



INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA
(USAL/CSIC)

TESIS DOCTORAL

MEJORA GENÉTICA DE CEPAS DE
Streptomyces coelicolor PARA LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE EL
ESTUDIO DE SU REGULACIÓN POR SISTEMAS DE
DOS COMPONENTES

Sergio Antoraz Martín

Salamanca, 2018

La presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro de investigación mixto de la Universidad de Salamanca y el CSIC, gracias al apoyo económico por parte de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo con la concesión de una beca predoctoral (ORDEN EDU/310/2015), y a través de los proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (Mineco) (PCIN-2014-067, convocatoria ERA-IB2, y BIO2015-66958-R).

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

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**Mejora genética de cepas de *Streptomyces coelicolor* para la producción de metabolitos secundarios mediante el estudio de su regulación por Sistemas de Dos Componentes.**”, presentada por D. Sergio Antoraz Martín para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (USAL/CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extienden el presente certificado en Salamanca, a 20 de Julio de 2018.

Fdo: Dr. Ramón Santamaría Sánchez

Dra. Margarita Díaz Martínez

Dr. Francisco Justo del Rey Iglesias, Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “**Mejora genética de cepas de *Streptomyces coelicolor* para la producción de metabolitos secundarios mediante el estudio de su regulación por Sistemas de Dos Componentes.**”, presentada por D. Sergio Antoraz Martín para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ramón Santamaría Sánchez y de la Dra. Margarita Díaz Martínez en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (USAL/CSIC).

Y para que así conste, expide este certificado en Salamanca, a 20 de Julio de 2018.

Fdo. Dr. Francisco Justo del Rey Iglesias

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. EL GÉNERO <i>Streptomyces</i>	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Organización genómica	4
1.3 Ciclo biológico	7
2. METABOLISMO SECUNDARIO	9
2.1 Generalidades	9
2.2 Producción y mejora de metabolitos secundarios	11
2.3 Regulación del metabolismo secundario	15
2.3.1 Metabolitos secundarios en <i>S. coelicolor</i>	15
2.3.2 Regulación del metabolismo secundario	18
2.3.2.1 Regulación específica	19
2.3.2.2 Regulación global	21
3. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES	22
3.1 Generalidades	22
3.2 Arquitectura	23
3.3 Mecanismo de acción	26
3.4 TCS en <i>S. coelicolor</i>	29
4. ANTECEDENTES	34
4.1 Sistemas de dos componentes estudiados en nuestro grupo	34
4.1.1 AbrA	34
4.1.2 AbrB	35
4.1.3 AbrC	36
4.1.4 Aor1	37
4.2 Producción heteróloga de antibióticos y antitumorales	38
4.2.1 Compuestos	39
4.2.2 Producción heteróloga en mutantes de <i>S. coelicolor</i>	42
OBJETIVOS	45
RESULTADOS	49
1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTIBIÓTICOS Y	

ANTITUMORALES	51
1.1 Empleo de las cepas M1146 y M1154	51
1.2 Producción heteróloga en las cepas M1146 y M1154	54
1.3 Construcción de una batería de mutantes en TCS con el sistema CRISPR/Cas9 sobre las cepas M145, M1146 y M1154	57
1.4 Producción heteróloga en mutantes múltiples de TCS	65
2. COMPARATIVA DE CEPAS SILVESTRES	73
2.1 Diferencias fenotípicas entre las cepas M145-uSAL y M145-2011	73
2.2 Secuenciación y análisis de diferencias genéticas	75
3. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LA CEPA MUTANTE <i>ΔabrA</i> Y LA PARENTAL M145-uSAL	83
3.1 Condiciones del ensayo de RNA-Seq y fenotipos de las muestras analizadas	83
3.2 Resultados de la secuenciación de los mRNA	85
3.2.1 Genes implicados en el metabolismo secundario	86
3.2.2 Genes que codifican posibles reguladores	89
3.2.3 Genes que codifican proteínas de membrana	91
3.2.4 Otros genes de interés	92
3.3 Conclusiones del analisis comparativo de las cepas <i>ΔabrA</i> y M145 mediante RNA-Seq	94
4. ESTUDIO DEL REGULADOR <i>Aor1</i>	95
4.1 Sobreexpresión del gen <i>aor1</i>	95
4.2. Diferencias de expresión génica entre la cepa mutante <i>Δaor1</i> y la parental M145 mediante RNA-Seq	97
4.2.1 Condiciones del ensayo y fenotipos	97
4.2.2 Genes implicados en el metabolismo secundario	100
4.2.3 Genes que codifican posibles reguladores	103
4.2.4 Genes que codifican proteínas de membrana	106
4.2.5 Otros genes de interés	106
4.2.6 Conclusiones del analisis comparativo de las cepas <i>Δaor1</i> y M145 mediante RNA-seq	108
DISCUSIÓN	109
1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTIBIÓTICOS, UNA APROXIMACIÓN NO EXENTA DE PROBLEMAS	111

2. EFECTO DE DIFERENTES FONDOS GENÉTICOS EN LA CEPA SILVESTRE	115
3. AbrA, UN SISTEMA RELACIONADO CON LA CAPTACIÓN DE HIERRO	119
4. Aor1, UN REGULADOR HUÉRFANO CLAVE PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS	126
5. <i>Streptomyces coelicolor</i> , UN MICROORGANISMO CON UNA GRAN COMPLEJIDAD REGULATORIA	130
CONCLUSIONES	133
MATERIALES Y MÉTODOS	137
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y GENERADOS	139
2. VECTORES UTILIZADOS	140
3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	141
3.1 Medios de cultivo	143
3.2 Aditivos para medios de cultivo	143
3.3 Condiciones de cultivo	143
4. CONSERVACIÓN DE CEPAS	144
5. OBTENCIÓN, MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE DNA	144
5.1 Extracción de DNA genómico de <i>Streptomyces</i>	144
5.2 Extracción de DNA plasmídico y cósmidos de <i>E. coli</i>	145
5.3 Electroforesis en gel de agarosa	145
5.4 Purificación de fragmentos de DNA	145
5.5 Técnicas básicas de ingeniería genética	145
5.6 PCR	145
5.7 qRT-PCR	146
5.8 Oligonucleótidos utilizados	147
6. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS	149
6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	149
6.2 Transformación de <i>Streptomyces</i>	149
6.3 Conjugación interespecífica	149
7. SISTEMA CRISPR-Cas9	150
7.1 Elección y construcción de la secuencia guía	150
7.2 Construcción de la secuencia molde	151

7.3 Transferencia, eliminación del plásmido y comprobación de mutantes	152
8. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS	153
8.1 Ensayos en medio sólido	153
8.2 Bioensayo para la valoración de CDA	153
8.3 Cuantificación en medio líquido	154
9. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	154
10. SECUENCIACIÓN	155
11. RNA-Seq	155
11.1 Aislamiento de RNA	155
11.2 Librería, secuenciación y análisis	156
12. BASES DE DATOS ONLINE	156
BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXOS	Digital

Siglas y abreviaturas

A: Adenina	NGS: Secuenciación de Nueva Generación
ACT: Actinorrodina	Neo: Neomicina
Amp: Ampicilina	NP: Productos naturales
Apra: Apramicina	NRPS: Péptidos No Ribosomales
AU: Unidades de Absorbancia	ORF: Marco de Lectura Abierto
C: Citosina	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
CDA: Antibiótico Dependiente de Calcio	PKS: Poliquétido Sintetasas
ChIP: Inmunoprecipitación de la Cromatina	qRT-PCR: PCR Cuantitativa a Tiempo Real
CPK: Poliquétido Críptico	RED: Undecilprodigosina
CSR: Regulador Situado en el <i>Cluster</i>	RIN: Número de integridad del RNA
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	RNA: Ácido Ribonucleico
FC: <i>Fold Change</i>	rpm: Revoluciones Por Minuto
FDR: Tasa de Falso Descubrimiento	RR: Regulador de Respuesta
G: Guanina	SARP: Proteína Reguladora de Antibióticos de <i>Streptomyces</i>
g: Gramo	SCO: <i>Streptomyces coelicolor</i> ORF
h: Hora	SNP: Polimorfismo de nucleótido simple
HK: Histidina Quinasa	TCS: Sistema de Dos Componentes
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	T: Timina
Indel: Inserción o deleción	Tio: Tioestreptona
kb: Kilobase	°C: Grado Centígrado
kDa: Kilodalton	ε: Coeficiente de extinción molar
L: Litro	
M: Molar	
min: Minuto	

Introducción

1. EL GÉNERO *Streptomyces*

1.1 Generalidades

Las bacterias del género *Streptomyces* son un grupo de microorganismos pertenecientes al filo Actinobacteria, uno de los mayores y más diversos filos de su dominio. El género está compuesto por bacterias Gram positivas con un elevado porcentaje de G+C en su genoma, que puede llegar a ser de hasta un 75%. Presentan un crecimiento filamentososo, con micelios altamente diferenciados que dan lugar a esporas tras un ciclo de vida complejo (Chater and Chandra, 2006). A pesar de esa semejanza con los hongos, los actinomicetos (del griego: *aktis*, rayo, con forma de rayo; y *mûkes*, hongo), como todas las bacterias, presentan su cromosoma organizado en un nucleoide procariótico y una pared de péptidoglicano. Aunque generalmente son considerados aerobios, existen distintas especies que pueden crecer en anaerobiosis (van Keulen et al., 2003).

Se han descrito más de 533 especies hasta la fecha (Kämpfer, 2015), la mayoría de las cuales lleva estilo de vida saprofítico en su hábitat natural, el suelo. Allí sobreviven principalmente descomponiendo restos orgánicos vegetales, fúngicos y de otros organismos, gracias a un amplio arsenal de enzimas extracelulares hidrolíticas que liberan al medio para posteriormente obtener nutrientes. Celulasas, xilanasas y quitinasas son parte de esta considerable variedad secretora, adaptada a las necesidades de los hábitats que colonizan (Chater et al., 2010; Hodgson, 2000).

Así, durante los últimos 400 millones de años en los que actualmente se data este género, se han expandido no sólo por los suelos terrestres sino también por nichos marinos (Raveh et al., 2013), han establecido relaciones mutualistas con plantas (Sardi et al., 1992; Taechowisan et al., 2003), insectos (Agamennone et al., 2018; Jiang et al., 2018; Kaltenpoth, 2009; Seipke et al., 2012), esponjas (Ian et al., 2014; Khan et al., 2011; Selvin et al., 2009) y hongos (Lehr et al., 2009; Schrey and Tarkka, 2008), e incluso en algunos casos actúan como patógenos de plantas (Loria et al., 2008; Loria et al., 2006) y humanos (Quintana et al., 2008). También se ha podido observar recientemente que distintas especies de *Streptomyces* pueden encontrarse en la microbiota de seres humanos, donde podrían tener un papel beneficioso gracias a la producción de compuestos anticancerígenos (Zhou et al., 2017). Así mismo, se han podido aislar especies de *Streptomyces* de muestras de lluvia y granizo (Sarmiento-

Vizcaíno et al., 2018), desiertos (Masand et al., 2018), cuevas (Groth et al., 1999), o distintos monumentos, objetos históricos e incluso pinturas (Abdel-Haliem et al., 2013; Montes Estellés et al., 2004; Strzelczyk, 2004; Suihko et al., 2007).

En cualquier caso, independientemente de su hábitat, *Streptomyces* es un competidor formidable (Chater, 2016; Kumbhar et al., 2014). A la ventaja ecológica que supone producir una enorme diversidad de enzimas que les permiten transformar polímeros insolubles como la celulosa o la quitina en azúcares, hay que añadir además la producción de metabolitos secundarios. Aunque a día de hoy todavía se discute si la función de muchos de ellos es estrictamente la de armas biológicas o si actúan como moléculas de comunicación (Davies and Davies, 2010; Yim et al., 2007), sus actividades antibióticas, herbicidas, inhibidoras enzimáticas o incluso antitumorales, son especialmente valoradas desde un punto de vista humano. (Challis and Hopwood, 2003; Thompson et al., 2002)

1.2 Organización genómica

Las especies del género *Streptomyces* presentan un genoma lineal de gran tamaño, entre 6 y 12 Mb (Ventura et al., 2007). Se sospecha que esta particularidad, que también se da en otras actinobacterias, es resultado de eventos de recombinación homóloga, transposición y translocación de plásmidos (Chen et al., 2002; Volff and Altenbuchner, 2000), que probablemente hayan ocurrido en múltiples ocasiones, divergiendo así de un ancestro común.

Dichos cromosomas, que poseen un elevado contenido en guanina y citosina, presentan dos regiones diferenciadas. Por una parte, en su zona central encontramos un núcleo que oscila entre 4 y 6 Mb y que contiene principalmente genes de *housekeeping* y metabolismo primario relativamente conservados entre especies. En contraste con esto, muestran a su vez dos brazos laterales asimétricos altamente variables entre especies, responsables principalmente de la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas (Bentley et al., 2002; Hopwood, 2006; Ikeda et al., 2003). Estos brazos presentan una mayor inestabilidad que el núcleo, siendo frecuentes las reorganizaciones, deleciones, inserciones o duplicaciones durante la replicación, así como eventos de transferencia horizontal (Dyson, 2011). Esto confiere tanto una gran

diversidad genética como metabólica que permite que estos organismos sean capaces de adaptarse rápidamente a una gran variedad de condiciones.

Existe un único origen de replicación (*oriC*) en el cromosoma lineal, localizado en el centro de la molécula, y desde el cual se lleva a cabo la replicación del DNA (Chang and Cohen, 1994; Musialowski et al., 1994). Los extremos, por su parte, cuentan con unas secuencias cortas invertidas repetidas denominadas TIR (del inglés, *Terminal Inverted Repeats*) que actúan como una especie de telómeros. Dichos telómeros, que además de ser capaces de formar estructuras secundarias pueden tener actividad promotora (Lin et al., 2009), incluyen en sus proximidades inserciones y elementos transponibles (Kieser et al., 2000). Así mismo, en los extremos 5' se unen de forma covalente proteínas terminales denominadas Tpg, que a su vez actúan no sólo protegiendo estas regiones para evitar el acortamiento del cromosoma (Chen, 1996) sino también funcionando como *primers* en la síntesis del fragmento de Okazaki terminal (Bao and Cohen, 2001).

La primera especie en ser secuenciada fue *Streptomyces coelicolor* A3(2), la más representativa del género (www.sanger.ac.uk) (Bentley et al., 2002). En su cromosoma, de 8,7 Mb con un contenido en GC del 72%, podemos encontrar 7825 genes distribuidos tanto por su región central (4,7 Mb) como por sus brazos izquierdo (1,5 Mb) y derecho (2,3 Mb) (Figura I.1). Además, la cepa secuenciada de *S. coelicolor* A3(2) es portadora de tres plásmidos: SCP1 (lineal de 350 kb), SCP2 (30 kb) y SLP1 (integrado en el cromosoma) (Kieser et al., 2000).

Gracias a los últimos avances en secuenciación, en la actualidad se encuentran secuenciados, anotados y publicados los genomas de un total de 95 especies del género (<https://gold.jgi.doe.gov/organisms?page=1&Analysis+Project.Analysis+Project+Type=Genome+Analysis&Project.Project+Status=Complete+and+Published&Organism.Genus=Streptomyces&count=100&setColumns=yes&Organism.Genus=>), número que no deja de crecer. Así, se han podido hacer análisis más exhaustivos para confirmar y acotar muchos de los puntos previamente tratados, como la estimación de qué genes están ampliamente conservados entre especies y cuáles no (Kim et al., 2015).

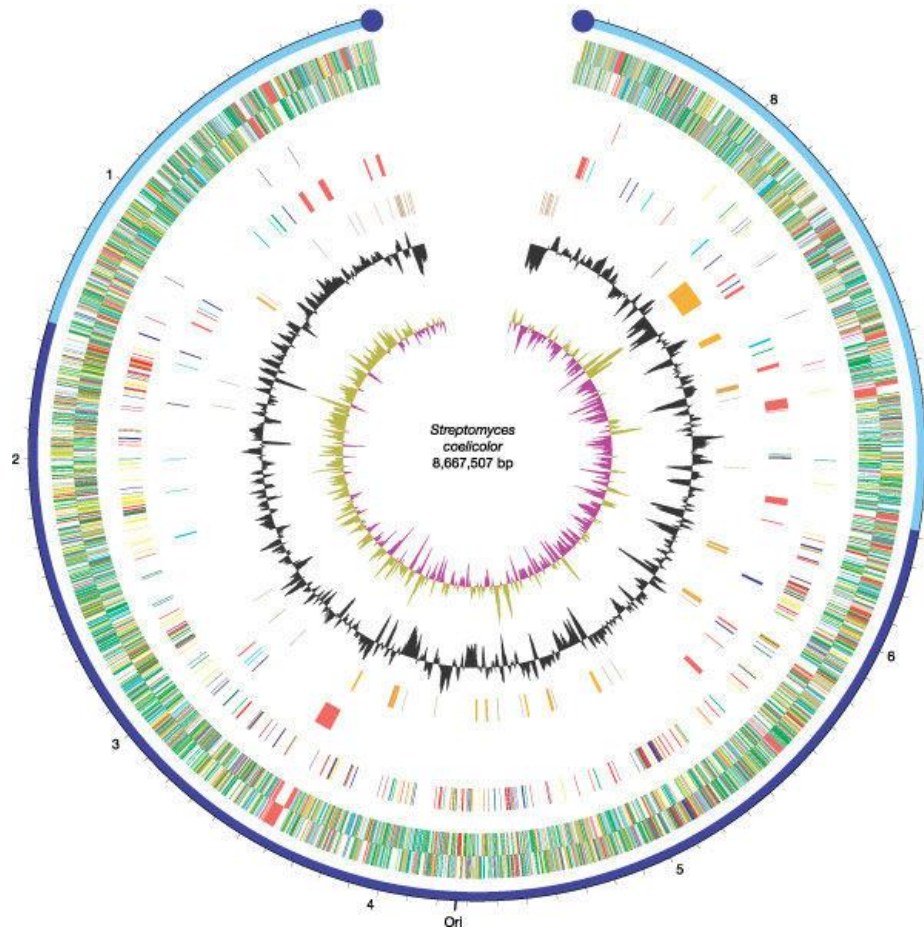


Figura I.1. Representación circular del genoma de *S. coelicolor*. Los números exteriores corresponden al tamaño en Mb, mientras que el color azul oscuro indica la región central y el azul claro los brazos del cromosoma. Los siguientes dos círculos indican los genes en cada cadena en colores según su función; el tercero los genes esenciales; el círculo cuatro los genes de "contingencia"; quinto elementos móviles; sexto porcentaje GC, séptimo GC parcial. (Bentley et al., 2002).

Existen además distintos tipos de elementos extracromosomales. Entre ellos, los más frecuentes son los plásmidos, ya sean lineales o circulares (Kieser et al., 2000; Medema et al., 2010). Estos fragmentos de DNA tienen un origen de replicación propio, así como la maquinaria necesaria para llevarla a cabo. Por ello, su replicación es independiente de la del cromosoma, aunque puede ocurrir de forma análoga en el caso de los lineales (Chang and Cohen, 1994). También portan, en muchos casos, los elementos necesarios para ser transferidos en procesos de conjugación, ya sea intra o interespecífica (Kieser et al., 2000). Además, aunque no es especialmente frecuente, en ocasiones contienen clústeres biosintéticos responsables de la producción de un determinado compuesto, tal y como sucede con el plásmido SCP1 de *S. coelicolor*, que

contiene los genes necesarios para sintetizar metilenomicina (Bentley et al., 2004; Kirby and Hopwood, 1977).

Otros elementos frecuentes en *Streptomyces* son los transposones y los bacteriófagos. Los transposones son secuencias de DNA capaces de moverse de forma autosuficiente a lo largo del genoma, ya sea específicamente o integrándose al azar. En cuanto a los bacteriófagos, existe una gran variedad de ellos, todos con DNA de doble cadena, algunos de los cuales, al igual que los transposones, pueden ser empleados en técnicas de mutagénesis aleatoria (Baltz et al., 1997; Kieser et al., 2000).

El estudio de los genomas secuenciados de *Streptomyces* ha demostrado que los genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, localizados principalmente en los extremos del cromosoma, están casi siempre organizados en agrupaciones génicas denominadas clústeres. Cada genoma de *Streptomyces* tiene de media unas 20 agrupaciones génicas capaces de producir diferentes moléculas, si bien muchas de ellas se consideran crípticas y no se expresan en condiciones normales de laboratorio (Challis, 2008). La presencia de estas agrupaciones génicas crípticas ha suscitado mucho interés en la comunidad científica, dado que multiplica las posibilidades de encontrar nuevos productos de interés farmacéutico utilizando como herramienta las búsquedas genómicas (Aigle et al., 2014; Corre et al., 2008; Medema et al., 2010).

1.3 Ciclo biológico

Streptomyces presenta un ciclo de vida complejo que conlleva diferenciación morfológica (Figura I.2). Dicho ciclo comienza con una espora, que germina cuando las condiciones del medio son favorables aprovechando sus reservas de carbohidratos endógenas (Bobek et al., 2017). Así, comienza a formarse una hifa vegetativa que se va ramificando para dar lugar a un micelio formado por un entramado de hifas. El crecimiento de dichas hifas ocurre de forma apical y no conlleva división celular sino más bien una serie de tabiques que las dividen en compartimentos, cada uno de los cuales alberga varias copias del genoma. Este micelio, que recibe el nombre de micelio vegetativo o micelio sustrato, crece de forma exponencial gracias a los nutrientes que obtiene a partir de la biomasa que encuentra en el sustrato en el cual penetran sus hifas.

INTRODUCCIÓN

Cuando las condiciones se vuelven adversas, como por ejemplo cuando los nutrientes escasean, el micelio vegetativo se diferencia formando el micelio aéreo. Este tipo de micelio difiere del anterior en que está formado por hifas aéreas, un tipo de estructuras esporogénicas hidrófobas, también multigenómicas, que crecen hacia el aire emergiendo sobre el micelio vegetativo, del cual aprovechan los nutrientes que se generan tras la autólisis que se produce en el mismo en un proceso de muerte celular programada (Méndez et al., 1985). Este proceso está coordinado a su vez con la producción de metabolitos secundarios, y tal y como veremos en próximos apartados existen reguladores y cascadas que controlan ambos procesos (Claessen et al., 2006; Chater and Chandra, 2006; Chater and Horinouchi, 2003; van der Heul et al., 2018). Dicha coordinación puede deberse a que, dado que la lisis resulta en la acumulación de aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos alrededor del micelio (Méndez et al., 1985; Miguélez et al., 1999; Wildermuth, 1970), *Streptomyces* necesite defenderse de los competidores que puedan verse inevitablemente atraídos por los nutrientes liberados.

Al cesar el crecimiento del micelio aéreo, éste produce septos de forma sincrónica, los cuales delimitan una única copia del genoma. Tras un proceso de maduración, cada compartimento da lugar a una espora viable durante largos periodos, que será dispersada por distintos medios antes de comenzar de nuevo el ciclo (Chater and Losick, 1997).

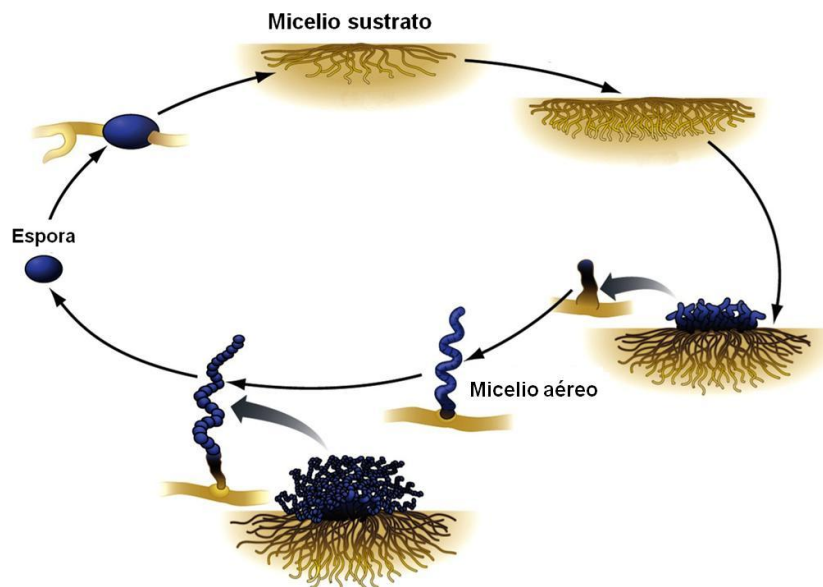


Figura I.2. Representación esquemática del ciclo de vida de *Streptomyces*. Modificado de Slonczewski and Foster, 2009.

