *Genes*, 8, 136.
- 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.

## VII. REFERENCIAS

---

- ZHANG, L., WILLEMSE, J., CLAESSEN, D. & VAN WEZEL, G. P. 2016. SepG coordinates sporulation-specific cell division and nucleoid organization in *Streptomyces coelicolor*. *Open Biol*, 6, 150164.
- ZHANG, X., BAO, Y., SHI, X., OU, X., ZHOU, P. & DING, X. 2012. Efficient transposition of IS204-derived plasmids in *Streptomyces coelicolor*. *J Microbiol Methods*, 88, 67-72.