Estudios más detallados de este ciclo describen la existencia de dos procesos de muerte celular programada (Figura I.3). El primero tendría lugar en el micelio temprano que se forma tras la germinación de la espора (micelio primario o MI), y que tras esta primera ronda daría lugar a hifas en las que se alternarían segmentos vivos y muertos. A partir de los segmentos viables se desarrollarían hifas multinucleadas que formarían el micelio secundario (MII). Este micelio, considerado la fase reproductora del ciclo, inicialmente sería micelio sustrato que, tras la segunda ronda de muerte celular programada, daría lugar a un micelio aéreo, el cual a su vez iniciaría el proceso de esporulación (Manteca et al., 2007; Manteca and Sánchez, 2009).

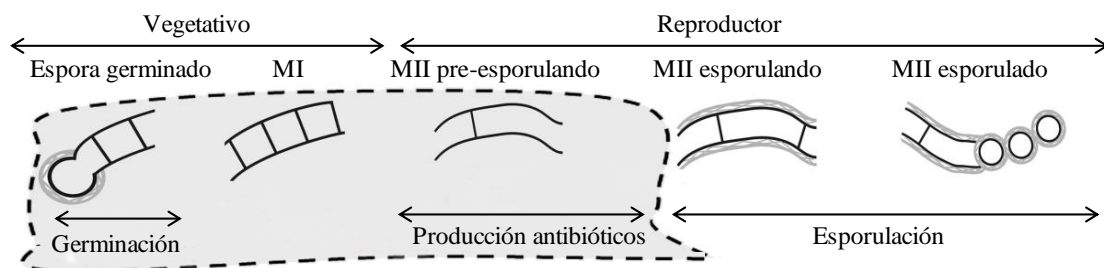


Figura I.3. Ciclo de vida de *Streptomyces* de acuerdo con Manteca et al., 2011.

2. METABOLISMO SECUNDARIO

2.1 Generalidades

A lo largo del ciclo de *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El primario, esencialmente idéntico en todo ser vivo, abarca todo el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas que aseguran el mantenimiento de los procesos vitales de la célula así como el incremento en biomasa (Turner, 1973). Por otra parte, el metabolismo secundario da lugar a productos no esenciales para el organismo productor en las condiciones estudiadas que, sin embargo, confieren ventajas ecológicas y una mayor competitividad (Diminic et al., 2014). En el caso de *Streptomyces*, este metabolismo suele coincidir en el tiempo con el desarrollo morfológico de sus hifas aéreas o con la esporulación, aunque algunos metabolitos secundarios, como la undecilprodigiosina, se producen en etapas muy tempranas del desarrollo coincidiendo en el tiempo con el metabolismo primario (Tenconi et al., 2018).

INTRODUCCIÓN

Las rutas específicas responsables de producir un metabolito secundario son generalmente largas y complejas, dando como resultado productos químicos con estructuras muy diversas que suelen ser específicos de la cepa productora. No obstante, es necesario tener en cuenta que existe una estrecha relación entre el metabolismo secundario y el primario, ya que muchos metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios o los usan de intermediarios. Además, la distinción de unos y otros no siempre está clara, ya que algunos metabolitos secundarios como pueden ser γ -butirolactonas y sideróforos son realmente importantes para el crecimiento y desarrollo del organismo, ya que como hemos dicho anteriormente la síntesis de metabolitos secundarios como los antibióticos se producen en un punto muy concreto del ciclo celular.

Las bacterias del género *Streptomyces* presentan una gran capacidad para producir un inmenso abanico de metabolitos secundarios. Entre ellos encontramos poliquétidos, pironas, péptidos, sideróforos, γ -butirolactonas, butenólidas, furanos, terpenoides, ácidos grasos, oligopirroles y deoxiazúcares, entre otros, cuyas actividades biológicas van desde antibióticos, antivirales, antitumorales, herbicidas, insecticidas o antifúngicos hasta pigmentos y aromas como la geosmina. Comúnmente estos compuestos con actividades diversas son denominados como conjunto productos naturales (NP, del inglés *natural products*). Consideradas factorías microbianas, las distintas especies de *Streptomyces* producen en su conjunto más de dos terceras partes de los NP con actividad biológica que se conocen actualmente (Berdy, 2005; Challis and Hopwood, 2003; Hopwood, 2007; Omura, 1992).

Las ventajas de gran parte de estos metabolitos son indiscutibles, especialmente desde un punto de vista clínico, pero su efecto en la naturaleza muchas veces no está tan claro. No obstante, dado que *Streptomyces* tiene que enfrentarse a multitud de condiciones de estrés tanto físico como químico y biológico que no puede evitar por tratarse de organismos inmóviles, parece poco plausible que los metabolitos secundarios sean simples productos de desecho o elementos neutros. Su sentido biológico y adaptativo se puede apreciar claramente tanto en la adaptación genética para su biosíntesis como en la adaptación del compuesto para interactuar con su diana (Williams et al., 1989).

Aparte de todos los compuestos ya descritos, diversas herramientas informáticas han permitido comprobar que el potencial de este género es enorme. Se ha podido ver que una sola especie de *Streptomyces* puede contener en su genoma más de una veintena

de las agrupaciones génicas encargadas de la producción de un determinado compuesto. La inmensa mayoría de estos hipotéticos productos aún son desconocidos, ya sea porque no se han podido detectar o porque no se producen bajo las condiciones ensayadas, por lo que se denominan clústeres crípticos o silenciados.

Dentro de tal variedad de productos, los antibióticos son uno de los más interesantes. Estos compuestos de bajo peso molecular producidos generalmente por microorganismos son capaces de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos a bajas concentraciones. Por ello se utilizan en investigación, agricultura, ganadería y, sobre todo, en medicina (Demain, 2014).

Este último caso es especialmente importante, ya que una gran mayoría de las enfermedades infecciosas que durante siglos han sido causa de millones de defunciones han podido ser tratadas con antibióticos desde que Fleming descubriera la penicilina. Sin embargo, en la actualidad existe un grave problema con aquellos microorganismos infecciosos que se vuelven resistentes a antibióticos, tales como el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) o la tuberculosis multirresistente (TB-MR) producida por ciertas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Bloemberg et al., 2015; Lin et al., 2015; Mak et al., 2014; McArthur et al., 2013). Aunque este proceso ocurre de forma natural y de hecho fue previsto por el propio Fleming en la misma publicación en la que presentaba el descubrimiento de la penicilina (Fleming, 1929), el uso extensivo y a veces indiscriminado de estos compuestos ha contribuido enormemente a agravar el problema. Por ello en los últimos años se está poniendo especial énfasis en encontrar soluciones, la mayoría de las cuales pasa por ampliar el arsenal de compuestos que sean útiles para combatir esta grave amenaza.

2.2 Producción y mejora de metabolitos secundarios

La búsqueda de nuevas biomoléculas con actividad antibiótica ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar tanto las técnicas para producirlos como las técnicas para detectarlos (Antoraz et al., 2015) (Figura I.4). Estas últimas no pueden ser dejadas de lado, ya que la detección, identificación y elucidación de las estructuras de los diversos compuestos es crucial para descubrir nuevos compuestos de utilidad. Así, a técnicas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) o la espectrofotometría de masas (MS, de *Mass Spectrophotometry*), también se han sumado a esta misión técnicas analíticas como

INTRODUCCIÓN

NanoDESI (*Nanospray Desorption Electrospray Ionization*) o MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) (Fang and Dorrestein, 2014; Hsu and Dorrestein, 2015).

Una de las aproximaciones más extendidas durante las primeras etapas de la búsqueda de antibióticos ha sido la de ir añadiendo microorganismos y moléculas a enormes colecciones para ensayar su posible utilidad mediante protocolos estandarizados para detectar actividades biológicas (*High-Throughput Screening*). A día de hoy, estas prácticas siguen siendo de gran utilidad para descubrir nuevas especies y compuestos, en muchas ocasiones de la mano de iniciativas que pretenden a su vez implicar a la población en el proceso, como la *Small World Initiative* (SWI) (<http://www.smallworldinitiative.org/>), en la cual se ha integrado este año nuestro grupo de investigación.

Muchas de las técnicas que se emplean en los *screenings* de búsqueda de compuestos se basan en la estrategia denominada OSMAC (*One Strain Many Compounds*), que consiste principalmente en modificar las condiciones de cultivo. Así, cambiando parámetros fácilmente modificables e identificables, se pueden generar condiciones más favorables para la síntesis de metabolitos secundarios. Uno de los más evidentes sería ensayar medios con fuentes de carbono que provoquen que, aunque las cepas ensayadas crezcan menos, se active su producción (Sánchez et al., 2010).

También se ha demostrado la efectividad de añadir compuestos que puedan actuar como señales detectables por el organismo en cuestión, que van desde compuestos inorgánicos como tierras raras (escandio, itrio, lantano, cerio, europio) (Kawai et al., 2007) hasta moléculas orgánicas como la N-acetilglucosamina o la celobiosa (Francis et al., 2015; Nazari et al., 2013). Resultan especialmente interesantes aquellos estudios que demuestran cómo la adición al medio de moléculas de comunicación como hormonas bacterianas (γ -butirolactonas (Horinouchi, 2007; Tan et al., 2013), avenolidas (Kitani et al., 2011), furanos de metilenomicina (Corre et al., 2008) o incluso antibióticos (Romero et al., 2011) estimulan la producción de NP. En ocasiones, además, se recurre al co-cultivo de diferentes especies simultáneamente para imitar de forma más fidedigna las condiciones que pueden desencadenar la producción de antibióticos en la naturaleza (Pérez et al., 2011; Traxler et al., 2013), y que no siempre es debida a la detección por parte de la cepa productora de compuestos producidos por las otras especies del co-cultivo sino también a la interacción célula-célula entre las diferentes especies (Onaka et al., 2011). Esta técnica permite incluso

descubrir nuevos compuestos incluso en especies tan estudiadas como *S. coelicolor* (Wu et al., 2017).

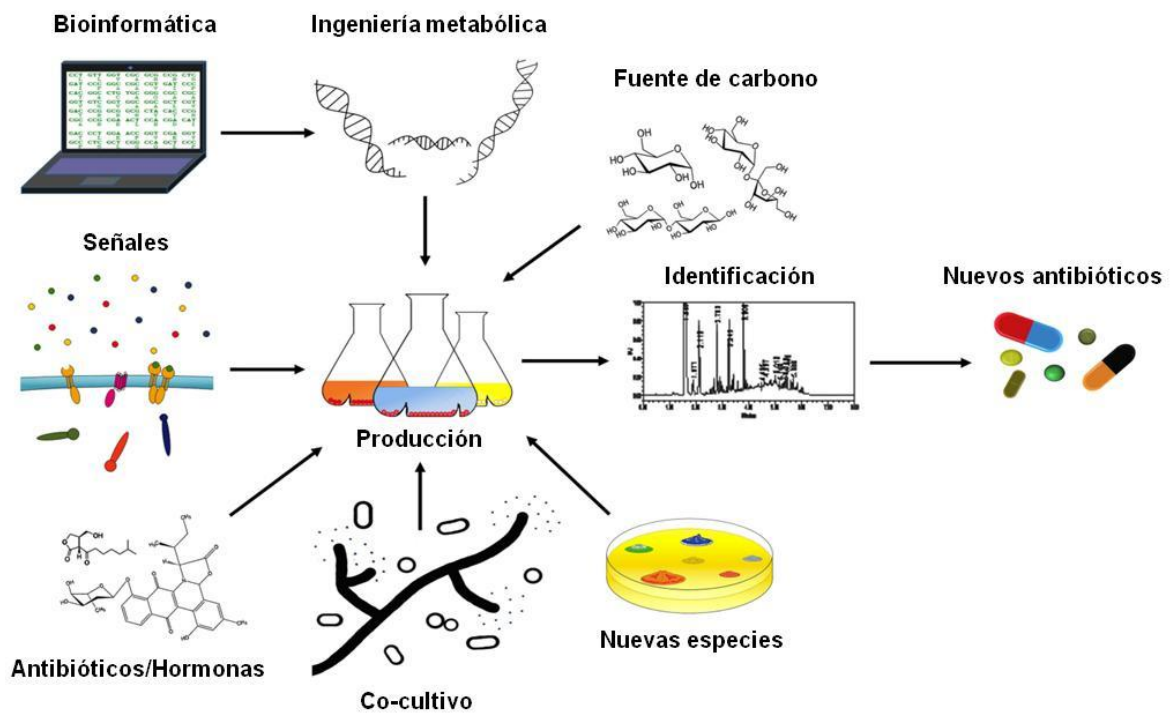


Figura I.4. Métodos para el descubrimiento y la mejora de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Antoraz et al., 2015).

Todas estas aproximaciones, sin embargo, se enfrentan al problema de que apenas profundizan en la comprensión de la biología de dichos microorganismos, los cuales al pertenecer a hábitats tan diversos como los señalados en puntos anteriores, responderán a señales de diversa índole para activar la producción de antibióticos; aquellas condiciones que, siendo claves para el organismo, no se incluyan en el experimento, conllevarán que todos los compuestos cuya producción dependa de las mismas permanezcan crípticos o silenciados.

Cierto es que esta relación entre las distintas especies de *Streptomyces* y su hábitat se está teniendo cada vez más en cuenta. Así, las relaciones ecológicas con otros seres vivos y con su entorno no solo resultan fascinantes y muy útiles para entender la función de muchos compuestos, sino que pueden ser de gran ayuda para producirlos posteriormente en el laboratorio (Behie et al., 2016). En esta línea, una de las técnicas más llamativas a la vez que eficaces surgidas en los últimos años es la del cultivo *in situ* (Ling et al., 2015). Dado que uno de los principales problemas clásicos en la

INTRODUCCIÓN

microbiología era el de aquellas bacterias que no se conseguían crecer en el laboratorio (lo cual no debe ser confundido con aquellos microorganismos que no han sido descubiertos todavía), esta metodología permite crecerlas en su propio ambiente mediante un iChip hasta alcanzar una población suficiente para que su crecimiento sea viable en el laboratorio también.

No obstante, una gran parte del esfuerzo de la comunidad científica se está poniendo en el desarrollo de técnicas y conocimientos moleculares que permitan hacer de esta búsqueda un proceso más dirigido para explotar al máximo este arsenal escondido (Rigali et al., 2018). La bioinformática se ha convertido rápidamente en la herramienta clave sobre la que se asientan todas las aproximaciones de este estilo, ya que los recientes avances permiten conseguir rápidamente más información de la que se ha podido obtener en décadas previas. Así, el número de especies de *Streptomyces* cuyo genoma se ha secuenciado en los últimos años gracias al desarrollo de la NGS (*Next-Generation Sequencing*) ha permitido no sólo corroborar muchas de las deducciones hechas anteriormente, sino también ha sido el factor clave a la hora de determinar el enorme potencial de *Streptomyces*.

El éxito de los programas de predicción e identificación de clústeres de metabolitos secundarios es tan sólo el primer paso que abre multitud de posibilidades en las que introducir técnicas de ingeniería genética (Chaudhary et al., 2013). Así, en muchos casos se puede optar por clonar una ruta cuyo producto permanezca elusivo en la cepa original e introducirla tal cual en otras especies que, en algunos casos, si sean capaces de expresarla en condiciones normales (Bekiesch et al., 2016; Liu et al., 2018a). Esta expresión heteróloga en cepas modelo no sólo consigue muchas veces solucionar el problema, sino que en ocasiones también permite despertar la producción de algunas de las rutas crípticas del huésped (Braña et al., 2014).

Otra aproximación en esta línea es modificar genéticamente la cepa sobre la que queremos producir un compuesto (ya sea suyo o expresado de forma heteróloga) de distintas maneras (Robertsen et al., 2018). La modificación de promotores ha sido una de las más extendidas para hacerlo, permitiendo así que al menos se produzca la transcripción de los genes de interés en aquellos casos donde no se daba previamente (Bekiesch et al., 2016). También se pueden sobreexpresar reguladores transcripcionales positivos o eliminar aquellos que sean negativos para favorecer la transcripción de estas rutas.

En otros niveles, una aproximación que ha resultado ser muy válida ha sido eliminar rutas endógenas que de alguna manera pudieran estar interfiriendo en la producción de otros compuestos o compitiendo por precursores (Gómez-Escribano and Bibb, 2011). Y, desde luego, tampoco se pueden perder de vista todos los pasos post-transcripcionales que intervienen en el proceso. La mutación de ciertas proteínas ribosomales o incluso de subunidades de la RNA polimerasa han demostrado su utilidad en diversas ocasiones (Hu et al., 2002; Shima et al., 1996). Por último, y dada la relación existente entre metabolismo secundario y el primario, alterar este último para generar cepas más adecuadas para la producción de antibióticos promete ser una tarea ardua pero con mucho futuro (Kallifidas et al., 2018; Schniete et al., 2018).

2.3 Regulación del metabolismo secundario

2.3.1 Metabolitos secundarios en *S. coelicolor*

La producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* es un proceso extensamente regulado para que estos se sinteticen en un determinado momento en respuesta a unas determinadas señales tanto internas como externas. Para producir un determinado metabolito se requieren un cierto número de enzimas que, por lo general, se encuentran codificadas por genes agrupados en clústeres. Dichos clústeres, que pueden estar formados por hasta más de una treintena de genes, incluyen a su vez tanto los mecanismos necesarios para su transporte como los de resistencia al compuesto en cuestión siempre que es necesario (en el caso de los antibióticos, por ejemplo), y a menudo uno o más genes que regulan la transcripción del clúster.

En *S. coelicolor*, la especie en la cual se ha realizado este trabajo, se han señalado 30 posibles clústeres de metabolitos secundarios, de los cuales se conocen apenas la mitad (Challis, 2014; Nett et al., 2009). De ellos, los más importantes en labores de investigación son el de la actinorrodina (ACT), la undecilprodigiosina (RED) y el antibiótico dependiente de calcio (CDA) (Bentley et al., 2002). También se han descrito el clúster denominado *cpk*, que produce al menos tres productos metabólicos diferentes conocidos: el abCPK, con actividad antibiótica, y las coelimycinas P1 y P2 (anteriormente denominadas yCPK) (Gómez-Escribano et al., 2012; Gottelt et al., 2010; Kotowska et al., 2014) (Figura I.5). Así mismo, se ha detallado la producción de metilenomicina por el clúster de genes biosintéticos situados en el plásmido SCP1,

INTRODUCCIÓN

aunque en este estudio se ha empleado la cepa *S. coelicolor* M145 que carece de este plásmido y, por tanto, de este antibiótico (Kirby et al., 1975).

La **ACT** químicamente es una benzoisocromanoquinona derivada de poliquétido. Presenta una pigmentación dependiente de pH: roja en pH ácido y azul en pH básico (Bystrykh et al., 1996). Aunque tradicionalmente se la ha considerado un antibiótico frente a Gram positivas poco efectivo, nuevos estudios demuestran que es un potente bacteriostático al pH adecuado (Mak and Nodwell, 2017), que actuaría de forma poco específica sobre la pared celular y sobre el DNA, siendo capaz de inactivar enzimas como la DNA girasa o la topoisomerasa IV. Se sugiere también que dicha actividad es debida al daño oxidativo que produce la acumulación de ROS (*Reactive Oxygen Species*) propiciada por la propia actinorrodina, la cual es capaz de catalizar la oxidación de ácido L-ascorbico y L-cisteína con la consiguiente producción de H₂O₂ y también de generar electrones que interaccionen con oxígeno molecular al reducir sus grupos quinona (Nishiyama et al., 2014). Su clúster se encuentra formado por 22 genes divididos en cinco unidades transcripcionales, que dan lugar a una ruta biosintética basada en reacciones tipo poliquétido sintasa tipo II (Okamoto et al., 2009).

La **RED** es un compuesto rojo con estructura de tripirrol hidrofóbico que puede ser producido como metabolito secundario por distintos organismos (Furstner, 2003). Su esqueleto se genera a partir de una prolina, una glicina, una serina y varias unidades de acetato, gracias a las enzimas codificadas en un clúster de 22 genes (Mo et al., 2008). Desde un punto de vista humano las prodigininas son moléculas de gran interés por su actividad anticancerígena e inmunosupresora (Ho et al., 2007). Sin embargo, su función en la bacteria no está clara, aunque se ha descrito que tiene efectos protectores contra luz ultravioleta, radiación y daño oxidativo (Meschke et al., 2012; Stankovic et al., 2012) o que incluso puede llegar a tener un papel importante en los procesos de muerte programada del ciclo celular (Tenconi et al., 2018).

El **CDA** es un lipopéptido ácido cuyo modo de acción es modificar la membrana de bacterias al formar un ionóforo dependiente de calcio (Lakey et al., 1983). Para ello dispone de un motivo N-terminal que facilita la penetración de lipopéptidos en la membrana plasmática de bacterias Gram positivas. Su ruta biosintética, codificada

por 48 genes, incluye 3 sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS, *nonribosomal peptide synthetases*) que comprenden 11 módulos (Hojati et al., 2002).

En cuanto a los compuestos producidos por el clúster **CPK**, formado por 19 genes, se han descrito tres. El abCPK, incoloro, es el único con actividad antibiótica, y se cree que sería un intermediario de la ruta biosintética de la coelimidina P1. La coelimidina P1 y P2 por su parte no tienen actividad antibiótica. Mientras que la coelimidina P1 está identificada como un alcaloide, la coelimidina P2 es un pigmento amarillo que se ha intentado asignar a un aducto de glutamato o a un intermediario de la ruta de la coelimidina P1 (Gómez-Escribano et al., 2012).

Estos antibióticos, pese a ser activos frente a bacterias Gram positivas, actualmente no se emplean con usos médicos. No obstante, la pigmentación que confieren la ACT y la RED han resultado de gran utilidad a la hora de llevar a cabo estudios genéticos sobre la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor*. De esta forma la mutación o sobreexpresión de genes que estén implicados en la síntesis y/o regulación de estos antibióticos se manifiesta como variaciones de color fácilmente observables.

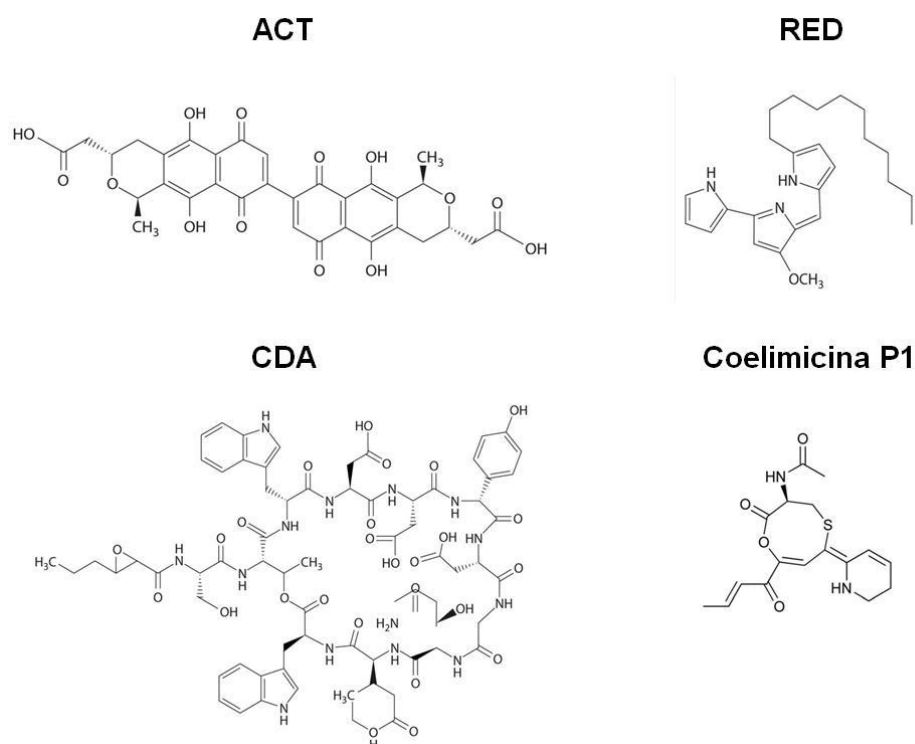


Figura I.5. Estructura de los compuestos ACT, RED, CDA y coelimidina P1 producidos por *S. coelicolor*.

2.3.2 Regulación del metabolismo secundario

Tradicionalmente se ha considerado la regulación de estos clústeres como jerárquica: los niveles más altos (reguladores globales o pleiotrópicos) controlan desarrollo y metabolismo secundario, y en los más bajos regulan la producción de un metabolito secundario concreto.

No obstante, se puede apreciar que estos mecanismos interaccionan unos con otros a varios niveles, siendo una regulación bastante flexible y en ocasiones difusa. Así, más que de una jerarquía, deberíamos hablar de una complejísima red de regulación. Esto se puede apreciar en casos en los que reguladores específicos actúan como pleiotrópicos (Huang et al., 2005) o que regulan otras rutas (Iqbal et al., 2012), reguladores pleiotrópicos que presentan regulación cruzada (Martín et al., 2012) o reguladores que actúan en conjunto (Al-Bassam et al., 2014). Además, hay que tener en cuenta los niveles de regulación traduccional y postraduccional, que también estarían relacionados entre sí. Por ejemplo, el nucleótido 5'-difosfato 3'-difosfato (ppGpp) se comienza a producir en respuesta a la llegada de tRNA sin aminoácido a los ribosomas y es capaz de desencadenar un cambio en el patrón transcripcional que afecta al metabolismo secundario (Chakraburty and Bibb, 1997; Gómez-Escribano et al., 2008). Moléculas como la S-adenosil-L metionina (Kim et al., 2003; Okamoto et al., 2003), el cAMP (Horinouchi et al., 2001; Susstrunk et al., 1998) y el cGMP (den Hengst et al., 2010) también intervienen en procesos regulatorios.

De esta forma tampoco se puede perder de vista otros métodos de regulación, a pesar de que la más estudiada sea la regulación transcripcional. Los pequeños RNA no codificantes (sRNA, *small noncoding RNAs*), pueden modular la estabilidad y traducción de los mRNA de gran variedad de procesos celulares (Hoe et al., 2013). La degradación de proteínas es también un importante punto de control para asegurar que los reguladores necesarios para controlar un proceso dado no continúan actuando más allá del momento necesario, por lo que es necesario controlar cuando se degradan ya sea por proteasas dependientes de ATP o vía proteasoma, lo que requiere el marcaje con Pup (*Prokaryotic ubiquitin-like protein*) de aquellas proteínas que se quieren degradar (Compton et al., 2015). A su vez, tenemos que tener también en cuenta la existencia de la epigenética, que si bien no ha sido tan ampliamente estudiada en *Streptomyces* para procesos de desarrollo y producción de antibióticos, si se ha demostrado que puede tener influencia en la estructura del nucleóide en las esporas (Salerno et al., 2009).

2.3.2.1 Regulación específica

Como hemos mencionado anteriormente, existen reguladores específicos de ruta que generalmente encontramos dentro de un clúster regulando de forma directa la transcripción de los demás genes de la agrupación. A estos reguladores los denominamos Reguladores Situados en los Clústeres biosintéticos (**CSR**, *Cluster-Situated Regulators*), o también reguladores específicos de ruta (Huang et al., 2005). La gran mayoría de estas proteínas son reguladores transcripcionales que contienen un motivo de unión al DNA con el motivo hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*).

En *S. coelicolor* la mayoría de CSR descritos pertenecen a la familia **SARP** (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*, proteínas reguladoras de antibióticos de *Streptomyces*) (Wietzorrek and Bibb, 1997). Los reguladores SARP poseen un dominio de activación transcripcional BTAD (*Bacterial transcriptional activator domain*) (Tanaka et al., 2007) en su extremo C-terminal y un motivo de unión a DNA en el N-terminal. Este motivo HTH reconoce motivos repetidos espaciados por 11 nucleótidos que coinciden con la región -35 de la región promotora (Bibb, 2005).

Los reguladores SARP pueden clasificarse en subfamilias en función de su tamaño. De esta manera, distinguimos los "*small SARP*", los más frecuentes, con menos de 300 aminoácidos (ActII-ORF4, (Arias et al., 1999) y RedD (Guthrie et al., 1998)); los "*medium SARP*" de hasta 600 residuos (CdaR en *S. coelicolor* (Ryding et al., 2002)) y los "*large SARP*" de hasta 1000 aminoácidos (PimR de *S. natalensis* (Antón et al., 2004)). Sin embargo, estos últimos son más bien reguladores híbridos formados por la fusión de elementos modulares con dominios de unión a DNA (Liu et al., 2013) y se encuentran en rutas de antifúngicos, por lo que se cree que reconocen una señal relacionada con su actividad antifúngica (Santos-Aberturas et al., 2012).

Aunque los reguladores SARP a menudo se encuentran localizados en sus respectivos clústeres, se sabe de otros reguladores que no lo están, como es el caso de AfsR (Liu et al., 2013), el cual regula positivamente la producción de antibióticos.

Dentro de los clústeres de producción de antibióticos de *S. coelicolor* de los que hemos hablado anteriormente encontramos los siguientes SARP.

-ActII-ORF4: el regulador responsable de la producción de ACT (Arias et al., 1999) y miembro fundador de la familia SARP. Se trata de un *small SARP* que reconoce repeticiones de la secuencia TCGA a intervalos de -11 pares de bases que aparecen en cinco regiones promotoras del clúster (Iqbal et al., 2012) (Wietzorrek and Bibb, 1997). La proteína ActII-ORF4 es la encargada de transmitir toda la información referente al

INTRODUCCIÓN

momento y nivel de producción de la ACT, principalmente por la influencia de otros reguladores en sus niveles transcripcionales y tal vez en la proteína en sí. La región promotora del gen *actII-ORF4* es blanco directo de un gran número de proteínas entre las que podemos encontrar AdpA (Lee et al., 2013), LexA (Iqbal et al., 2012), AbsA2 (McKenzie and Nodwell, 2007), AbrC3 (Rico et al., 2014a), DasR (Rigali et al., 2008), DraR (Yu et al., 2012), AfsQ1 (Wang et al., 2013), AtrA (Uguru et al., 2005), Crp (Gao et al., 2012), ROK7B7 (Swiatek et al., 2013), GlnR (He et al., 2016; Wang et al., 2013), GntR (Yu et al., 2016), SCO0310, SCO3932, SCO5405 (Park et al., 2009), los reguladores LAL SCO0877 y SCO7173 (Guerra et al., 2012), el regulador SCO3361 (Liu et al., 2017) y el factor σ SigT (Feng et al., 2011), entre otros. Además de la implicación de todos estos reguladores (y los que queden por descubrir), el transcrito de *actII-ORF4* presenta el codón raro UUA (uno de los seis codones leucina), lo que provoca que su traducción sea dependiente del tRNA codificado por el gen *bldA*, el cual se encuentra relacionando la producción de antibióticos y el ciclo celular (Fernández-Moreno et al., 1991).

-RedZ y RedD: los dos *small SARP* que forman la pequeña cascada de regulación de la RED. El primero de estos CSR, RedZ, activa la expresión de *redD*, que es el activador directo de los genes biosintéticos uniéndose a repeticiones TCAG situadas a intervalos de -11 nucleótidos en la zona promotora del largo operón *red* (Iqbal et al., 2012). Este último, RedD, es un regulador de respuesta que difiere de los convencionales en dos aspectos: no tiene adyacente un gen que codifique para una histidina quinasa, y carece en su estructura de las estructuras necesarias para la fosforilación (Guthrie et al., 1998) (ver apartado 3. Sistemas de dos componentes). Su actividad queda así directamente regulada por el propio producto de la ruta, la RED, que provocaría una disminución de la afinidad de RedZ al promotor de *redD* (Wang et al., 2009a). A su vez, como ya ocurría con el *actII-ORF4*, la transcripción de *redZ* también se ve regulada por otros reguladores como pueden ser AbsA2 (McKenzie and Nodwell, 2007), DasR (Rigali et al., 2008) o AfsQ1 (Wang et al., 2013), y su transcrito contiene el codón UUA (Guthrie et al., 1998).

-CdaR: el CSR implicado en la producción de CDA. Se trata de un *medium SARP* que activa los genes biosintéticos. Este regulador se encuentra regulado por otros reguladores asociados con el clúster como pueden ser AfsQ1 (Wang et al., 2013) o

AbsA2 (McKenzie and Nodwell, 2007). El sistema de dos componentes AbsA1/A2, cuyos genes se encuentran codificados dentro del propio clúster, estaría actuando como un regulador negativo en respuesta a ciertas señales, de forma que una disminución en la cantidad de AbsA2 fosforilado provocaría la desrepresión de *cdaR*. Es especialmente reseñable que AbsA2 también ha demostrado poder unirse a los promotores de los CSR de otros clústeres como *actII-ORF4* y *redZ*.

-KasO: el regulador de la producción del abCPK y de las coelimicinas P1 y P2. Al igual que ocurría en casos anteriores, este gen se ve regulado por otras proteínas. Así, encontramos que *kasO* se ve reprimido por ScbR, un receptor de γ -butirolactonas que se une al promotor hasta que la acumulación de γ -butirolactonas produce su liberación y de esa forma la activación del clúster *cpk* (Takano et al., 2005a). Esa parece ser la causa de que se requieran grandes cantidades de inóculo para que se produzca, además de unas condiciones específicas (Pawlik et al., 2010). También se ha visto que este gen se encuentra regulado por el sistema de dos componentes RapA (Lu et al., 2007), que actúa como regulador positivo; reprimido por PhoP (Allenby et al., 2012); y activado por AfsQ1 (Wang et al., 2013).

Además de los reguladores tipo SARP podemos encontrar otras familias de reguladores en *Streptomyces*. Tal es el caso de los reguladores LAL, una clase de reguladores relativamente grandes (de 870 a 1200 aminoácidos) que poseen un dominio de unión a ATP/GTP en su N-terminal y un dominio de unión a DNA tipo HTH de la familia Lux. No obstante, si bien se han encontrado diferentes reguladores específicos de este tipo en agrupaciones génicas de diferentes especies (Hur et al., 2008; Kitani et al., 2009; Kuscer et al., 2007; Sekurova et al., 2004; Wilson et al., 2001), en *S. coelicolor* los reguladores LAL descritos son reguladores pleiotrópicos (Guerra et al., 2012).

2.3.2.2 Regulación global

Los reguladores globales (o pleiotrópicos) son proteínas que responden a una gran variedad de señales tanto internas como externas e integran dicha información para que la célula lleve a cabo las respuestas oportunas (Martín and Liras, 2010). Estos factores transcripcionales controlan no solo la producción de más de un antibiótico a la vez, sino también la diferenciación morfológica o respuestas a diferentes tipos de estrés,

conectando así metabolismo primario, secundario y ciclo celular. Por ello se suele considerar que, en una jerarquía ideal, dichos reguladores se sitúan en la cima de la cascada regulatoria. Esto no sólo resulta un tanto inexacto, sino también confuso, ya que dado que múltiples señales pueden desencadenar una misma respuesta hablar de regulación confluyente sería más apropiado (Liu et al., 2013). Como se señaló previamente, los procesos regulatorios en *Streptomyces* escapan del sistema jerárquico para formar una compleja red interconectada a múltiples niveles (Huang et al., 2005). Por lo general, los genes que codifican estos reguladores se encuentran fuera de los clústeres biosintéticos, y su estructura es más variable que la de los CSR.

Algunos ejemplos de reguladores pleiotrópicos descritos en *S. coelicolor* son el sistema AfsK/R/S (Matsumoto et al., 1994), AtrA (Hirano et al., 2008), BldD (Elliot et al., 1998), DasR (Rigali et al., 2008) o WblA (Kang et al., 2007). Sin embargo, los reguladores pleiotrópicos en los que nos hemos centrado durante este estudio son los sistemas de dos componentes, los cuales se explicarán con mayor detalle en el siguiente apartado.

3. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

3.1 Generalidades

Aunque tal y como hemos visto anteriormente existen distintas formas de integrar diferentes señales, las principales vías de transducción de estímulos tanto ambientales como fisiológicos en bacterias son los sistemas de dos componentes (**TCS**, *Two-Component System*), que participan en funciones tales como quimiotaxis, captación de nutrientes, fijación de nitrógeno, diferenciación morfológica, esporulación o *quorum sensing* (Stock et al., 2000). Además, su implicación en la virulencia de bacterias patógenas hace que puedan ser un buen blanco para desarrollar nuevas terapias (Tiwari et al., 2017).

Estos sistemas no sólo se encuentran en bacterias, sino que también existen en arqueas, hongos, protozoos y plantas (Hutchings et al., 2004), aunque en estos últimos en menor número al ser mayoritarias otras vías de señalización. En animales, sin embargo, se considera que estos sistemas no están presentes al no haberse detectado ninguno en los genomas ya secuenciados (Wolanin et al., 2002).

Los TCS típicos están formados por una histidina quinasa (HK, *Histidine Kinase*) y un regulador de respuesta (RR, *Response Regulator*) cuyos genes se encuentran adyacentes en el genoma. Estos sistemas se pueden encontrar a lo largo de todo el cromosoma, existiendo además HK o RR que carecen de pareja contigua en el genoma, en cuyo caso se denominan huérfanos.

En bacterias se pueden encontrar de media entre 10 y 50 sistemas de dos componentes, siendo este número extremadamente variable en función del estilo de vida de las mismas (Wuichet et al., 2010). Así, mientras que en bacterias patógenas cuyo nicho apenas presenta variaciones ambientales a las que responder, estos sistemas son escasos (Kim et al., 2010), en casos de habitantes del suelo como el que aquí nos ocupa y que se ven sometidos a una enorme variedad de condiciones, el número de TCS que encontramos en su genoma supera con creces estas estimaciones (Rodríguez et al., 2013). Además, aunque las HK y RR huérfanos están poco estudiados, se cree que permiten ampliar el rango de respuestas que pueden generarse ante un determinado estímulo gracias a su interacción con otros elementos (Wang et al., 2009b). También existen proteínas auxiliares que influyen en los TCS influyendo en su estabilidad o coordinando diferentes sistemas (Buelow and Raivio, 2010).

La importancia de estos sistemas queda patente en su gran número y ubicuidad. De acuerdo con la base de datos P2CS (*Prokaryotic 2-Component Systems*) (<http://www.p2cs.org>), podemos encontrar unos 165.000 genes pertenecientes a TCS a lo largo de los genomas de más de 6.000 especies.

3.2 Arquitectura

Las **HK** son proteínas homodiméricas con un tamaño de entre 40 y 110 kDa. En su mayoría son proteínas de membrana que presentan una región sensora N-terminal expuesta hacia el exterior, mientras que su región C-terminal catalítica se encuentra orientada hacia el citoplasma, estando ambas zonas conectadas por diferentes segmentos transmembrana (Attwood, 2013) (Figura I.6). Mientras que la región sensora muestra una secuencia variable que se encarga de detectar estímulos de diversa índole (Mascher et al., 2006), el núcleo catalítico citoplasmático de la HK que permite la actividad enzimática se encuentra altamente conservado en sus dos dominios diferenciados, el catalítico o de unión a ATP (CA, *Catalytic and ATP binding*) y el de dimerización y

INTRODUCCIÓN

fosfotransferencia (DHP, *Dimerization and Histidine phosphotransfer*) (Gao and Stock, 2009).

El dominio DHP (Pfam; PF00512) es responsable de la dimerización de la HK y contiene la histidina conservada que es fosforilada en su activación. En las estructuras tridimensionales de este dominio que están disponibles se puede apreciar que el dominio se pliega como dos largas hélices antiparalelas que al dimerizar forman un haz de cuatro hélices con la histidina conservada proyectada hacia el exterior (Marina et al., 2001; Tomomori et al., 1999). El dominio CA (Pfam; PF02518) cataliza en un primer momento la unión de una molécula de ATP y la transferencia de un fosfato de la misma a la histidina del dominio DHP (Scaramozzino et al., 2009). Dicho dominio presenta una estructura de sandwich α/β , con 5 cadenas β mixtas y 3 α hélices.

Estos dominios son necesarios y a su vez suficientes para llevar a cabo la autofosforilación de la HK. Aunque inicialmente se había descrito que dicha reacción ocurría siempre en trans, de forma que una de la HK del homodímero fosforilaba a la otra y viceversa, diferentes estudios ponen de manifiesto que existen diferentes HK que se pueden autofosforilar en cis, de forma que cada dominio CA autofosforila el dominio DHP de su propia quinasa (Albanesi et al., 2009; Casino et al., 2009).

Existen además otros dos dominios en la región citoplasmática de algunas de las HK. El dominio HAMP (*Histidina Kinases, Adenylyl cyclases, Metil-binding protein and Phosphatases domain*) se encuentra presente en el 31% de las HK. Consiste en dos hélices anfipáticas plegadas mediante un lazo flexible, que se sitúan inmediatamente después de las regiones transmembrana y presenta funciones relacionadas con la modulación de la señal entre la región sensora y la catalítica (Inouye, 2006). Por otro lado, el dominio PAS (*Per-Arnt-Sim*), presente en el 33% de las HKs, permiten señalar cambios relacionados con luz, oxígeno, potencial redox, pequeños ligandos y niveles de energía de la célula (Capra and Laub, 2012). Al igual que el caso anterior, se encuentran en la región citosólica precediendo al dominio DHP y podrían actuar como receptores o moduladores de la señal.

El dominio sensor, por su parte, se encuentra orientado en la mayoría de los casos hacia el exterior de la célula y se encarga de detectar los diferentes estímulos. Dada la extensa variedad de señales que es necesario detectar, esta región es bastante variable. Se encuentra flanqueado por dos segmentos transmembrana (TM). Sin embargo, también existen HK que carecen de dominio extracelular y que detectan

estímulos de membrana tales como integridad celular o gradientes de iones gracias a un mayor número de segmentos TM (entre 2 y 20). Algunas HKs pueden también combinar diferentes tipos de dominios sensores, integrando varios estímulos y generando una respuesta más compleja (Moglich et al., 2010).

Si bien a las HK que presentan estos dominios se las denomina ortodoxas o canónicas, existen también variaciones de HK híbridas que dan lugar a procesos más complejos que implican la transferencia del fosfato siguiendo la secuencia His-Asp-His-Asp, conocidas como *phosphorelays*. Por ejemplo, algunas presentan las actividades del dominio DHp en regiones separadas en un dominio histidina fosfotransferasa (HPt) y otro de dimerización. En otros casos también podemos encontrar HKs que incorporan un dominio receptor (REC) de un RR, o los diferentes dominios en distintas proteínas (Álvarez et al., 2016).

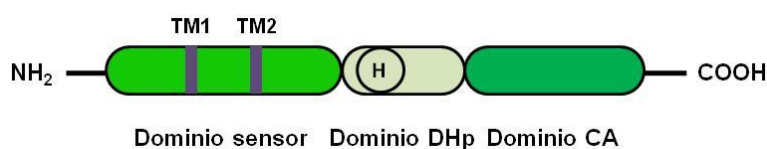


Figura I.6. Representación esquemática de un monómero de histidina quinasa. TM: segmento transmembrana, H: Histidina fosforilable. Dominio DHp: dominio de dimerización. Dominio CA: dominio catalítico.

En cuanto a los **RR**, son proteínas de unos 25 kDa que como norma general suelen presentar un dominio regulador receptor (REC) conservado en su zona N-terminal, el cual incluye el aspártico que acepta el fosfato de la HK, y un dominio efector C-terminal variable que está implicado en la unión del regulador al DNA (Stock et al., 2000) (Figura I.7).

El dominio REC (Pfam; PF00072) está formado por unos 120 residuos y dentro de su plegamiento característico α/β presenta un centro catalítico formado por un bolsillo ácido muy conservado rodeado por 5 lazos que conectan las cadenas β con las hélices α . En este bolsillo expuesto al solvente se encuentran tanto el aspártico fosforilable como otros dos residuos ácidos (generalmente también aspártico) implicados en la coordinación del Mg^{2+} que se requiere en la mayoría de los casos para la transferencia del fosfato. Otros residuos altamente conservados son una Lys, importante para la actividad catalítica, una Ser/Thr y una Phe/Tyr, implicados ambos en los cambios conformacionales que se inducen con la fosforilación.

INTRODUCCIÓN

El dominio efector es la región más variable de la proteína, ya que de él depende la función del regulador. La mayor parte de las veces actúan como factores de transcripción, regulando la expresión génica mediante dominios de unión a DNA de tipo HTH. Pueden hacerlo de forma positiva (activadores) como negativa (represores) o incluso ambas a la vez, ya que pueden regular desde un único operón hasta decenas de genes (Martínez-Antonio and Collado-Vides, 2003). En otros casos, los RR presentan dominios efectores con actividad enzimática, de unión a RNA o proteínas u otras funciones desconocidas (Galperin, 2010). También existen RR que carecen de dominio efector, actuando gracias a procesos de interacción proteína-proteína mediante el dominio REC (Jenal and Galperin, 2009), y reguladores PIARR (*Phosphorylation-Independent Activation of Response Regulator*) que carecen de los residuos necesarios para la fosforilación y se activan mediante la unión de ligandos (Wang et al., 2009a).

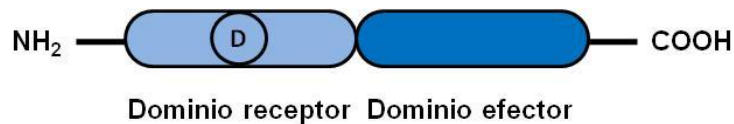


Figura I.7. Representación esquemática de un regulador de respuesta. D: Aspártico fosforilable.

3.3 Mecanismo de acción

El modo de acción de un sistema de dos componentes se inicia con un determinado estímulo, que es detectado por el dominio sensor de una HK. Como consecuencia, esto produce un cambio conformacional que permite la dimerización y autofosforilación de la misma en un residuo de His, generalmente en trans (un homodímero fosforila al otro y viceversa), a partir de una molécula de ATP o GTP. Posteriormente, el RR cataliza la reacción de fosfotransferencia del grupo fosfato desde la His de la HK hasta un Asp de su dominio receptor. Esto genera un cambio conformacional en esta proteína, que permite que dimericen y lleven a cabo su función, generalmente uniéndose a secuencias específicas de DNA para regular la expresión génica (Figura I.8).

Si bien este tipo de rutas son las más comunes en procariotas, tal y como se ha comentado anteriormente, existen casos más complejos, especialmente en eucariotas. En estos casos, conocidos como *multi-component phosphorelay systems*, el grupo fosfato se

transfiere de la HK a proteínas intermediarias que son las encargadas de fosforilar al RR (Williams and Whitworth, 2010). También pueden darse proteínas auxiliares que actúan sobre algunos de los componentes del sistema (Buelow and Raivio, 2010; Jung et al., 2012), y que sirven para conectar distintos sistemas, como proteínas de andamiaje, para influir en la estabilidad del RR o para ampliar la respuesta frente a determinadas señales. En ocasiones, en vez de una proteína auxiliar el tercer componente pueden ser pequeños RNA antisentido que promueven o impiden la traducción de determinados mensajeros o actúan directamente sobre otras proteínas (Gopel and Gorke, 2012).

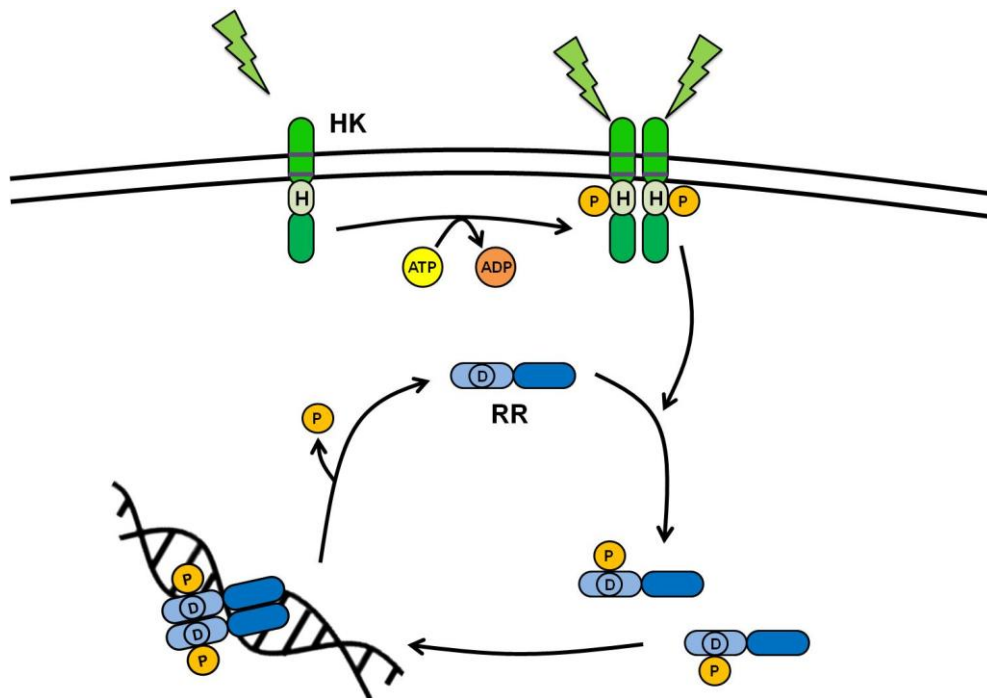


Figura I.8. Mecanismo de acción de un sistema de dos componentes típico. H: histidina fosforilable. D: aspártico fosforilable.

Hay que tener en cuenta que el funcionamiento de estos sistemas no es de todo o nada, sino que más bien existe un equilibrio entre las conformaciones activas e inactivas de los RR, de tal manera que su fosforilación decanta el equilibrio hacia la conformación activa, mientras que su desfosforilación lo desplaza hacia la forma inactiva. En este sentido juegan un papel importante ciertos compuestos con fosfatos de alta energía como el acetil fosfato o el carbamoil fosfato, que pueden ser usados por algunos RR para catalizar su propia fosforilación (Lukat et al., 1992; Wolfe, 2005). Esta parecería una medida para mantener unos niveles basales de fosforilación en varios RR, aunque se duda de su efectividad cuando está presente la HK del sistema dado que en

INTRODUCCIÓN

estas circunstancias actuaría como fosfatasa eliminando esta fosforilación no específica (todas las evidencias *in vivo* provienen de mutantes sin la HK).

Es necesario mencionar en este punto que la vida media de los RR fosforilados puede variar de segundos a días en función de la respuesta que lleven a cabo (Casino et al., 2007; Zapf et al., 2000). La reacción de desfosforilación del RR, aunque puede ser llevada a cabo por el propio regulador, es altamente dependiente de las HK, ya que en ausencia de estímulo la actividad quinasa de esta última disminuye favoreciéndose la actividad fosfatasa con una elevada afinidad sobre el RR de su TCS. En ese caso, la HK aceptora de la HK es la encargada de orientar y polarizar una molécula de agua que ataca al grupo fosfato del RR para generar una molécula de fosfato inorgánico al tiempo que deja al RR en su conformación inactiva (Zhu et al., 2000).

La especificidad entre la HK y el RR de un sistema viene dada por varios mecanismos, siendo el principal el reconocimiento del RR por parte de la HK determinado por sus estructuras primarias (Podgornaia and Laub, 2013; Willett et al., 2013). Así, se ha podido demostrar que la modificación de tan sólo tres aminoácidos del dominio DHp es suficiente para cambiar la especificidad de una HK y hacerla coincidir con otra (Skerker et al., 2008).

Existen casos de interacciones entre distintos sistemas de dos componentes, aunque debemos diferenciar entre los procesos de *crosstalk* o interferencia y los de *cross-regulation* o interacción cruzada (Álvarez et al., 2016) (Figura I.9). En el primer caso se hace referencia a aquellos casos en los que los múltiples TCS presentes al mismo tiempo presenten interacciones de forma cruzada, de forma que una HK pueda fosforilar a otros RRs aparte del suyo. Sin embargo, al ser la especificidad entre los componentes muy elevada tanto en los procesos de fosforilación como en los de desfosforilación, estas interacciones sólo se han podido ver en cepas donde una determinada HK haya sido mutada o sobreexpresada (Groban et al., 2009), ya que en condiciones normales si un RR se viera fosforilado de forma inespecífica se vería inmediatamente desfosforilado por su HK (Boll and Hendrixson, 2011).

No obstante, no debemos confundir esto con los casos de regulación cruzada, que son aquellos en los que un RR o una HK son controlados adicionalmente por un sistema regulatorio diferente. Por lo tanto, esto hace referencia a aquellos casos que, como hemos visto, requieren de proteínas auxiliares (AUX) que modulan la actividad de un sistema y cuya expresión a su vez está controlada por un sistema diferente. También

se englobarían aquí los casos en los que unos sistemas interactúan directamente con otros sin intermediarios, como por ejemplo la interacción entre HK de distintos sistemas que pueda impedir la formación de homodímeros, y por tanto favorecer la desfosforilación del regulador (Álvarez et al., 2016).

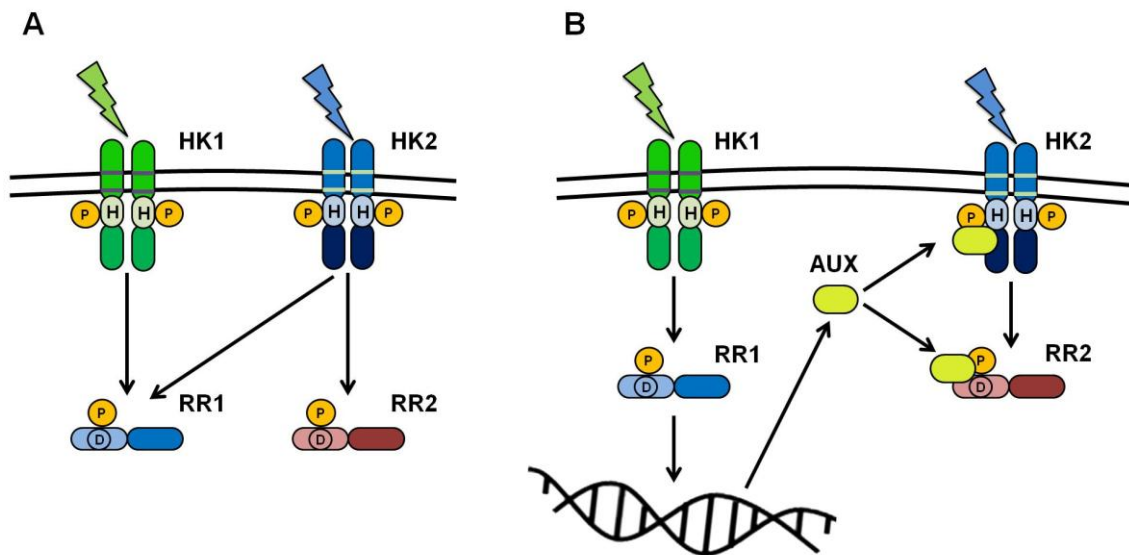


Figura I.9. A: Esquema de un proceso de *crosstalk* o interferencia. B: Esquema de regulación cruzada o *cross-regulation*. AUX: proteína auxiliar.

Tampoco debemos incluir en esa categoría los casos con un esquema denominado "*one-to-many*", que a pesar de ser parecidos a los procesos de *crosstalk* de los que se habló anteriormente, se diferencian de los mismos en que esa aparente promiscuidad está finamente controlada para producir la respuesta deseada ante unas condiciones muy concretas (López-Redondo et al., 2010), mientras que en los primeros nos encontramos ante un efecto colateral de la alta similitud que tendría efectos nulos o perjudiciales para la células al tratarse de un efecto presumiblemente indeseado.

3.4 TCS en *S. coelicolor*

Dado que los TCS son la principal vía de transmisión de señales en bacterias, el número de genes que codifican para HK da una muestra del abanico de estímulos a los cuales puede responder. En el caso de *S. coelicolor* se han identificado por homología de secuencia un total de 100 HK y 87 RR (<http://www.p2cs.org/page.php?base=Strc2DB&PHPSESSID=ed3d17d52ecb8bb67689>

INTRODUCCIÓN

13b8155dd70b), lo cual supone un elevado número con respecto a otras bacterias de vida libre. Por lo tanto, *S. coelicolor* parece ser un microorganismo capaz de detectar y responder a una gran variedad de estímulos en el siempre cambiante suelo, su hábitat natural (Bentley et al., 2002). Además, si tenemos en cuenta que estos sistemas se encuentran a lo largo de todo el cromosoma, podemos concluir que participan en una gran cantidad de respuestas celulares, a pesar de que, al contrario de lo que ocurre en otras bacterias, no se ha encontrado hasta la fecha ninguno que sea esencial.

La mayoría de HK y RR de *S. coelicolor* son canónicas, aunque sí se han encontrado dos HK híbridas con un dominio REC. En cuanto a los reguladores de respuesta, prácticamente todos poseen un dominio efector de unión a DNA, mientras que un caso lo presenta de unión a RNA, otros dos de tipo enzimático, y en tres casos es desconocido. Existen también tres RR que constan solamente del dominio REC (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html).

Dentro de todos estos elementos, se puede ver que 63 de ellos se encontrarían como parejas HK-RR. Se encuentran también un sistema de tres componentes compuesto por dos RR y una HK (dispuestos en la secuencia RR-HK-RR) y una tetrada (RR-HK-RR-HK). El resto de los elementos, 54, estarían clasificados como huérfanos.

Sin embargo, de entre todos estos elementos tan sólo se han descrito una pequeña parte, la mayoría de ellos TCS clásicos, y de casi todos ellos se desconoce su señal activadora (Rodríguez et al., 2013) (Tabla I.1). A continuación se detallan brevemente los distintos TCS implicados en producción de antibióticos en *S. coelicolor*.

-AbsA1/A2: es un sistema regulador negativo de la síntesis de ACT, RED y CDA de forma directa uniéndose a los promotores de *actII-ORF4*, *redZ* y *cdaR*, pero no llega a afectar a la diferenciación morfológica (McKenzie and Nodwell, 2007). Los genes que codifican para este sistema se encuentran dentro del clúster biosintético del CDA, teniendo tanto un promotor que permite transcribir todo el sistema como un promotor interno antes de *absA2* (Santos-Beneit et al., 2013). Además, también se ha visto que su transcripción puede verse afectada por la unión directa de los receptores de γ -butirolactonas (Li et al., 2015).

-AfsQ1/Q2: este sistema regula de forma positiva la producción de antibióticos. Inicialmente fue identificado al clonar el RR AfsQ1 de *S. coelicolor* e introducirlo en *S. lividans*, hecho que activó la producción de ACT y RED en esta especie, la cual pese a

portar los clústeres para su biosíntesis no es productora habitual de estos compuestos (Ishizuka et al., 1992). Estudios más recientes en *S. coelicolor* han corroborado su papel como activador, al mostrar que su mutante nulo presenta una reducción drástica de ACT, RED, CDA e yCPK, y una aceleración en la formación de micelio aéreo dependiente del medio de cultivo (Chen et al., 2016; Shu et al., 2009); y también han demostrado que esto ocurre de forma directa al unirse a los CSR *actII-ORF4*, *redZ*, *cdaR* y la región intergénica entre los genes estructurales *cpkA* y *cpkD*, entre otras dianas (Chen et al., 2016; Wang et al., 2013).

-DraR/K: actúa de forma diferencial en la producción de los distintos antibióticos. Así, activa la producción de ACT, pero inhibe la de RED de forma indirecta y la de yCPK de forma directa (Yu et al., 2012). Además, nuevos estudios han demostrado su implicación sobre al menos otros cinco metabolitos secundarios y varios genes del metabolismo primario (Yu et al., 2014).

-GluR/K: el sistema, situado de forma divergente al operón *gluABCD* que codifica para un sistema de captación de glutamato, está implicado tanto en la producción de ACT, RED e yCPK como en la captación de glutamato en condiciones de baja concentración. Esta molécula es la señal directa de la HK GluK, que activaría el sistema en condiciones de altas concentraciones de glutamato para facilitar su captura y promovería la síntesis de antibióticos, hechos no relacionados entre sí (Li et al., 2017).

-MtrA/B: este sistema recientemente descrito se encuentra conservado en el género *Streptomyces*. En *S. coelicolor* regula tanto procesos de esporulación como de producción de antibióticos, uniéndose directamente a los promotores de los CSR *actII-ORF4* y *redZ* (Som et al., 2017).

-OhkA: se trata de una HK huérfana. El mutante de *ohkA* presenta dificultades al formar micelio aéreo y esporular, a la vez que produce mayores cantidades de ACT, RED y CDA, así como sobreexpresa los clústeres de otros compuestos. (Lu et al., 2011).

-OsaA/B: este sistema está formado por una HK híbrida y un RR implicado en osmoadaptación. El mutante de *osaB* crecido en condiciones hiperosmóticas es incapaz

INTRODUCCIÓN

de producir micelio aéreo y además produce mayor cantidad de antibióticos que la cepa silvestre. OsaB es un RR atípico, ya que carece de dominio de unión a DNA (se piensa que interacciona con otras proteínas) y además su gen se transcribe de forma independiente gracias a un promotor que puede ser controlado por SigB, un factor sigma clave en la respuesta a estrés osmótico y oxidativo. (Bishop et al., 2004; Fernández Martínez et al., 2009).

-OsdK/R: formado por el RR OsdR y la HK OsdK, este sistema parece ser un ortólogo funcional de DevR de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual activa genes relacionados con un estado de dormición en condiciones de hipoxia. En *S. coelicolor* se ha podido determinar su unión con genes que forman parte de una respuesta de dormición ante situaciones de estrés. Además, también parece implicada en producción de antibióticos, ya que tanto la eliminación de OsdR como del RR huérfano *SCO3818*, también controlado por OsdK, dan lugar a una mayor producción de ACT (Urem et al., 2016; Wang et al., 2009b).

-PhoP/R: este sistema, uno de los más estudiados en *S. coelicolor*, está implicado en el control del fosfato. En condiciones limitantes de fosfato, PhoR, la HK, se fosforila y activa PhoP, que actúa uniéndose a secuencias denominadas *PHO boxes* para activar vías de aprovechamiento del fosfato, reprimir la utilización de fuentes de nitrógeno, controlar la transición a fase secundaria y activar el metabolismo secundario (Martín et al., 2017). Si bien su papel sobre el metabolismo primario parece directo, su implicación sobre el secundario parece ser indirecto, ya que se ha encontrado que PhoP presenta una regulación recíproca con AfsR. Ambos reguladores se pueden unir al promotor de *afsS*, el cual codifica una pequeña proteína que activa la expresión de *actII-orf4* y *redD*, y aunque ambos actuarían de forma positiva sobre *AfsS*, presentan diferentes afinidades que conducen a que PhoP interfiera con la regulación ejercida por AfsR (Santos-Beneit et al., 2009).

-RapA1/A2: este sistema es un activador de la producción tanto de ACT como de yCPK, promoviendo la transcripción de *actII-ORF4* y de *kasO*. Sin embargo, se desconoce si lo hace de forma directa o indirecta (Lu et al., 2007).

-**SCO5784/5785**: implicado tanto en producción de antibióticos como en ciclo. Su eliminación causa un retraso en la producción de ACT y RED así como en la esporulación, además de producir una sobreexpresión de algunos genes ribosomales, mientras que su sobreexpresión presenta el fenotipo contrario (Rozas et al., 2012).

-Existen varios sistemas que en lugar de afectar a la producción de varios antibióticos a la vez actúan únicamente sobre uno de ellos. Ese es el caso de los sistemas **EcrA1/A2** (Li et al., 2004) y **EcrE1/E2** (Wang et al., 2007), ambos activadores de la ruta de la RED; y **CutR/S** (Chang et al., 1996) y el RR huérfano **SCO3818** (Wang et al., 2009b), que inhiben la producción de ACT.

En cuanto a los sistemas AbrA1/A2, AbrB1/B2 y AbrC1/C2/C3 descritos por Yepes (Yepes et al., 2011), así como el RR de respuesta huérfano Aor1 (Antoraz et al., 2017), objeto de este trabajo, se encuentran implicados tanto en producción de antibióticos como en diferenciación morfológica, y se explicarán en detalle en el siguiente apartado.

Tabla I.1. TCS descritos en *S. coelicolor*.

SISTEMA	PROCESO REGULADO	REFERENCIA
AbrA1/A2	Producción de antibióticos y diferenciación morfológica	(Yepes et al., 2011)
AbrB1/B2	Producción de antibióticos y diferenciación morfológica	(Yepes et al., 2011)
AbrC1/C2/C3	Desarrollo morfológico y producción de antibióticos	(Yepes et al., 2011)
AbsA1/A2	Producción de antibióticos	(Adamidis et al., 1990)
AfsQ1/Q2	Producción de antibióticos y diferenciación	(Ishizuka et al., 1992)
Aor1	RR huérfano implicado en producción de antibióticos y diferenciación	(Antoraz et al., 2017)
CseB/C	Homeostasis de pared celular	(Paget et al., 1999)
CutR/S	Producción de antibióticos	(Chang et al., 1996)
ChiS/R	Producción de una quitinasa	(Homerova et al., 2002)
DraR/K	Producción de antibióticos	(Yu et al., 2012)
EcrA1/A2	Producción de antibióticos	(Li et al., 2004)
GluR/K	Producción de antibióticos y captación de glutamato	(Li et al., 2017)
MtrA/B	Esporulación y producción de antibióticos	(Som et al., 2017)
OsaA/B	Osmoadaptación y producción de antibióticos	(Bishop et al., 2004)
OhkA	HK huérfana implicada en producción de antibióticos y diferenciación	(Lu et al., 2011)
OsdK/R	Producción de antibióticos	(Wang et al., 2009b)
PhoP/R	Transporte de fosfato y producción de antibióticos	(Rodríguez-García et al., 2007)
RagK/R	Esporulación independiente de SapB	(San Paolo et al., 2006)
RapA1/A2	Producción de antibióticos	(Lu et al., 2007)
VanR/S	Resistencia a vancomicina	(Hong et al., 2004)
SCO3818	RR huérfano implicado en producción de antibióticos	(Wang et al., 2009b)
SCO4155/56	Secreción en respuesta a estrés	(Gullón et al., 2012)
SCO5784/85	Metabolismo primario y secundario	(Rozas et al., 2012)

4. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, una de las formas más empleadas en la actualidad para explotar la capacidad biosintética de *Streptomyces* es entender a nivel molecular cómo se produce la biosíntesis de antibióticos y cómo están conectadas las diversas redes regulatorias responsables de dirigir el proceso. Como hemos podido ver, la modificación de algunos de estos elementos tiene efectos sobre la producción de antibióticos, por lo que tratar de aprovechar estos casos para mejorar la producción de compuestos de forma más dirigida que otras de las aproximaciones comentadas en puntos previos es una opción más que interesante.

Dentro de todos los elementos regulatorios que juegan un papel en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, los TCS resultan especialmente interesantes ya que relacionan de forma directa unos determinados estímulos con unas respuestas que pueden llegar a ser altamente complejas. Por ello, en nuestro laboratorio se inició una vía de investigación consistente en explorar los papeles de varios de estos sistemas en la producción de antibióticos. Con esta finalidad se seleccionaron, mutaron y analizaron distintos sistemas de dos componentes con similitud de secuencia con el sistema AbsA1/A2 (Yepes, 2006), estudiándose más en detalle aquellos que parecieron tener un papel más importante en la síntesis de antibióticos y que detallaremos a continuación.

4.1 Sistemas de dos componentes estudiados en nuestro grupo

4.1.1 AbrA

El sistema AbrA se encuentra formado por la HK AbrA1 (*SCO1744*) y el RR AbrA2 (*SCO1745*). Su papel tanto sobre la síntesis de antibióticos como sobre la diferenciación es negativo; el mutante $\Delta abrA1/A2$ (al que denominaremos simplemente $\Delta abrA$ de aquí en adelante) presenta tanto una producción de ACT, RED y CDA aumentada como una diferenciación acelerada con respecto a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 parental (Figura I.10).

Los genes que codifican para ambos elementos se encuentran formando un operón junto a los dos genes que lo preceden (*SCO1742-43*) y que codifican para un sistema de transporte ABC. Sin embargo, los intentos de relacionar este sistema con la síntesis o resistencia a algún antibiótico no han llegado a aclarar su papel: el mutante de ambos genes del sistema de transporte no parece tener efecto en la producción de ACT

y RED por sí mismo, pero suprime el efecto del mutante *ΔabrA* cuando se eliminan en conjunto con el mismo (Rico et al., 2014b). Por otra parte, la mutación de los *SCO1742-1743* sí que contribuye a aumentar la producción de CDA, efecto que es aditivo al obtenido por la cepa *ΔabrA*.

Distintos experimentos realizados alrededor de este sistema ponen el foco en que la posible señal activadora del sistema sea el hierro. Se ha podido ver también que la eliminación de tan sólo uno de los genes no tiene el mismo efecto que la eliminación del sistema al completo, por lo que en el caso de los mutantes *ΔabrA1* y *ΔabrA2* probablemente se estén produciendo fenómenos de interferencia como los descritos anteriormente, lo cual se pudo demostrar también mediante otro tipo de experimentos realizados en nuestro laboratorio (Antoraz, 2013; Rico et al., 2014b).

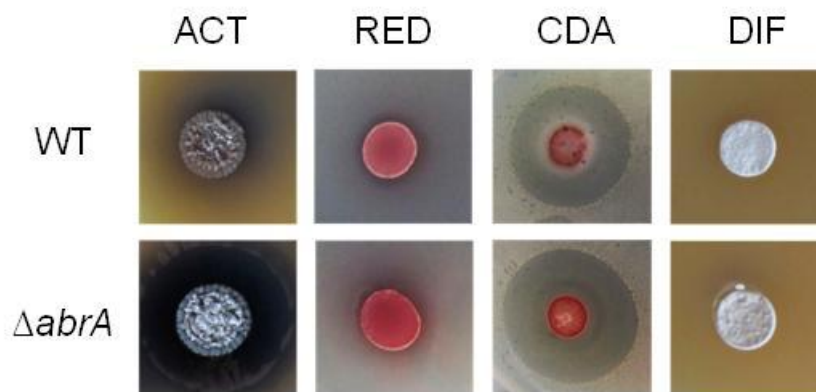


Figura I.10. Producción de los antibióticos ACT (medio YEPD), RED (PGA) y CDA (NA), así como diferenciación morfológica, DIF (SFM), en la cepa silvestre M145 y el mutante *ΔabrA* (Antoraz, 2013).

4.1.2 AbrB

El sistema AbrB está formado por el RR AbrB1 (*SCO2165*) y la HK AbrB2 (*SCO2166*) y actúa también como regulador negativo de producción de antibióticos. Su mutante produce mayores cantidades de ACT, RED y CDA en los diversos medios ensayados, y si bien en un principio no se describió efecto sobre la diferenciación morfológica, experimentos más recientes muestran que el mutante *ΔabrB1/B2* (o simplemente *ΔabrB* en adelante) produce micelio aéreo y esporula más pronto que la cepa silvestre (Figura I.11). No obstante, el fenotipo parece ser bastante dependiente del medio de cultivo (Minatelli, 2015; Sanz, 2014).

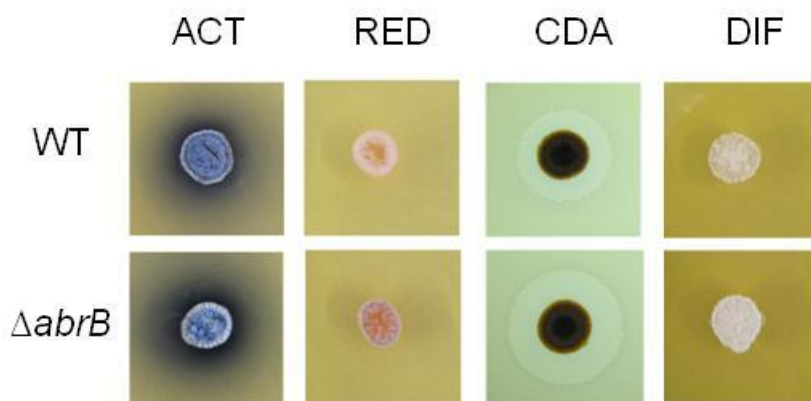


Figura I.11. Producción de los antibióticos ACT (medio R2YE), RED (R2YE) y CDA (NA), así como diferenciación morfológica, DIF (YEPD), en la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta abrB$ (Minatelli, 2015).

4.1.3 AbrC

Este sistema resulta un tanto peculiar ya que está formado por dos HK, AbrC1 (*SCO4598*) y AbrC2 (*SCO4597*), y un RR (*SCO4596*). Se encuentra conservado en más de 20 especies del género, aunque actualmente se desconoce la posible señal o señales que actúan de estímulo. Bases de datos como <http://www.p2cs.org/> consideran los tres elementos como huérfanos, ya que existen espacios entre estos genes que podrían servir como promotores de cada uno de ellos. Sin embargo, experimentos de qRT-PCR han demostrado que las dos HK se transcriben como una única unidad, mientras AbrC3 se transcribiría de forma independiente (Rodríguez et al., 2015).

El sistema AbrC1/C2/C3 (abreviado AbrC), al contrario que los casos anteriores, es un sistema regulador positivo. La delección del sistema al completo causa una disminución en la producción de antibióticos y un retraso en la diferenciación morfológica (Figura I.12). Sin embargo, al eliminar de forma individual cada uno de sus tres componentes, se pudo apreciar que el mutante de la HK AbrC1 presentaba justamente el fenotipo opuesto, causando una mayor producción de antibióticos. Esto parecería indicar que, mientras que la HK AbrC2 sería la encargada de fosforilar al RR AbrC3, AbrC1 estaría implicada más bien en controlar el estado de fosforilación de la misma desfosforilándola. Así, en el mutante $\Delta abrC1$, la AbrC2 estaría activando a AbrC3, pero al carecer de AbrC1 para desfosforilarla y así inactivarla, se acumularía AbrC3 activo que se encontraría ejerciendo su control positivo sobre la producción de antibióticos y diferenciación (Rodríguez et al., 2015).

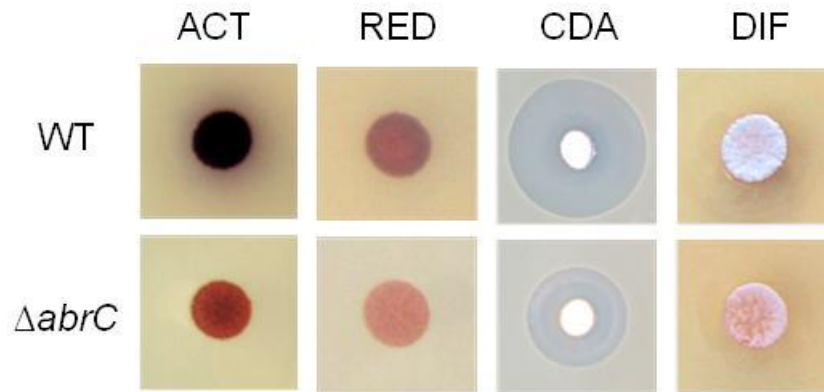


Figura I.12. Producción de los antibióticos ACT, RED y CDA, así como diferenciación morfológica (DIF) en medio NA en la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta abrC$ (Rico, 2014).

En cuanto a AbrC3, se ha podido determinar mediante ensayos de ChIP-chip cual es la secuencia reconocida por este regulador, demostrándose que regula de forma directa la producción de ACT mediante la unión directa al promotor del CSR *actII-ORF4*. Otros de los genes regulados directamente serían *abrC3*, *absR1*, *SCO0736*, *bfr*, *bdtA* y *SCO6809*. A su vez, se ha podido ver cómo otros genes tanto del metabolismo primario como del secundario se encuentran alterados en el mutante, descifrando parcialmente su cascada de regulación (Rico et al., 2014a).

4.1.4 Aor1

Aor1 es un regulador de respuesta huérfano codificado por el gen *SCO2281*. Este regulador comenzó a estudiarse debido a su alta similitud con AbrC3 (Antoraz et al., 2017; Rico et al., 2014a), llegando a sugerirse que podía ser fosforilado por la HK AbrC2 (Wang et al., 2009b; Yepes, 2010). Se pudo ver que la eliminación de Aor1 tenía un efecto pleiotrópico negativo muy fuerte sobre la producción de antibióticos ACT, RED y CDA, así como sobre la diferenciación (Figura I.13). No obstante, la sobreexpresión de este regulador positivo no tenía un efecto claro, al contrario que AbrC3, por lo que su posible papel positivo no ha quedado totalmente demostrado (Tejada, 2015).

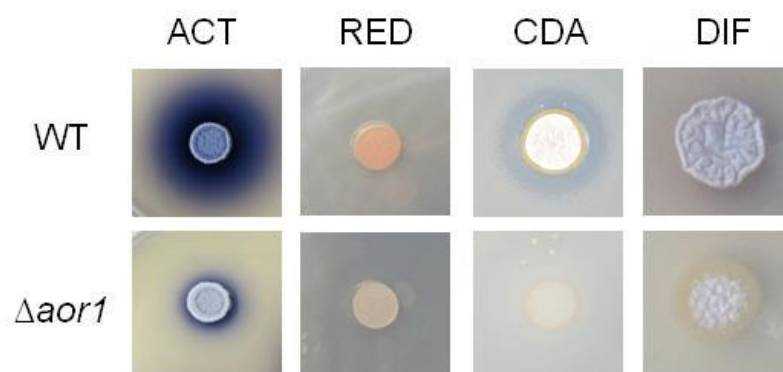


Figura I.13. Producción de los antibióticos ACT, RED y CDA en medio NA, así como diferenciación morfológica (DIF) en NMMP, en la cepa silvestre y el mutante $\Delta aor1$.

4.2 Producción heteróloga de antibióticos y antitumorales

Estos conocimientos relativos a la regulación de antibióticos por parte de sistemas de dos componentes pueden ser empleados de diversas formas con el fin de conseguir mayores tasas de producción de antibióticos o incluso de tratar de describir la producción de nuevos compuestos. Dependiendo de si los sistemas son reguladores positivos o negativos existen diversas opciones.

Si hablamos de activadores, la opción de sobreexpresarlos no sólo es factible en la cepa originaria en la que se estudia el sistema, sino que también puede emplearse sobre otras especies para tratar de mejorar la producción o incluso detectar la producción de compuestos que no se producen en estas de forma natural. Esto es lo que ocurre por ejemplo en el caso de AbrC3, que al ser sobreexpresado en *S. argillaceus* desencadena la síntesis de nuevos compuestos (Becerril et al., 2018; Rico, 2014).

En cuanto a los sistemas negativos, la forma de conseguir este objetivo sería eliminarlos de la cepa hospedadora para la expresión heteróloga de compuestos de interés. Dado que en el caso de *S. coelicolor* los compuestos que veíamos que mejoraban su producción en la caracterización inicial de los mutantes de los TCS estudiados (ACT, RED y CDA) no tienen especial interés clínico o industrial en este momento, se procedió a intentar producir otros compuestos de forma heteróloga en estas cepas mutantes. Así, partiendo de vectores que contengan los clústeres biosintéticos de distintos metabolitos secundarios, se pueden introducir en las distintas cepas para comprobar si estas producen el compuesto buscado y si la producción es mayor a su vez en los mutantes de TCS negativos que en la cepa silvestre.

Esta es la estrategia que se ha llevado a cabo en este trabajo, empleando para ello los correspondientes clústeres biosintéticos cedidos por los Dres. José Antonio Salas y Carmen Méndez (tetracenomicina C, eloramicina, oviedomicina, estaurosporina y rebecamicina) y el Dr. Jesús Cortés (mitramicina), por lo que en el siguiente apartado se detallan brevemente los compuestos que se han intentado producir de forma heteróloga para probar la validez de esta aproximación (Figura I.14).

4.2.1 Compuestos

Tetracenomicina C

La tetracenomicina C es un poliquétido aromático relacionado con las tetraciclinas debido a su estructura tetracíclica linear (Rohr and Zeeck, 1990). Los poliquétidos representan un grupo diverso de compuestos naturales producidos por plantas hongos y bacterias que presentan un considerable interés por su importancia como antibióticos y antitumorales. Su biosíntesis tiene lugar mediante la adición de ácidos carboxílicos de cadena corta mediante reacciones catalizadas por enzimas denominadas Poliquétido Sintetas (PKS) (Hopwood and Sherman, 1990; Katz and Donadio, 1993). Los poliquétidos son compuestos de gran interés desde un punto de vista biotecnológico, ya que mediante biosíntesis combinatoria se pueden producir nuevos compuestos artificiales o productos híbridos, ya sea modificando su estructura principal mediante las poliquétido sintetas, o alterando modificaciones posteriores con transferasas u oxidorreductasas (Rodríguez et al., 2000; Wohlert et al., 1998).

Este antibiótico, producido por un clúster de 12 genes (20 kb, aproximadamente) de *S. glaucescens* (Ortseifen et al., 2017), es activo frente a algunas bacterias Gram positivas, especialmente frente a estreptomicetos, pero no frente a Gram negativas ni hongos. (Weber et al., 1979). Además, la tetracenomicina C también tiene propiedades antitumorales.

Eloramicina

La eloramicina es otro poliquétido aromático con un alto nivel de similitud a la tetracenomicina C (Rohr and Zeeck, 1990). Este compuesto es producido por *Streptomyces olivaceus* Tü2353 (Drautz et al., 1985). La eloramicina, al igual que la tetracenomicina C, presenta actividad antibiótica frente a Gram positivas, así como propiedades antitumorales. Su estructura es parecida a la tetracenomicina C, pero tiene un grupo C-12a-O-metil y en el grupo hidroxilo de C-8 está glicosilado con un residuo

INTRODUCCIÓN

L-ramnosa permetilado. Por lo tanto, para producir eloramycinona no solo son necesarios los 23 genes (25 kb) para producir el poliquétido sino también los necesarios para sintetizar el azúcar y transferirlo (Ramos et al., 2008). En caso contrario, el producto de la ruta es la 8-demetil-tetracenomicina C.

Oviedomicina

Este poliquétido aromático de tipo anguciclinona es sintetizado por *S. antibioticus* de forma natural bajo unas condiciones específicas (Lombó et al., 2004; Méndez et al., 2002). Presenta actividad antitumoral *in vitro*, induciendo la apoptosis en líneas celulares tumorales, por lo que se trata de modificar pasos de la ruta de síntesis para obtener compuestos con una actividad potenciada (Lombó et al., 2009). Su clúster, de 25 kb, está formada por 22 genes (Lombó et al., 2004).

Estaurosporina

La estaurosporina es un indolocarbazol, una familia de productos naturales que constituye una clase de compuestos antitumorales producido por *Streptomyces longisporoflavus*. Estos compuestos se encuentran unidos a un azúcar mediante un enlace glicosídico a uno o a los dos grupos indol del esqueleto principal. La presencia de los azúcares es esencial para la actividad biológica de estos productos (Bailly et al., 1999). La estaurosporina es un potente inhibidor de la proteína quinasa C (Tamaoki et al., 1986), pero no tiene la especificidad necesaria para su aplicación farmacéutica, por lo que actualmente se está tratando de generar nuevos derivados con una especificidad mayor (Sánchez et al., 2005) mediante modificaciones en su ruta de 15 genes.

Rebecamicina

La rebecamicina es un alcaloide indolocarbazol producido por *Lechevaliera aerocolonigenes* (Bush et al., 1987; Nettleton et al., 1985). Es activo frente a Gram positivas y también presenta una fuerte actividad inhibiendo el crecimiento de líneas tumorales y frente a varios tipos de tumores implantados en ratones, donde actúa dañando el DNA gracias a su acción contra la topoisomerasa I y II (Bush et al., 1987; Sánchez et al., 2002). En la actualidad se están intentando diseñar y sintetizar nuevos derivados de la rebecamicina que tengan una actividad antitumoral mejorada (Prudhomme, 2000) y que puedan aplicarse en tratamiento clínicos. Para ello se

modifica el clúster genético, compuesto por 16 genes (25 kb), y la ruta de biosíntesis (Sánchez et al., 2002; Sánchez et al., 2005).

Mitramicina

La mitramicina es un poliquétido aromático producido por *Streptomyces argillaceus* que muestra actividad antibiótica y antitumoral. En los años 60 se evaluó su potencial clínico, viéndose que tenía actividad contra diferentes tipos de cánceres como pueden ser leucemias, linfomas, carcinomas y cáncer de testículo, por lo que se usó brevemente hasta el desarrollo de los actuales tratamientos. No obstante, en los últimos años se ha vuelto a poner el foco sobre ella, estableciéndose dosis, efectos, y llevándose a cabo diferentes ensayos clínicos al respecto (Grohar et al., 2017), por lo que este compuesto podría llegar a ser de gran importancia en futuros tratamientos (Liu et al., 2018b). Su clúster biosintético está formado por un total de 34 genes (40 kb) (Lombó et al., 1999).

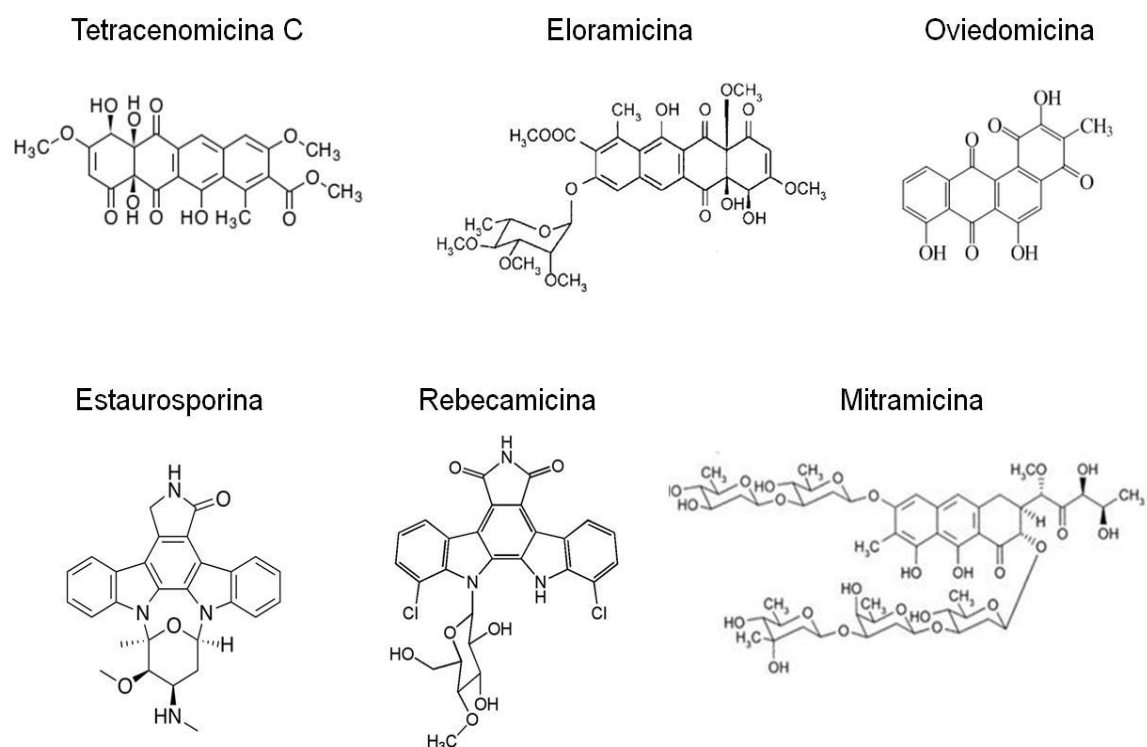


Figura I.14. Estructuras químicas de los compuestos tetracenomicina C, eloramincina, oviedomicina, estaurosporina, rebecamicina y mitramicina.

4.2.2 Producción heteróloga en mutantes de *S. coelicolor*

Para comprobar si se podía mejorar la síntesis de antibióticos produciéndolos de forma heteróloga en nuestras cepas, inicialmente nos centramos tanto en la cepa silvestre M145 como en el mutante *ΔabrA*. Tanto en el caso de la tetracenomicina C como en el de la oviedomicina se vio que había producción del compuesto y que esta era superior en la cepa mutante (Antoraz, 2014; Rico et al., 2014b).

Sin embargo, los compuestos rebecamicina, estaurosporina y eloramicina no pudieron detectarse ni en el mutante ni en la cepa silvestre. Aunque ese hecho puede deberse a múltiples causas, como por ejemplo las condiciones empleadas para la producción del compuesto, se pensó que una posible explicación era que los clústeres biosintéticos endógenos pudieran estar afectando a la producción de estos compuestos, posiblemente por una competencia de precursores (Antoraz, 2014).

Esta hipótesis se basaba en dos hechos. El primero es que cuando se veía producción de oviedomicina y tetracenomicina C, la producción de ACT cesaba por completo. Y en segundo lugar, una de las muestras analizadas del mutante *ΔabrA* mostraba un cromatograma de HPLC en el que se diferenciaban tanto una serie de picos que no correspondían ni a la estaurosporina ni a intermediarios de la ruta, como también una línea más o menos continua sin picos claros que parecería corresponderse con compuestos semejantes a la ACT (Figura I.15), probablemente productos intermedios mal formados o plegados.

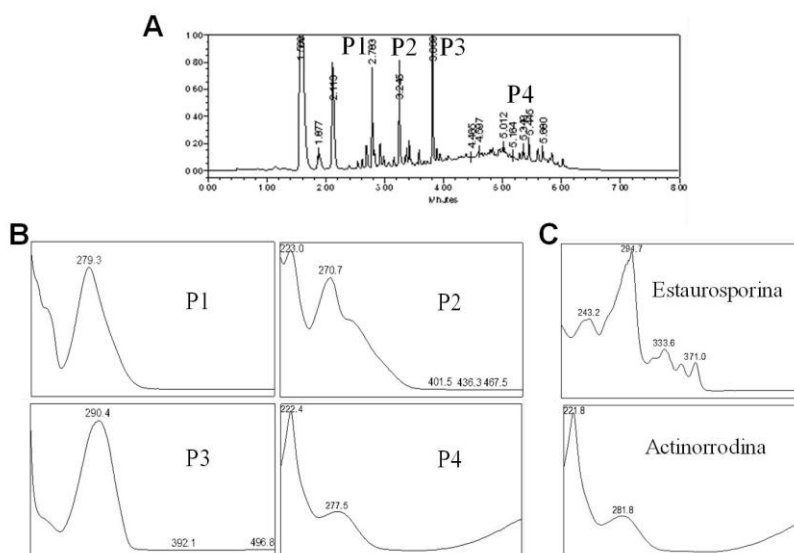


Figura I.15. A: Cromatograma de una muestra de *S. coelicolor* *ΔabrA* con el cósmido portador de la ruta de la estaurosporina. B: Barrido de los diferentes picos observados. C: Curva patrón de estaurosporina y ACT.

Por lo tanto, en este trabajo se decidió abordar la mejora de la producción de los diferentes compuestos mencionados mediante el uso de los mutantes en los TCS descritos en nuestro grupo, utilizando para ello cepas en las cuales no se producen los antibióticos endógenos.

INTRODUCCIÓN

Objetivos

El **objetivo principal** de este trabajo consiste en mejorar genéticamente cepas de *S. coelicolor* para producir metabolitos secundarios de forma heteróloga eliminando sistemas de dos componentes con función reguladora negativa, así como profundizar en el estudio del papel que juegan en la regulación de la producción de antibióticos el sistema de dos componentes AbrA y el regulador de respuesta huérfano Aor1. Para ello se han abordado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Generación de nuevas cepas hospedadoras mediante la construcción de una batería de mutantes de los sistemas de dos componentes AbrA, AbrB y la histidina quinasa AbrC1.

2. Utilización de las cepas generadas para producir compuestos de forma heteróloga.

3. Análisis de las diferencias de expresión génica entre la cepa mutante Δ *abrA* y la cepa silvestre *S. coelicolor* M145.

4. Estudio de los cambios en la expresión génica en *S. coelicolor* derivados de la delección del gen *aor1*.

OBJETIVOS

Resultados

CAPÍTULO 1

PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTIBIÓTICOS Y ANTITUMORALES

Con el fin de llevar a cabo el primer objetivo, consistente en generar nuevas cepas hospedadoras capaces de sintetizar distintos compuestos de forma heteróloga, se partió de la hipótesis de que la eliminación de aquellos TCS con un efecto regulador negativo sobre la producción de antibióticos, tales como habían resultado ser los TCS AbrA, AbrB y la HK AbrC1, permitiría incrementar los niveles de producción.

Como se mostró en la sección “Antecedentes”, pese al efecto beneficioso que parecían tener algunas de estas mutaciones sobre la producción de compuestos como la oviedomicina o la tetracenomicina C, en otros casos no se obtuvo producción en ninguna de las cepas empleadas, hecho por el cual se decidió comenzar tratando de conseguir las mejoras necesarias para poder producir el mayor abanico de compuestos posible.

Habida cuenta de que, tal y como se señaló anteriormente, el principal punto de conflicto parecía estar relacionado con la producción de compuestos endógenos, principalmente la ACT, se quiso valorar la opción de eliminar los clústeres de producción de los antibióticos propios en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. Así, se buscaron distintas alternativas en la literatura para tratar de solventar este problema.

Si bien todos los clústeres biosintéticos empleados de forma heteróloga en este trabajo se encuentran clonados en plásmidos o cósmidos replicativos con bajo número de copias (con excepción de la tetracenomicina C, en alto número de copias, y de la mitramicina, en un vector integrativo) (Materiales y métodos), con el fin de facilitar la lectura no se hará mención directa a los nombres de dichos plásmidos, sino que se nombrarán en función del compuesto final de la ruta o, en su defecto, su abreviatura.

1.1 Empleo de las cepas M1146 y M1154

Dentro de las distintas cepas de *S. coelicolor* que carecen de los clústeres endógenos de producción de antibióticos descritos, las que se consideraron más

RESULTADOS

apropiadas para llevar a cabo este trabajo fueron las desarrolladas por los Dres. Juan Pablo Gómez-Escribano y Mervyn Bibb (Gómez-Escribano and Bibb, 2011). En concreto, dentro de las múltiples opciones, se seleccionaron dos: la cepa M1146, en la que se habían eliminado los clústeres de producción de ACT, RED, CDA y CPK; y la cepa M1154, que además de carecer de los mismos clústeres tenía dos mutaciones puntuales en los genes *rpoB* y *rpsL* (codificantes para la subunidad β de la RNA polimerasa y para la proteína ribosomal S12, respectivamente), las cuales habían sido previamente descritas por su efecto positivo sobre la producción de antibióticos (Hu et al., 2002; Okamoto-Hosoya et al., 2000; Shima et al., 1996). Ambas cepas se habían obtenido mediante mutaciones sucesivas a partir de la cepa de *S. coelicolor* M145 usada rutinariamente en su laboratorio, que se empleó como control en los distintos experimentos que siguieron.

Estas cepas, M1146 y M1154, habían demostrado su utilidad para la síntesis heteróloga de compuestos cuya producción es escasa en la cepa silvestre, tal y como se muestra tanto en el estudio original en el caso del cloranfenicol y la congocidina como en otros posteriores (Gómez-Escribano and Bibb, 2011, 2014). Tanto las cepas M1146 y M1154 como el control M145 correspondiente fueron proporcionadas por el Dr. Juan Pablo Gómez Escribano para probar la hipótesis de partida y generar sobre ellas las mutaciones en los TCS mencionados.

Durante las primeras etapas del trabajo con estas cepas en nuestro laboratorio, consistentes en la obtención de esporas para usar a lo largo de los experimentos, se pudo comprobar que el fenotipo de las cepas M1146 y M1154, al carecer de las rutas de producción de los compuestos coloreados ACT y RED, presentaban una coloración blanquecina que contrastaba con la roja o azul de la cepa silvestre M145 a diferentes tiempos. No obstante, se apreció que cuando dichas cepas mutantes se mantenían durante un periodo de tiempo de uno a dos días en las condiciones ambientales del laboratorio estas adquirirían una tonalidad claramente amarilla que no podía apreciarse en la cepa silvestre M145.

Este efecto, que no podía adjudicarse al compuesto amarillo yCPK debido a que en ambas cepas se había delecionado la ruta biosintética del CPK, no se encontraba descrito en los artículos en los que se generaron dichas cepas ni en otros posteriores sobre las mismas, por lo que nos pareció interesante indagar sobre su origen. Una

búsqueda bibliográfica más detallada permitió orientar la búsqueda hacia compuestos de tipo carotenoide (Takano et al., 2005b).

Curiosamente, dichos compuestos, que de forma general no se aprecian en cepas silvestres a causa de la coloración de la ACT o la RED, se produce en unas condiciones muy concretas que requieren la presencia de luz con una longitud de onda entre 400 y 600 nm. Por ello, se pudo comprobar que placas expuestas a condiciones de luz presentan dicha pigmentación amarilla mientras que las que se crecen en oscuridad no (Figura R.1). Este efecto, que también es apreciable en medios líquidos, fue corroborado mediante análisis por HPLC (Materiales y métodos), que determinó la presencia de β -caroteno y otros carotenoides (Figura R.1).

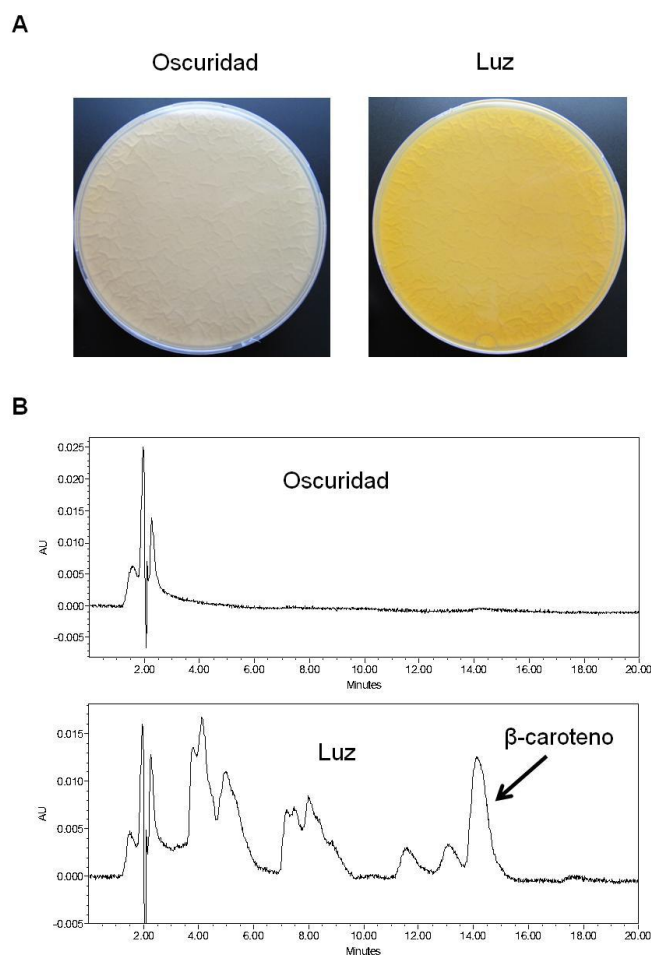


Figura R.1. A: Ensayo en placas de medio R2YE con césped de la cepa M1146 crecidas 2 días a 30 °C y expuestas a condiciones de oscuridad (izquierda) y luz (derecha) durante 1 día. B: Cromatogramas a 456 nm de extractos obtenidos en el experimento. El pico presente a los 14 minutos en condiciones de luz corresponde al β -caroteno.

1.2 Producción heteróloga en las cepas M1146 y M1154

El primer paso dado a la hora de ensayar si las cepas M1146 y M1154 eran mejores en la producción de compuestos de forma heteróloga en nuestras manos consistió en introducir mediante transformación en dichas cepas (y en su correspondiente control M145) los vectores portadores de la ruta de la oviedomicina y la tetracenomicina C. Se pudo observar que dichos compuestos se producían en las tres cepas empleadas (Figura R.2) aunque sin llegar a detectarse un incremento apreciable de producción en las cepas mutantes (Anexo I). Por otra parte, sí se pudo volver a advertir cómo la producción de oviedomicina bloqueaba la producción de ACT observable en el control de la cepa M145 (Rico et al., 2014b), si bien este efecto no se llegaba a dar en el caso de la tetracenomicina C al no darse producción de ACT debido al medio de cultivo empleado.

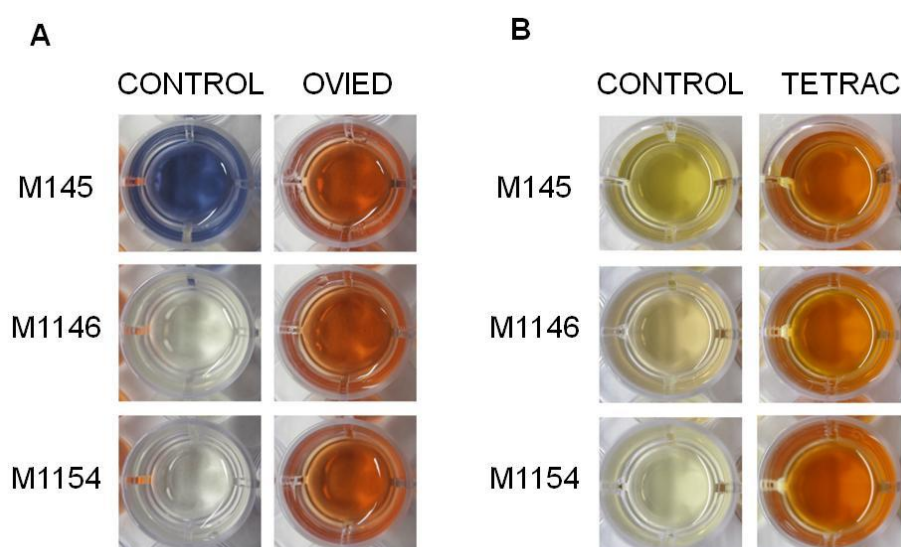


Figura R.2. A: Sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de cepas portadoras del clúster de la oviedomicina (OVIED) o sin él (CONTROL) crecidos en NMMP líquido tras 4 días de crecimiento. B: Sobrenadantes obtenidos de cultivos de cepas portadoras del clúster de la tetracenomicina C (TETRAC) o sin él (CONTROL) crecidos en YEPD líquido tras 4 días de crecimiento. Los controles portan los correspondientes vectores vacíos.

Una vez demostrada la capacidad de estas cepas mutantes para producir compuestos de forma heteróloga, aunque no existiera un incremento significativo en la producción respecto a la estirpe silvestre en estos dos casos, se procedió a comprobar si

eran capaces de sintetizar aquellos antibióticos que no se habían conseguido producir previamente en la cepa silvestre M145 que manteníamos en nuestro laboratorio.

Así, al transformar las tres cepas con las rutas de la eloramycinina y la rebecamicina, se pudo observar que tanto la cepa M1146 como la M1154 sí producían estos compuestos (Figura R.3). Curiosamente, de forma contraria a lo visto en experimentos previos con la cepa silvestre M145 de nuestro laboratorio, en los que no había producción, la cepa silvestre M145 isogénica con los mutantes y portadora de la ruta de la eloramycinina sí producía este compuesto (Anexo I), aunque ello no conllevaba el bloqueo en la producción de ACT que se había observado en otros casos, existiendo una mezcla de compuestos que se aprecia por la coloración parduzca de sus sobrenadantes (Figura R.3). Si bien su nivel de producción era semejante al de la cepa M1146, en ambos casos era notablemente inferior al de la cepa M1154 (Anexo I). Por su parte, la producción de rebecamicina era ligeramente superior en la cepa M1146 con respecto a la M1154, y no se observaba en la cepa silvestre M145.

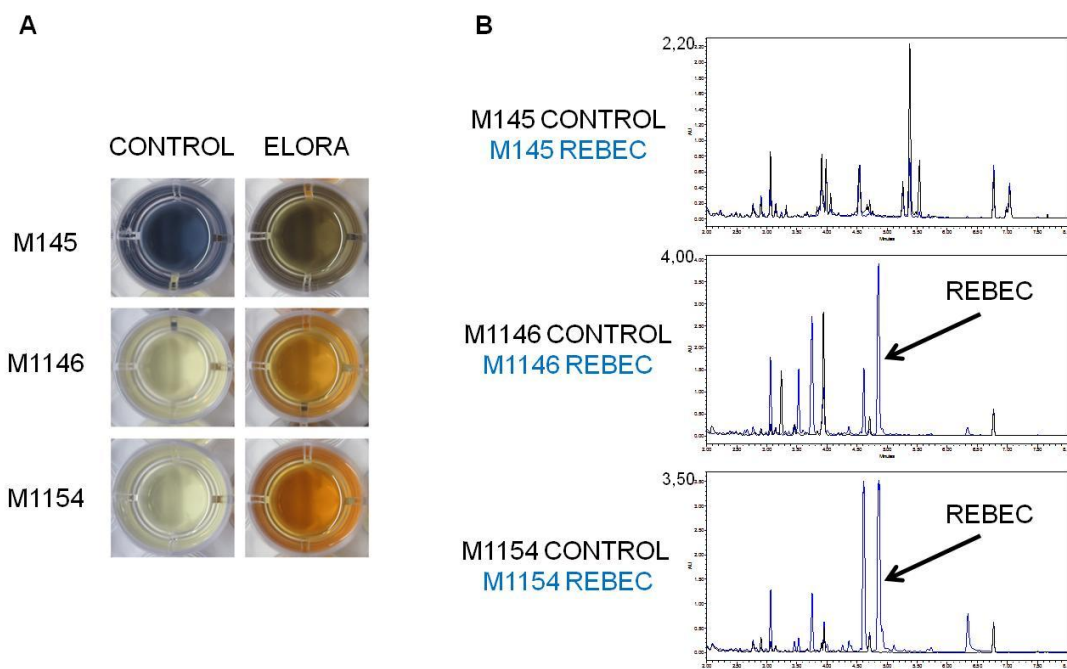


Figura R.3. A: Sobrenadantes obtenidos de cultivos de cepas portadoras del clúster de la eloramycinina (ELORA) o sin él (CONTROL) crecidos 3 días en R5A líquido. B: Cromatogramas realizados a partir de extractos obtenidos de cultivos de cepas portadoras del clúster de la rebecamicina (REBEC) o sin él (CONTROL) en R5A líquido a 3 días de crecimiento. Los controles portan los correspondientes vectores vacíos.

RESULTADOS

Sin embargo, tras haber probado cuatro medios diferentes (R2YE, R5A, LB e YEPD), no se pudo llegar a encontrar producción de otra de las rutas introducidas, la de la estaurosporina, en ninguna de las cepas ensayadas (Figura R.4, Anexo I).

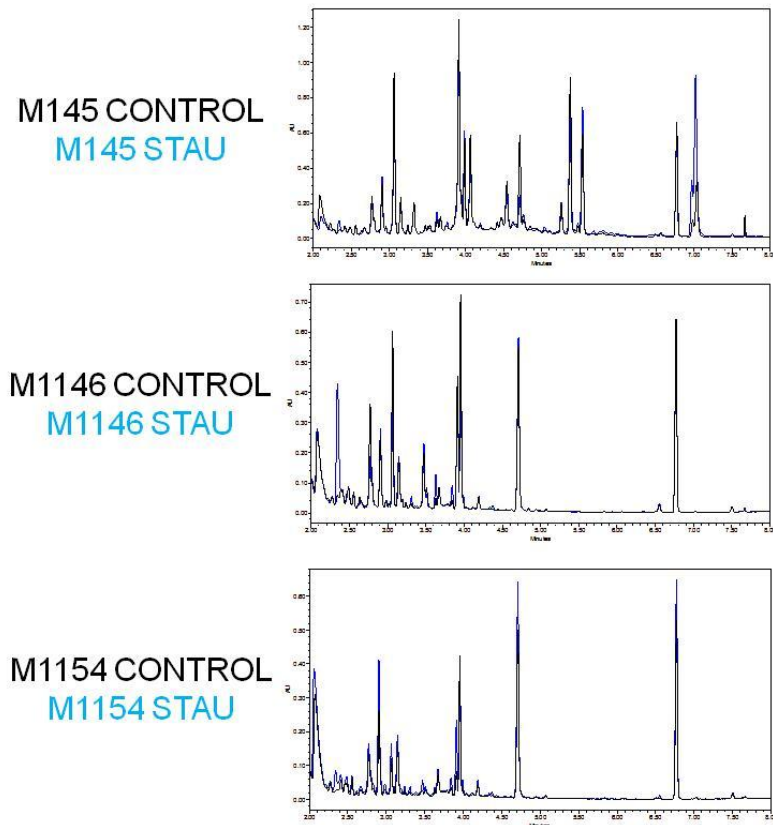


Figura R.4. Cromatogramas realizados a partir de extractos obtenidos de cultivos de cepas portadoras del clúster de la estaurosporina (STAU) o sin él (CONTROL) en R5A líquido. Los controles portan el correspondiente vector vacío.

Estos resultados indicaban por lo tanto que, efectivamente, el uso de las cepas mutantes M1146 y M1154 permitía mejorar la producción de algunos compuestos con respecto a la cepa silvestre M145, hecho por el cual se procedió a continuar con el siguiente paso de mejora consistente en eliminar los TCS reguladores negativos *AbrA*, *AbrB* y la HK *AbrC1* sobre estas cepas tanto de forma individual como combinadamente, generando una batería nueva de mutantes que podrían servir como cepas hospedadoras mejoradas.

1.3 Construcción de una batería de mutantes en TCS con el sistema CRISPR/Cas9 sobre las cepas M145, M1146 y M1154

De forma rutinaria, la obtención de mutantes de *Streptomyces* en nuestro laboratorio se llevaba a cabo empleando la metodología REDIRECT. Este método (Gust et al., 2003; Gust B, 2002) reemplaza los ORF de interés por un *cassette* de resistencia generado por PCR en dos pasos: el primer reemplazamiento tiene lugar en *E. coli* sobre el cósmido con el correspondiente fragmento del DNA de *Streptomyces*; mientras que en la segunda fase dicho cósmido mutado se transfiere a *Streptomyces*, donde ocurre un segundo proceso de recombinación homóloga. De esta manera se reemplaza el gen o genes de interés por un *cassette* de resistencia a antibióticos, apramicina normalmente, que en etapas posteriores puede ser eliminado si se desea un mutante libre de resistencia a antibióticos, pero en el que queda una pequeña cicatriz (SCAR) de 81 nucleótidos.

Sin embargo, a pesar de que al haber estudiado previamente estos TCS se disponía de los cósmidos mutados carentes de los distintos TCS en los que se centra este trabajo (lo cual reduciría considerablemente el tiempo que se tardaría en llevar a cabo las mutaciones con el método REDIRECT con respecto a si hubiera que comenzar desde cero), el proceso requiere una gran cantidad de tiempo, especialmente a la hora de obtener mutantes múltiples, como era nuestro objetivo.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta que REDIRECT requiere de múltiples pasos de esporulación para seleccionar los dobles recombinantes, y que las cepas M1146 y M1154 presentan unos niveles de esporulación bastante reducidos (Gómez-Escribano and Bibb, 2011). Además, obtener los mutantes SCAR es un paso necesario no sólo para poder transformar dichas cepas con los cósmidos portadores de clústeres biosintéticos, sino también para realizar otras mutaciones sobre dichas cepas de ser necesario. La obtención de mutantes SCAR, además, había resultado problemática en otras ocasiones en que, pese al empeño puesto en eliminar el *cassette* de resistencia a apramicina, no se habían llegado a obtener dobles recombinantes de *Streptomyces* sin el mismo.

Por todo ello, se decidió poner a punto alguno de los sistemas CRISPR/Cas9 recientemente desarrollados para *Streptomyces* (Cobb et al., 2014; Huang et al., 2015; Tong et al., 2015; Zeng et al., 2015). Esta metodología de mutación aprovecha el

RESULTADOS

sistema inmune bacteriano de *Streptococcus pyogenes*, el cual realiza un corte de forma dirigida en la doble cadena de DNA. Requiere de dos elementos: una nucleasa Cas9, responsable del corte de la doble cadena; y un RNA guía, que se encarga tanto de la especificidad del reconocimiento de la secuencia como de reclutar a la nucleasa Cas9. De esta manera, el corte se puede dirigir a una región concreta del genoma, obligando a *Streptomyces* a reparar esa rotura mediante recombinación homóloga. Esto permite modificar de forma precisa el DNA genómico si, al mismo tiempo que se provoca el corte en un gen concreto que queramos eliminar, se proporciona además un molde generado por PCR que consista en las regiones adyacentes al gen o genes que se pretendan deleccionar pero que carezca del mismo (Figura R.5). Así, en comparación con el método REDIRECT, se pueden generar mutantes en un tiempo más reducido, con una mayor precisión, y además sin introducir ningún gen de resistencia en el cromosoma.

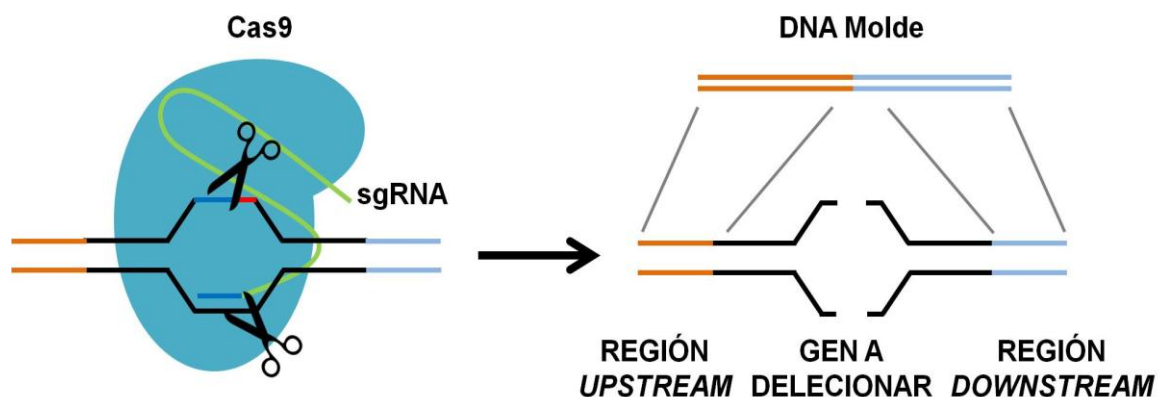


Figura R.5. Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 para generar mutantes de deleción: Izquierda, el RNA-guía dirige a la nucleasa Cas9 a una secuencia específica de un gen concreto donde se produce una doble rotura de la cadena de DNA. Derecha, la rotura se repara mediante recombinación homóloga con un DNA molde que contenga las regiones flanqueantes; si dicho molde carece de la zona que se quiere deleccionar se obtiene un mutante de deleción.

Se decidió comenzar abordando la mutación del sistema AbrA sobre la cepa M145 de nuestro laboratorio, ya que al tener disponible el mismo mutante obtenido por

el método REDIRECT y estar ampliamente estudiado sería posible comprobar la validez del método de mutación CRISPR/Cas9, cuyo mayor inconveniente podrían ser posibles *off-targets*, cortes en zonas indeseadas. Tras haber probado el sistema desarrollado por Cobb y colaboradores (Cobb et al., 2014) con escaso éxito (ver “Discusión”), el sistema de Tong y colaboradores (Tong et al., 2015) permitió obtener el mutante M145 *ΔabrA* con relativa facilidad.

Para ello, primeramente, se buscó una secuencia guía dentro de los genes del sistema *AbrA* para generar el corte necesario para provocar la recombinación utilizando la página desarrollada para tal fin (http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy_scoeli/). Así, de entre todas las guías disponibles sugeridas por el programa, se eligió aquella con la secuencia GTCACGGTGACGCTCCACTA, por ser la que menos posibilidad de presentar *off-targets* tenía. Esta secuencia, que en el DNA genómico debe ir seguida de tres nucleótidos NGG para que se pueda producir el corte, se insertó en el plásmido pCRISPR-Cas9 como parte de una secuencia amplificada por PCR que incluía todo lo necesario para generar el RNA guía al completo (tanto la secuencia que marca el corte específico como aquella encargada de reclutar a la nucleasa Cas9), dando lugar así al plásmido pCRISPR-Cas9-sgA (Figura R.6).

Por otra parte, también se generó el molde con el que reparar la rotura mediante PCR. Para ello, se amplificaron por separado las secuencias situadas inmediatamente adyacentes a los genes del sistema *AbrA* (1 kb en cada lado), tanto *upstream* como *downstream*, con una región solapante que permitió unirlos en un único molde mediante una segunda PCR. Este fragmento de 2 kb se insertó en el plásmido pCRISPR-Cas9-sgA para generar el plásmido final pCRISPR-Cas9-*AbrA* (Figura R.6). Todos estos plásmidos tienen un origen de replicación termosensible, lo que permite su eliminación por incubación a 37 °C.

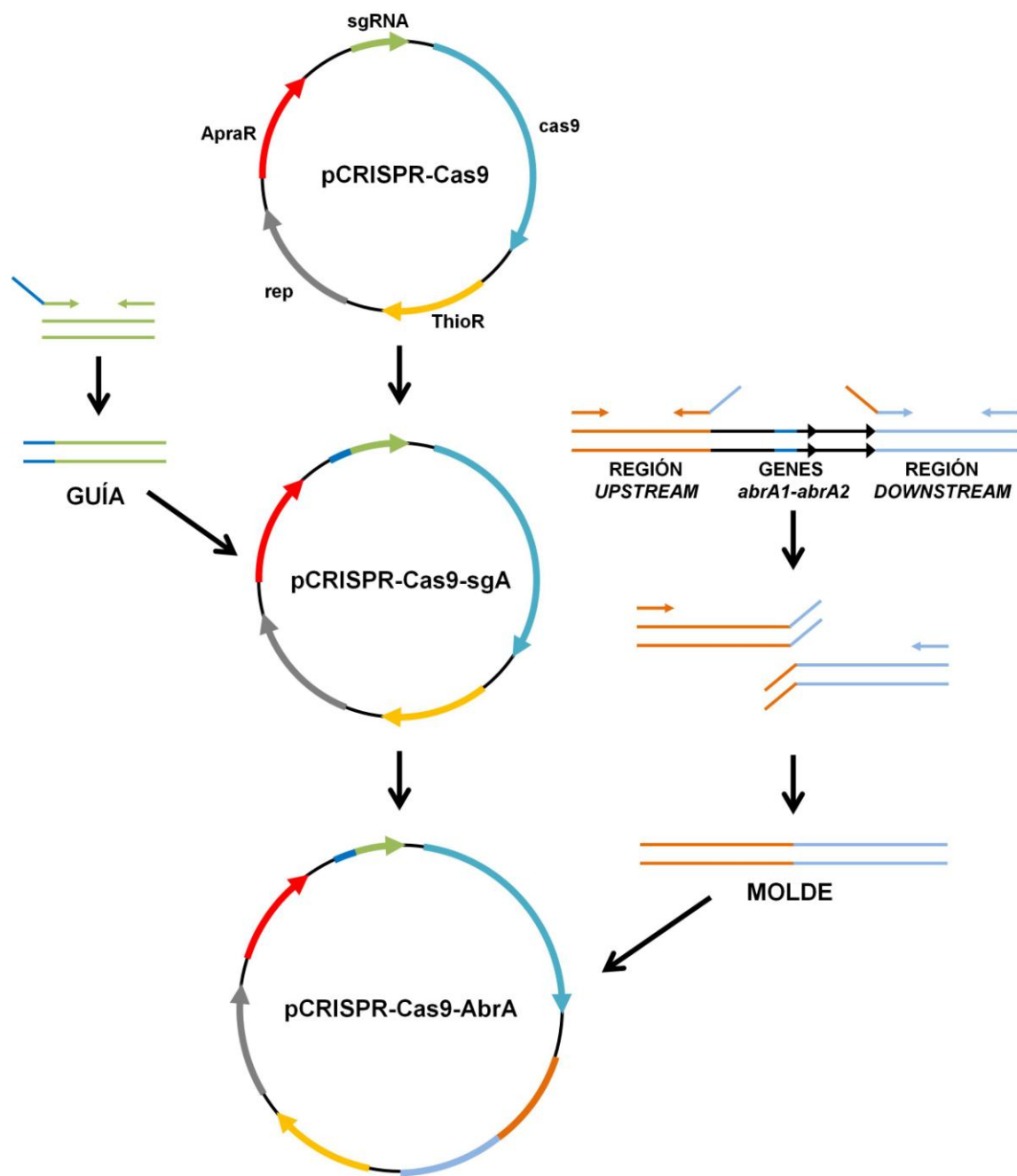


Figura R.6. Esquema del proceso seguido para la construcción del plásmido pCRISPR-Cas9-AbrA. En los plásmidos se muestran las regiones codificantes para el RNA guía (sgRNA: verde, la parte encargada de reclutar a la nucleasa; azul oscuro, la secuencia que dirige el corte), la nucleasa Cas9 (verde azulado), el molde (naranja y azul claro), los genes de resistencia a tiostreptona (ThioR: amarillo) y apramicina (ApraR: rojo) y el origen de replicación en *Streptomyces* (rep: gris). A la izquierda y derecha de los plásmidos se muestra el esquema de la construcción de guía y molde respectivamente; las flechas sobre las líneas representan los oligonucleótidos usados en cada paso.

Una vez realizadas estas construcciones, los plásmidos pCRISPR-Cas9, pCRISPR-Cas9-sgA y pCRISPR-Cas9-AbrA se introdujeron individualmente en la cepa de *E. coli* ET12567 pUZ8002 como paso previo al proceso de conjugación interespecífica por el que se transfieren a la cepa de *S. coelicolor* que se quiere mutar. Aunque el plásmido pCRISPR-Cas9-AbrA es el único necesario para generar los mutantes, tanto el vector pCRISPR-Cas9 como el plásmido intermedio pCRISPR-Cas9-sgA pueden servir como control de la técnica. El plásmido original pCRISPR-Cas9 dio lugar a un alto número de colonias en *S. coelicolor*; la construcción pCRISPR-Cas9-sgA, que contenía la secuencia guía que dirigía el corte pero en la cual no se había introducido el molde con el que repararla apenas dio lugar a ningún conjugante; y el plásmido final pCRISPR-Cas9-AbrA, en el que se producía la rotura pero existía un molde con el que repararla, generó un número intermedio de conjugantes que teóricamente tendrían la mutación deseada (Figura R.7).

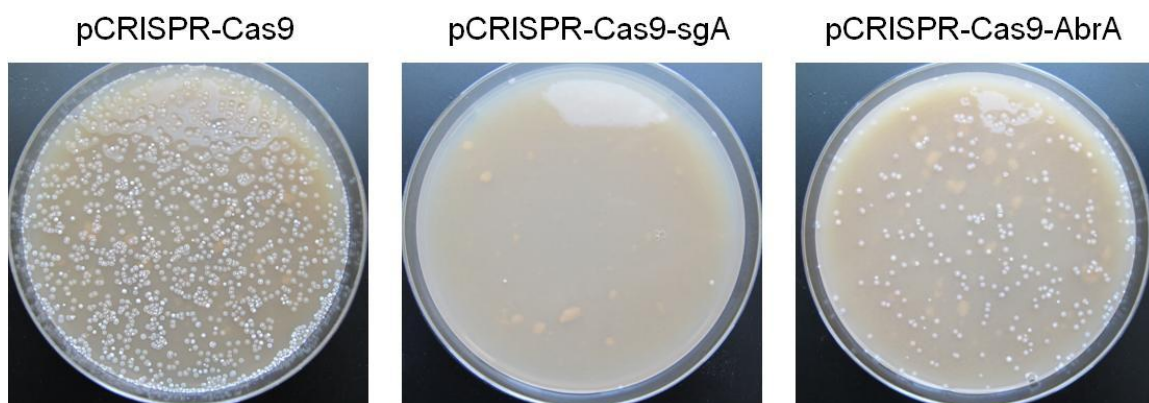


Figura R.7. Placas resultantes de la conjugación con el plásmido desarrollado por Tong (pCRISPR-Cas9: control vacío) y sus derivados para mutar AbrA (pCRISPR-Cas9-sgA: sólo con guía; pCRISPR-Cas9-AbrA: con guía y molde).

Tras eliminar este plásmido termosensible, pCRISPR-Cas9-AbrA, de los conjugantes mediante el crecimiento de los mismos a 37 °C durante 48 horas en medio TSB (ver “Materiales y Métodos”), se comprobaron varios de los posibles mutantes M145 Δ abrA obtenidos mediante PCR. Para este fin, tras obtener el DNA genómico de 3 clones, se emplearon tanto oligonucleótidos externos (AY-061/S-004) (Tabla M.4) a la zona eliminada tras la mutación, que en los mutantes generasen bandas de menor tamaño (1,7 kb) que en la cepa silvestre (3,5 kb); como oligonucleótidos internos (AY-

RESULTADOS

040/AY-070) (Tabla M.4), que al hibridar dentro del sistema solamente darían un fragmento de 0,5 kb en la cepa silvestre y ninguno en el mutante por haberlo perdido. De esta manera se determinó que todas las colonias mutantes seleccionadas eran correctas, quedando demostrado que este sistema era totalmente válido para generar deleciones de una forma altamente eficiente (Figura R.8).

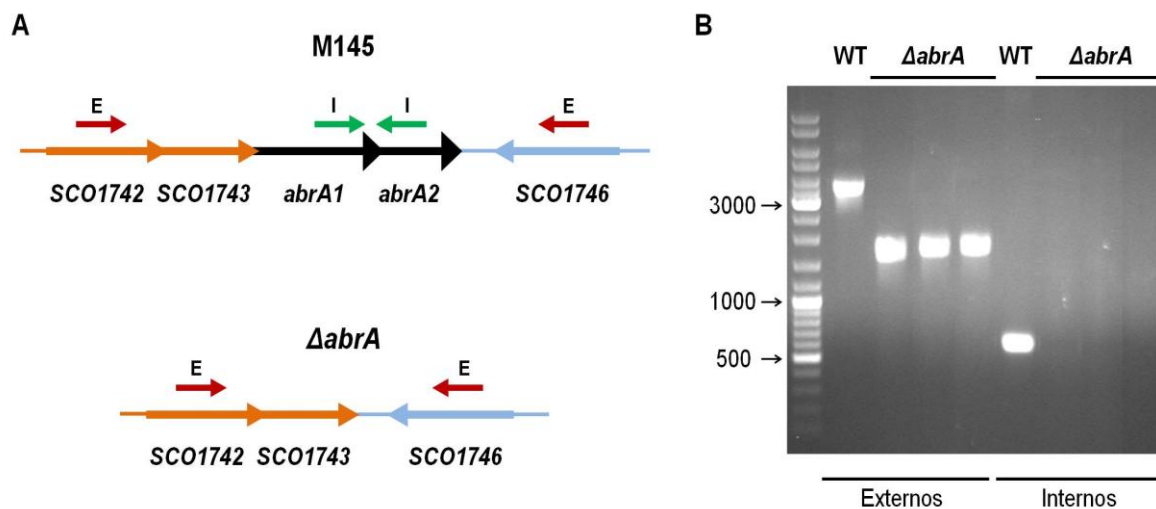
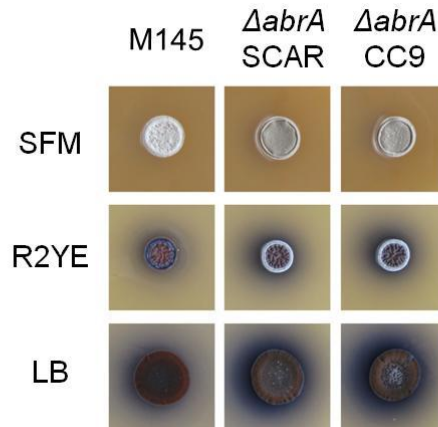


Figura R.8. A: Esquema de la región génica del sistema AbrA en la cepa silvestre M145 y mutante $\Delta abrA$ con los oligos externos (E) e internos (I) empleados en las comprobaciones. B: Análisis por PCR de tres colonias mutantes $\Delta abrA$ resultantes de la conjugación con pCRISPR-Cas9-AbrA en comparación con la cepa silvestre (WT).

Una vez obtenido este mutante, se decidió comprobar si su fenotipo coincidía con el presentado por su versión equivalente generada mediante REDIRECT. A fin de diferenciar los nuevos mutantes CRISPR-Cas9 de los obtenidos por el método REDIRECT los denominaremos abreviadamente CC9 y SCAR respectivamente.

Como se observa en la Figura R.9, se pudo determinar que no existían diferencias apreciables entre el mutante M145 $\Delta abrA$ CC9 y el M145 $\Delta abrA$ SCAR, en los diferentes medios tanto sólidos como líquidos, ni en cuanto a producción de antibióticos ACT y RED ni tampoco con respecto a su diferenciación morfológica.

A



B

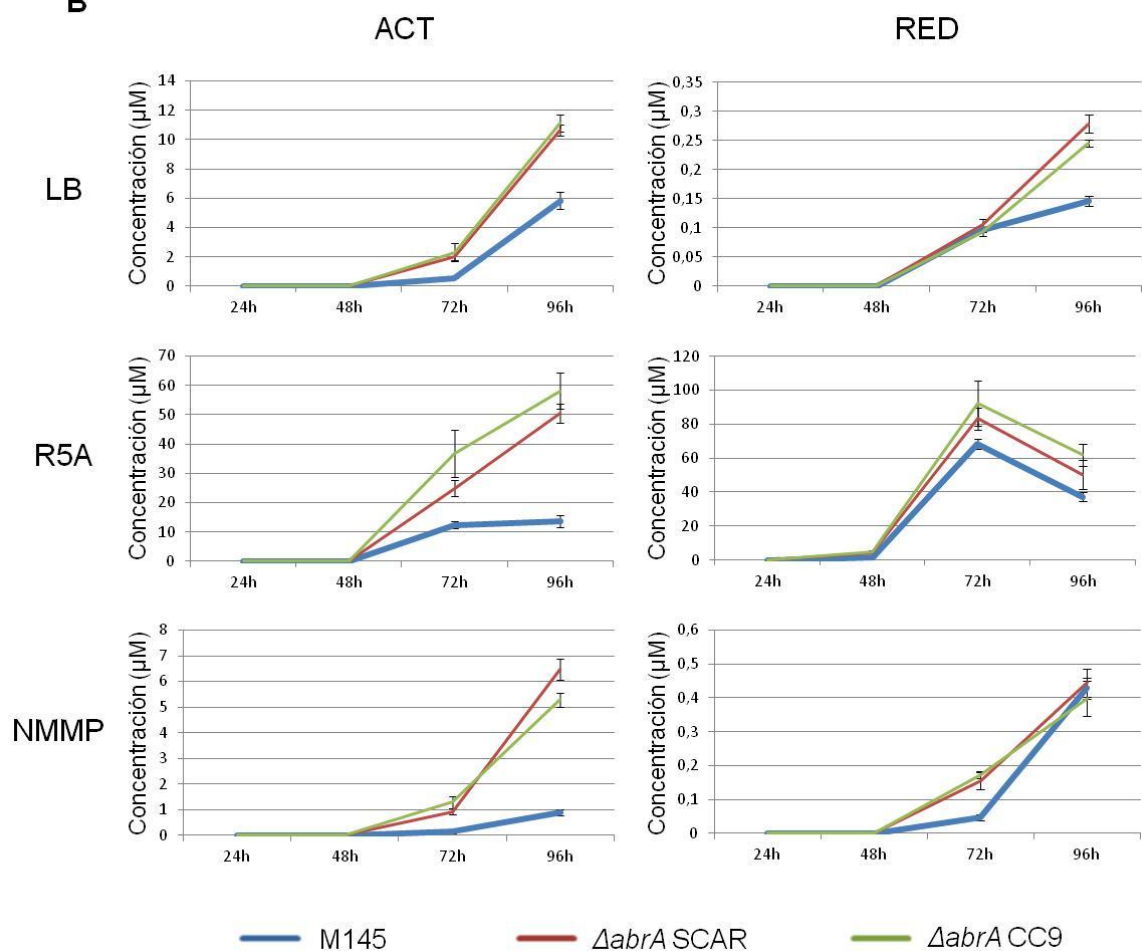


Figura R.9. A: Comparación fenotípica en medios SFM (3 días de crecimiento), R2YE (4 días) y LB (8 días), entre las cepas silvestre y dos mutantes $\Delta abrA$, el obtenido por el método REDIRECT (SCAR) y el obtenido por el método CRISPR/Cas9 (CC9). B: Producción de ACT y RED por las tres cepas en medios líquidos indicados. Las barras de error corresponden a tres réplicas.

RESULTADOS

Gracias a la puesta a punto de este sistema, se abordó la obtención de los mutantes en los TCS AbrA, AbrB y de la HK AbrC1, todas ellas mutaciones teóricamente beneficiosas para la producción de antibióticos, sobre las cepas M1146 y M1154, así como en su cepa isogénica M145. El planteamiento inicial consistía en obtener los mutantes individuales, los mutantes dobles y los triples de estos sistemas para aprovechar los efectos positivos de estas deleciones en distintos casos. De esta forma, se generaron las siete combinaciones posibles de mutantes con estos tres sistemas sobre las cepas M145, M1146 y M1154 generando un total de 21 cepas mutantes (Tabla R.1).

Tabla R.1. Combinaciones de mutantes de TCS hechas sobre cada una de las cepas M145, M1146 y M1154.

Genes delecionados	<i>abrA1/A2</i> (<i>abrA</i>)	<i>abrB1/B2</i> (<i>abrB</i>)	<i>abrC1</i>
<i>abrA1/A2</i> (<i>abrA</i>)	Δ <i>abrA</i>	Δ <i>abrA</i> Δ <i>abrB</i>	Δ <i>abrA</i> Δ <i>abrC1</i>
<i>abrB1/B2</i> (<i>abrB</i>)		Δ <i>abrB</i>	Δ <i>abrB</i> Δ <i>abrC1</i>
<i>abrC1</i>			Δ <i>abrC1</i>
	Δ <i>abrA</i> Δ <i>abrB</i> Δ <i>abrC1</i>		

Para ello se diseñaron las correspondientes guías de RNA y los moldes para cada uno de los sistemas de forma individual y se generaron dos nuevos plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9: pCRISPR-Cas9-AbrB y pCRISPR-Cas9-AbrC1 (Materiales y métodos). Estos, junto con el plásmido previamente generado, pCRISPR-Cas9-AbrA, se introdujeron de forma individual en las tres cepas utilizadas, M145, M1146 y M1154 para generar todos los mutantes sencillos. En todos los casos se realizaba también la conjugación con el plásmido vacío y con el plásmido sólo con la guía como controles de la efectividad, tanto de la guía elegida como de la reparación del daño con el molde. Así mismo, se procedió a provocar la pérdida del plásmido termosensible incorporado, y a realizar el aislamiento del DNA genómico de los distintos conjugantes. Una vez obtenidos y comprobados estos mutantes mediante PCR utilizando oligonucleótidos internos y externos (Tabla M.4) de forma similar a la descrita anteriormente, se procedió a la obtención de los mutantes dobles.

Los distintos mutantes dobles \DeltaabrAabrB y $\DeltaabrA\DeltaabrCI$ se obtuvieron por la introducción de los plásmidos pCRISPR-Cas9-AbrB y pCRISPR-Cas9-AbrCI en las tres cepas \DeltaabrA , mientras que el mutante $\DeltaabrB\DeltaabrCI$ se obtuvo introduciendo el plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB sobre las cepas \DeltaabrCI , siendo comprobados todos los mutantes por ensayos de PCR.

Por último, las cepas mutantes triples se obtuvieron introduciendo en plásmido pCRISPR-Cas9-AbrB en las cepas \DeltaabrAabrCI de las cepas M145, M1146 y M1154 y se procedió de igual modo a su comprobación.

Resaltar que, a pesar de que la construcción de las cepas se extendió durante un periodo considerable de tiempo, todo el proceso de obtención de mutantes es mucho más rápido que con el método REDIRECT, además de que este sistema no deja huella en el genoma. Sumando todos los casos en que se ha usado el método CRISPR/Cas9 desarrollado por Tong durante esta tesis, su eficacia de mutación ha sido cercana al 100%.

1.4 Producción heteróloga en mutantes múltiples de TCS

Una vez obtenidos los 21 mutantes, como paso previo a su utilización para sintetizar compuestos de forma heteróloga, se quiso observar su fenotipo en cuanto a producción de antibióticos endógenos en distintos medios de cultivo tanto sólidos como líquidos. Este análisis solamente se llevó a cabo con los siete mutantes derivados de la cepa silvestre, ya que como se comentó anteriormente las cepas M1146 y M1154 no producen ninguno de los antibióticos coloreados.

Tal y como se puede apreciar en cuanto a producción de ACT y RED se refiere parece que eliminar TCS que regulen negativamente de forma sucesiva es una estrategia beneficiosa en muchos casos (Figuras R.10 y R.11). Esto es claramente distinguible en el medio NMMP sólido, donde los mutantes $\DeltaabrA\DeltaabrB$ y $\DeltaabrA\DeltaabrCI$ producen mayor cantidad de ACT y RED que los mutantes individuales, siendo únicamente superados por el mutante triple $\DeltaabrA\DeltaabrB\DeltaabrCI$. Otros casos, como los medios LB y R5A tanto sólidos como líquidos, muestran que las mayores tasas de producción se encuentran en los mutantes dobles $\DeltaabrA\DeltaabrB$, $\DeltaabrA\DeltaabrCI$ o $\DeltaabrB\DeltaabrCI$, siendo la producción del mutante $\DeltaabrA\DeltaabrB\DeltaabrCI$ más baja que la de estos pero mayor en

RESULTADOS

todo momento que en la cepa silvestre y los mutantes individuales. Se puede apreciar por tanto que, de forma general, los mutantes dobles y triples producen mayores cantidades de los antibióticos propios que la cepa silvestre e incluso que los mutantes individuales de cada uno de los sistemas.

No obstante, es necesario señalar que estas mutaciones sucesivas no siempre tenían un efecto positivo en la producción y son muy dependientes de medio de cultivo como ya se había observado con anterioridad en los mutantes individuales (Rico et al., 2014b; Rodríguez et al., 2015; Sanz, 2014; Yepes et al., 2011). Las diferencias de comportamiento de los mutantes sencillos mostradas en los diversos medios de cultivo son todavía más pronunciadas en los mutantes dobles o el triple, ya que dependiendo de las condiciones los niveles de producción son muy diferentes. Por ello, se ve que existen medios donde un determinado antibiótico se produce en mayor cantidad en mutantes individuales que en alguno de los mutantes múltiples, como puede ser el caso de la producción de ACT en el mutante $\Delta abrA$ en medio NMMP líquido, hecho que recalca la complejidad de elegir adecuadamente el medio a la hora de producir un antibiótico de forma heteróloga.

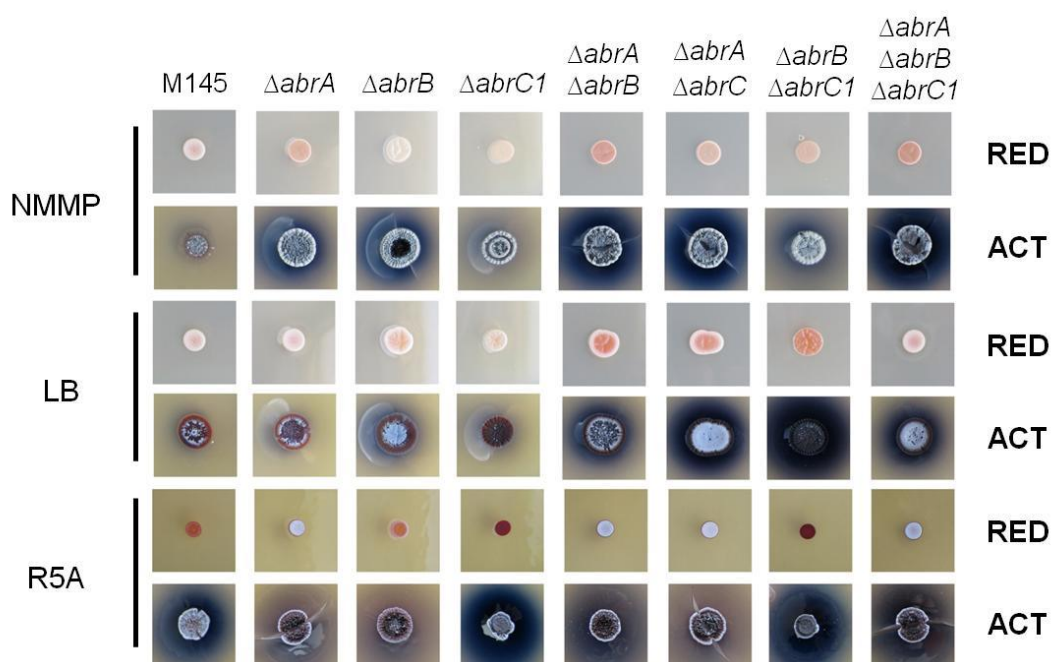


Figura R.10. Comparación de la producción de antibióticos ACT y RED entre la cepa silvestre y los mutantes de TCS generados sobre la cepa M145 por el método CRISPR/Cas9 en los medios sólidos NMMP (días 2 y 7), LB (días 2 y 7) y R5A (días 2 y 10).

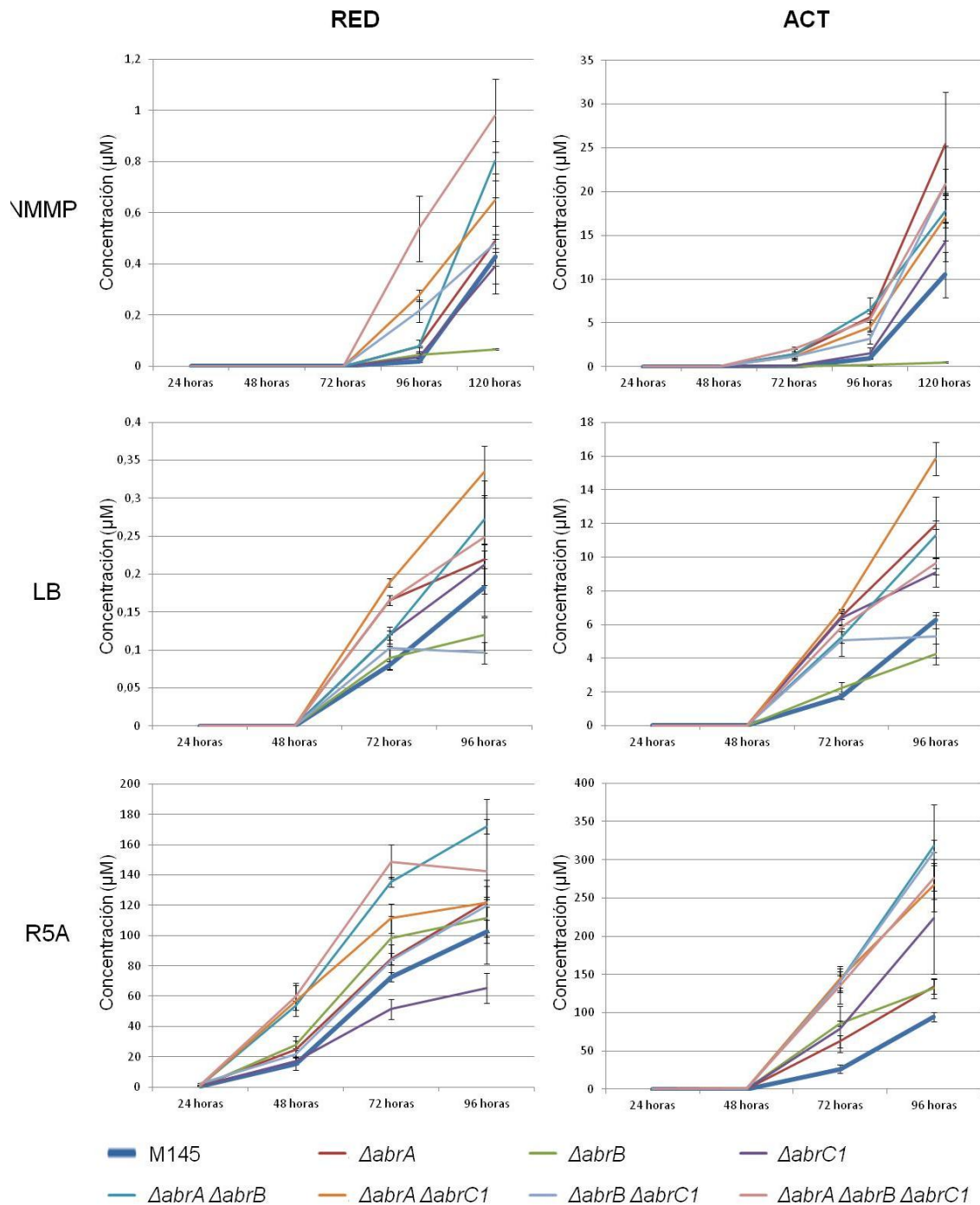


Figura R.11. Producción de ACT y RED en los medios líquidos NMMP, LB y R5A por los distintos mutantes derivados de *S.coelicolor* M145. Las barras de error corresponden a tres réplicas.

Todos estos mutantes, tanto los derivados de la cepa M145 como los provenientes de M1146 y M1154, se utilizaron como hospedadores de las distintas rutas de antibióticos ensayadas anteriormente. En primer lugar, se comenzó intentando

RESULTADOS

introducir el clúster de la eloramicina. Sin embargo, durante este experimento se encontró un problema inesperado, aparentemente de toxicidad. En la mayoría de los casos, o bien no se conseguía ninguna colonia transformante durante la primera etapa, o bien se obtenían, pero presentaban serias dificultades para crecer cuando se resembraban en parches o medio líquido, siendo imposible dar ninguno de los pasos necesarios para su conservación (Figura R.12). Esto sólo ocurría cuando la transformación se realizaba con el cósmido portador de la ruta de la eloramicina, pero no cuando se llevaba a cabo con el plásmido vacío; y únicamente en las cepas mutantes obtenidas, y no así en el caso de las cepas M145, M1146 y M1154 sin mutaciones.

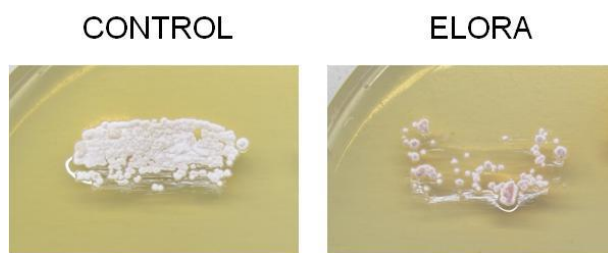


Figura R.12. Crecimiento en parche de colonias transformantes de la cepa M1146 $\Delta abrA\Delta abrB$ con un cósmido vacío (CONTROL) y con el portador del clúster de la eloramicina (ELORA) en medio R2YE (7 días de crecimiento).

A la vista de esto, se decidió probar con otra ruta de entre las disponibles, la de la rebecamicina. De nuevo, se volvió a encontrar el mismo problema: una baja eficiencia de transformación y gran dificultad para resembrar los transformantes de las cepas mutantes. Sin embargo, en este caso se observó un curioso efecto: si bien los mutantes de las cepas M1146 y M1154 (no las cepas M1146 y M1154 sin mutaciones) mostraban dichos problemas, los de la cepa M145 no lo hacían, pudiendo cultivarse con total normalidad. Es importante señalar que, tal y como se indicó en apartados anteriores (Resultados 1.2, Figura R.3), la introducción de este clúster en la cepa silvestre M145 no daba lugar al producto final de la ruta, la rebecamicina, mientras que en las cepas M1146 y M1154 sí.

En conjunto, ambos resultados apuntan a que la introducción de estas rutas provoca un efecto tóxico en las cepas mutantes empleadas como hospedadoras, posiblemente por un exceso de producción de los compuestos en etapas tempranas del desarrollo. Aunque esto podría avalar la hipótesis inicial de que los mutantes de TCS

reguladores negativos son capaces de producir mayores cantidades de compuestos de interés, no resulta útil a nivel práctico al no ser viables las cepas productoras.

Tras estos intentos fallidos se quiso intentar en último lugar otra ruta diferente a las previamente ensayadas: la de la mitramicina. En este caso, tanto la introducción del plásmido integrativo mediante conjugación interespecífica como los siguientes pasos para poder conservarlos en glicerol pudieron llevarse a cabo sin ninguno de los problemas descritos anteriormente. Todas las cepas tanto con el clúster biosintético como sin él se crecieron en el medio SM17, empleado para la producción de dicho compuesto, y se analizaron mediante HPLC para comparar su nivel de producción.

Los cromatogramas obtenidos (Anexo I), si bien muestran producción de mitramicina en todas las cepas con la única excepción de la M1154 $\Delta abrC1$, se alejan de los resultados deseados. Como podemos apreciar, utilizar las cepas M1146 y M1154 supone una notable mejoría con respecto a la cepa silvestre, pero en la cepa M1146 ni los mutantes sencillos, dobles o triple analizados parecen tener efectos claramente positivos en la producción (Figura R.13). Sí se puede observar sin embargo que la producción en la cepa M1154 mejora ligeramente en los mutantes $\Delta abrA\Delta abrB$ y $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$. No obstante, la mejor cepa productora en el medio ensayado era la cepa M1146 sin ningún TCS mutado.

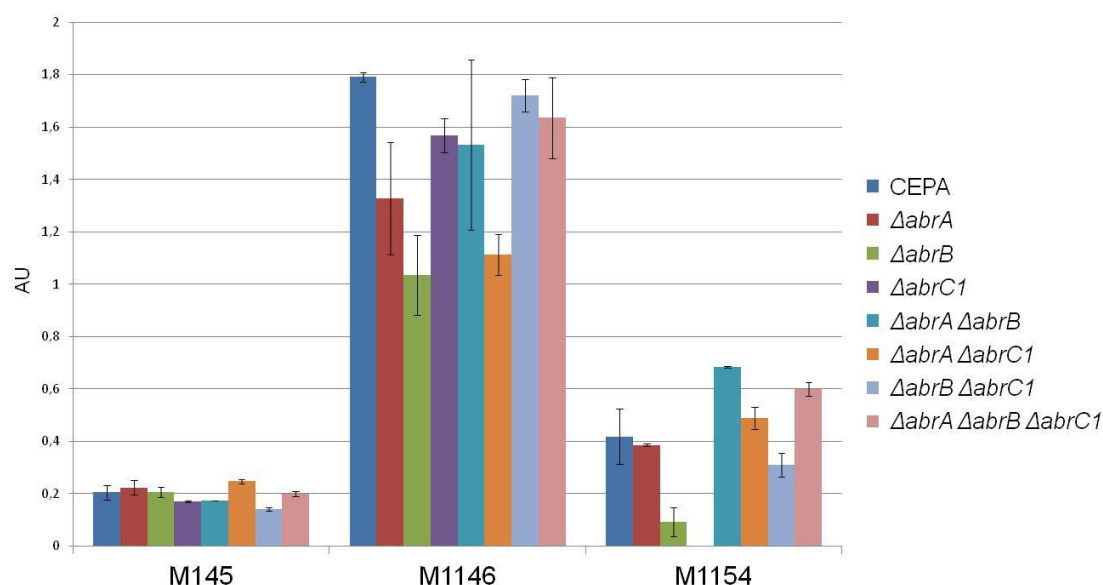


Figura R.13. Producción de mitramicina en medio SM17 tras tres días de crecimiento en los diversos mutantes generados sobre las cepas M145, M1146 y M1154. En el eje vertical, unidades de absorbancia (*absorbance units*, AU). Las barras de error corresponden a dos réplicas.

RESULTADOS

Estos resultados podían ser debidos a que, al no ser el medio SM17 uno de los empleados de forma habitual en nuestro laboratorio y por lo tanto desconocerse de qué manera afectan las mutaciones de los TCS estudiados a la producción de antibióticos, es posible que dichas mutaciones apenas tengan efecto en esas condiciones, ya que son muy dependientes de medio de cultivo. Por ello se decidió repetir el experimento en un medio más estudiado como puede ser el R5A, donde las diferencias en cuanto a producción de los antibióticos endógenos son apreciables en los mutantes de TCS estudiados (Figura R.11).

De nuevo, tanto la cepa M1146 como la M1154 mostraron ser mejores a la hora de producir este compuesto que la cepa M145 (Anexo I). Sin embargo, al comparar los distintos mutantes de la cepa M1146 entre sí, se apreció una vez más que no existía una mejora significativa en ninguno de los casos ensayados, y sí una ligera disminución en alguno de ellos como los mutantes $\Delta abrB$, $\Delta abrC1$, o $\Delta abrB\Delta abrC1$ (Figura R.14). Únicamente se pudo observar un ligero aumento de producción en el caso del mutante $\Delta abrA\Delta abrB$.

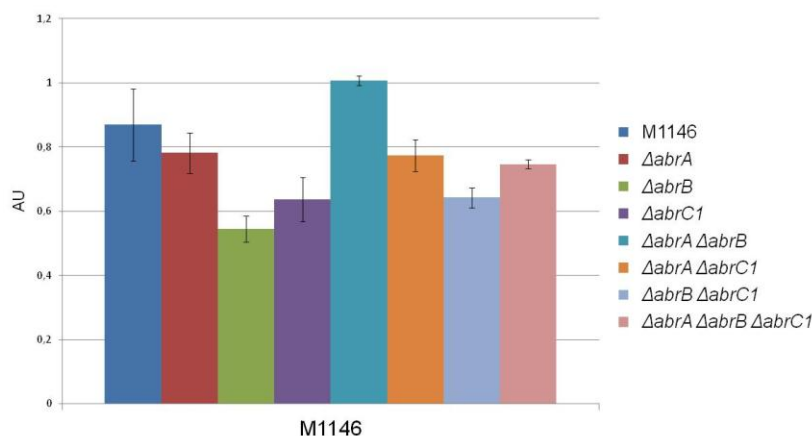


Figura R.14. Producción de mitramicina en medio R5A tras tres días de crecimiento en los mutantes de la cepa M1146. En el eje vertical, unidades de absorbancia (AU). Las barras de error corresponden a dos réplicas.

Estos resultados, aunque sí sirven para remarcar la importancia de las cepas M1146 y M1154 tanto para producir antibióticos de forma heteróloga de mejor manera que la M145 como también para obtener mayores tasas de producción, no afianzan en absoluto la utilidad de esta aproximación de mejora genética de forma general. Sin

embargo, la generación de estas cepas no cierra del todo la puerta a ensayar nuevas rutas que de forma más específica o con modificaciones adicionales para evitar los problemas de toxicidad puedan llegar a ser útiles para lograr los objetivos planteados.

RESULTADOS

CAPÍTULO 2

COMPARATIVA DE CEPAS SILVESTRES

Durante los experimentos de expresión heteróloga descritos en el anterior apartado se pudieron apreciar algunos resultados contradictorios entre la cepa silvestre M145 isogénica utilizada en estos experimentos con respecto a la cepa M145 que se había empleado en las investigaciones previas en nuestro laboratorio. Un ejemplo de ello se observó al tratar de producir de forma heteróloga la eloramicina: mientras que en la cepa M145 silvestre proveniente de nuestro laboratorio no se detectaba su producción, en aquella cedida por los Dres. Gómez-Escribano y Bibb sí se sintetizaba, aunque siguiera existiendo producción de ACT.

Una posible explicación para estos resultados fue que, pese a tratarse en ambos casos de cepas silvestres de *S. coelicolor* M145, pudieran existir diferencias entre la cepa empleada en nuestro laboratorio de forma rutinaria, a la que en esta sección se denominará M145-uSAL, y aquella que empezó a usarse como control en aquellos experimentos que implicaban la utilización de las cepas M1146 y M1154, a la que llamaremos M145-2011.

Por tanto, se planteó como objetivo estudiar con más detalle tanto las diferencias a nivel fenotípico entre estas dos cepas silvestres, así como las posibles diferencias genéticas que determinaran en última instancia las diferencias observables.

2.1 Diferencias fenotípicas entre las cepas M145-uSAL y M145-2011

Para dilucidar si las diferencias entre las cepas estudiadas existían más allá de la observación de la producción heteróloga de ciertos compuestos, se estudió el fenotipo tanto de ambas cepas silvestres (M145-uSALy M145-2011).

De esta forma, se pudo comprobar que efectivamente la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica entre las cepas isogénicas M145-uSALy M145-2011 presentaban un comportamiento similar en algunos medios, mientras que en otros las diferencias obtenidas eran considerables. Así, mientras en el medio sólido R2YE y los medios líquidos NMMP y R5A los niveles de producción de ACT eran

RESULTADOS

similares, en el resto de las condiciones probadas se pudo ver cómo la cepa M145-uSAL producía una cantidad de ACT notablemente superior, especialmente en YEPD, dónde la cepa M145-2011 apenas mostraba producción (Figura R.15). A su vez, también es reseñable indicar que el grado de esporulación en medio SFM, apreciable por el color grisáceo que las esporas conceden a la colonia, difiere considerablemente, mostrando la M145-uSAL una clara mejoría con respecto a la M145-2011.

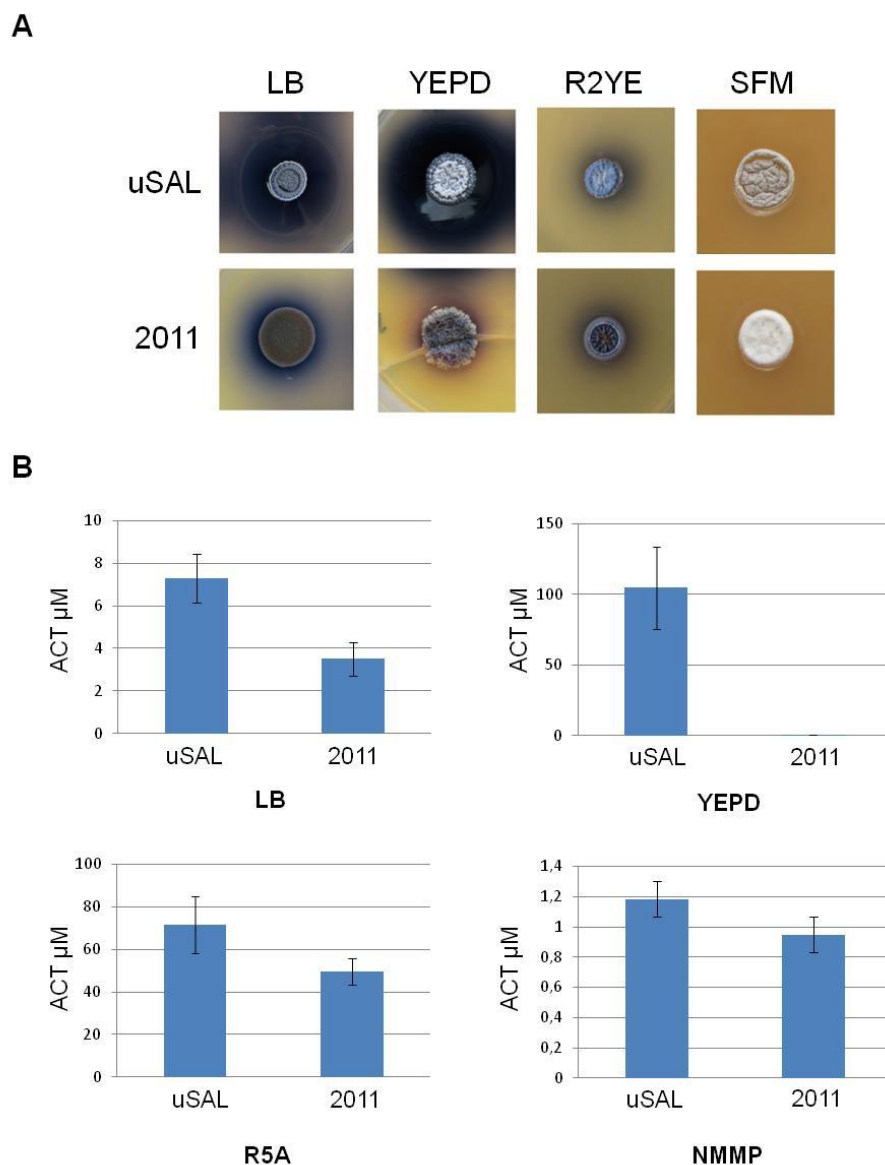


Figura R.15. A: Comparación fenotípica entre las cepas silvestres M145-uSALy M145-2011 en medios sólidos LB e YEPD a 10 días de crecimiento y R2YE y SFM a 5 días. B: Comparación de la producción de ACT a los 5 días de crecimiento en medios líquidos LB, YEPD, R5A y NMMP.

Estos resultados apuntaban a que, a pesar de ser ambas cepas M145 presuntamente iguales, ambas puedan presentar diferencias a nivel genético entre sí. Este fondo genético diferente vendría provocado por cambios aleatorios y su posterior fijación en las poblaciones de esporas que se conservan en cada laboratorio a lo largo de los años fruto de la evolución de las cepas. Por esta razón, también resultaría interesante analizar la existencia de diferencias de estas cepas con el genoma de *S. coelicolor* M145 de referencia anotado (Bentley et al., 2002).

2.2 Secuenciación y análisis de diferencias genéticas

Por lo expuesto anteriormente, se decidió comparar ambas cepas a nivel genético, tanto entre sí como con el genoma de referencia existente en las bases de datos (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Para este fin se solicitaron al Dr. Gómez-Escribano los datos de sus recientes experimentos de secuenciación de la cepa M145-2011, al tiempo que se procedía a secuenciar nuestra cepa M145 uSAL.

La técnica empleada para secuenciar M145 uSAL fue utilizar Hi-Seq 2x100 con una librería *paired-end* (más detalles en "Materiales y métodos"), que si bien es la idónea para el fin propuesto de detectar variaciones de un nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polimorphism*) y pequeñas inserciones o deleciones (*indels*), no permite ensamblar el genoma de la cepa M145-uSAL *de novo*. Esto último requeriría técnicas más complejas de MiSeq 2x250 o 2x300 *paired-end* y una librería *mate-pair*, o bien Nanopore o PacBio, y sería la opción recomendable en caso de querer detectar grandes cambios en zonas repetitivas como PKS o NRPS (regiones que incluso en estos casos pueden llegar a presentar problemas en el ensamblaje) u obtener una mejor cobertura en ciertas zonas, logrando así una mayor precisión.

El análisis bioinformático de los resultados fue llevado a cabo por el Dr. Juan Alzate de la Universidad de Medellín, que se encargó de alinear los datos obtenidos tras secuenciar nuestra cepa M145-uSAL sobre el genoma de la cepa M145-2011, así como de identificar las diferencias existentes con la secuencia de referencia (Materiales y métodos). A partir de las tablas de datos que nos proporcionó, se pudo apreciar la existencia de un número considerable de estos pequeños cambios.

Es necesario señalar, no obstante, que la comparación entre estas cepas deja fuera la región situada antes del *SCO0014* y la posterior al *SCO7846*, ya que dichos

RESULTADOS

extremos del cromosoma se encuentran pobremente ensamblados y por lo tanto la comparación en esas zonas es poco fiable. También resulta importante indicar que, en muchos de los casos, especialmente de SNP, los cambios detectados informáticamente no se encuentran en todas las lecturas obtenidas de esa región, lo que estaría indicando que no toda la población de M145-uSAL tiene dichas mutaciones.

Se comenzó estudiando las diferencias encontradas entre las cepas M145-uSAL y la M145-2011, siendo un total de 42 SNP y 46 *indels*, mostradas en las tablas presentadas en el Anexo II. Como se puede apreciar, muchos de los SNP encontrados se localizaban en zonas intergénicas, donde estos cambios podrían afectar a los niveles transcripcionales de los genes adyacentes en aquellos casos en que se encontraran en regiones promotoras. En algunos de estos casos se aprecia además que varias de estas mutaciones se agrupan en la misma región, como son los casos de las regiones intergénicas *SCO2587-2588* (codificante para glutamato 5-quinasa y proteína integral de membrana, respectivamente), *SCO4145-4146* (polifosfato quinasa y factor sigma de la subfamilia ECF) o *SCO6153-6154* (proteína reguladora y proteína hipotética). En la Tabla R.2 se muestran las bases presentes en cada una de las dos cepas estudiadas en las coordenadas donde se encuentra el respectivo SNP en la cepa M145-2011 y en la última columna se indica cuál de las dos cepas es la que realmente es un SNP respecto a la cepa de referencia.

En cuanto a aquellos SNP encontrados dentro de genes, si bien en algunos casos no conllevan cambio de aminoácido, en otros casos podrían ser de importancia para la función de la proteína, como los casos del gen *SCO1369* (D por A) o el *SCO4507* (G por D y W por R), que codifican para una HK y una serina/treonina quinasa, respectivamente. También es especialmente reseñable el gen *SCO1859*, codificante para una putativa aminotransferasa, y en el cual el cambio a nivel de secuencia de T por G eliminaría el codón de parada, dando lugar a un ORF de mayores dimensiones. En comparación con el genoma de referencia, estas diferencias se encontrarían de forma general en la cepa M145-uSAL pero no en la M145-2011, aunque como se dijo con anterioridad, no todas las lecturas presentan dichas modificaciones.

Tabla R.2. SNP encontrados en las regiones de los *SCO2587-2588*, *SCO4145-4146* y *SCO6153-6154*.

COORDENADA	INTERGÉNICA	M145-2011	M145-uSAL	COMPARACIÓN CON REFERENCIA
2779306	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
2779308	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
2779310	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
4547359	<i>SCO4145-SCO4146</i>	T	A	SNP en M145-2011
4547579	<i>SCO4145-SCO4146</i>	A	T	SNP en M145-uSAL
4547583	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
4547587	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
4547590	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	A	SNP en M145-uSAL
4547595	<i>SCO4145-SCO4146</i>	G	T	SNP en M145-uSAL
4547598	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
6742534	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
6742535	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742537	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742538	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742540	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742541	<i>SCO6153-SCO6154</i>	A	G	SNP en M145-uSAL

Por otra parte, encontramos gran variedad de *indels* en ambas cepas. Estas mutaciones son de gran interés, ya que la inserción o delección de tan sólo un nucleótido puede cambiar por completo el marco de lectura de un gen.

Algunos de los genes más interesantes con *indels* que podemos encontrar son el *SCO0311* (codificante para una ligasa), *SCO1417* (regulador de la familia GntR), *SCO1508* (histidil tRNA sintetasa), *SCO2177* (cobalamina sintasa), *SCO3109* (factor de acoplamiento de reparación transcripcional), *SCO5404* (HK) o *SCO7374* (nitrato reductasa NarB). El cambio de fase de estos genes mencionados, con excepción de *SCO5404*, se debe a la delección de un nucleótido en la cepa M145-2011 con respecto al genoma de referencia.

También resultan de interés varios genes que presentan más de una de estas diferencias al mismo tiempo. Por ejemplo, en el caso del gen *SCO1554* (nicotinato-nucleótido-dimetilbenzimidazol fosforibosiltransferasa) el análisis muestra tres *indels*: dos de ellos conllevan la pérdida o ganancia de uno o dos aminoácidos (3 o 6 bases), mientras que el tercera implica un cambio de fase. Curiosamente, mientras que el cambio de fase viene dado por una delección en la cepa M145-2011 con respecto al

RESULTADOS

genoma de referencia, la adición o pérdida de nucleótidos se daría en la cepa M145-uSAL, si bien no de forma homogénea en toda la población.

Otro caso es el del *SCO5976* (ornitina carbamoiltransferasa): la cepa M145-2011 presenta una deleción de cinco nucleótidos que cambiaría el marco de lectura, generando teóricamente una proteína de mayor tamaño. Por su parte, aunque la cepa M145-uSAL no muestra dicha deleción, sí que presenta en algunos casos inserciones de unos pocos nucleótidos en la zona colindante a la deleción en M145-2011.

En cuanto a la comparativa realizada entre las cepas analizadas con el genoma de referencia, se apreció que la mayoría de las diferencias existentes en la cepa M145-2011 también se encontraban en la M145-uSAL. Por este motivo, nos centraremos en las encontradas al comparar la cepa M145-2011 con la secuencia de referencia, coincidiendo las mismas con las de la cepa M145-uSAL (con excepción de aquellas ya señaladas en la comparativa anterior). Así, 79 SNP y 49 *indels* se encontrarían en ambas cepas con respecto al genoma de referencia.

De entre todas las diferencias encontradas con respecto a la secuencia anotada, existen varias inserciones de mayor tamaño que mostramos a continuación (Tabla R.3). Estas diferencias se encontraron inicialmente en la cepa M145-2011 y posteriormente también se han podido identificar en su mayoría en la cepa M145-uSAL.

Tabla R.3: Inserciones largas en M145-2011 con respecto al genoma de referencia.

COORDENADA	LONGITUD DE LA INSERCIÓN	GEN
205398	56	Intergénica <i>SCO0230-SCO0231</i>
3040567	41	Intergénica <i>SCO2798-SCO2799</i>
4847974	69	Intergénica <i>SCO4440-SCO4441</i>
6125166	2370	<i>SCO5641</i>
7671355	135	<i>SCO6921</i>
8254300	37	Intergénica <i>SCO7451-SCO7452</i>

Como se puede apreciar, la mayor de ellas es una inserción de más de 2 kb en el gen *SCO5641*. Curiosamente, codificando el gen *SCO5641* para una transposasa, el alineamiento de la región insertada reveló ser también la correspondiente a otra transposasa diferente y una enzima tipo DnaC. Dichos elementos corresponden a un operón al completo que incluye los genes *SCO6393-6394* junto con las 79 bases *upstream* *SCO6393* y las 55 bases *downstream* *SCO6394* (Figura R.16), y aparentemente formarían como conjunto un elemento transponible similar a otros

encontrados a lo largo del genoma. En este caso, el elemento original *SCO6393-6394* también se encuentra en su posición original, por lo que estaríamos hablando de una duplicación del mismo.

Por otra parte, la inserción en *SCO6921*, que codifica para una proteína de membrana, corresponde de nuevo a una duplicación en la secuencia. De esta forma, en la proteína de membrana codificada por el genoma de referencia existirían cuatro repeticiones PTPQSGTDTTQDQG, mientras que en la cepa M145-2011 hay tres repeticiones más, idénticas a nivel genético (Figura R.16). Esta inserción no genera cambio de fase.

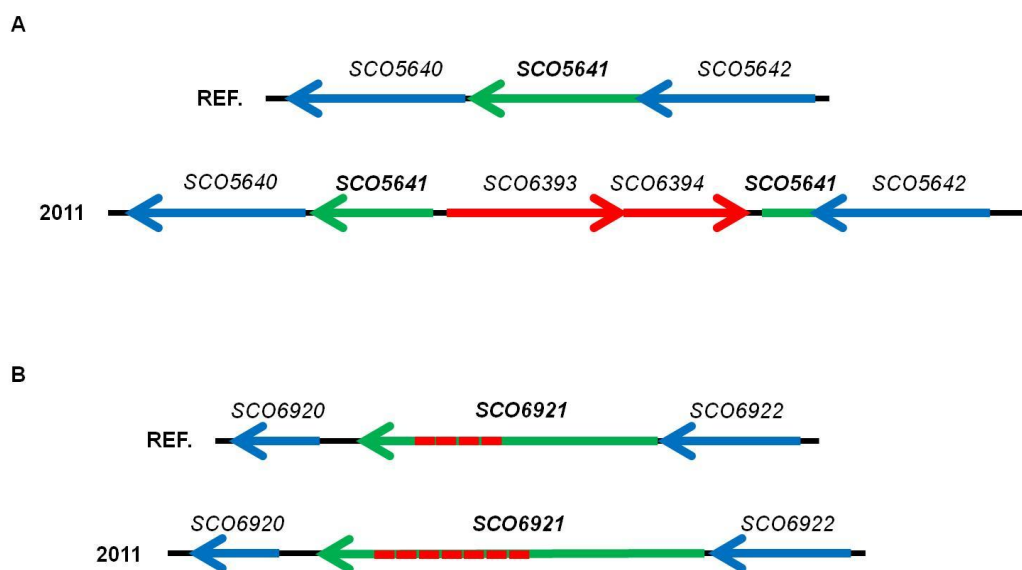


Figura R.16. Esquema comparativo de las inserciones encontradas en *SCO5641* (A) y *SCO6921* (B) en la cepa M145-2011 con respecto a la secuencia de referencia (Bentley et al., 2002).

Las otras inserciones mostradas en la Tabla R.3, por su parte, corresponden a regiones intergénicas con inserciones de menor tamaño, aunque desconocemos cómo puede afectar a los genes que se encuentran en su vecindad especialmente en el caso del gen *SCO4441* (proteína de unión a DNA), el cual podría ver alterada su región promotora.

Curiosamente, en todos estos casos, las inserciones encontradas presentaban una identidad del 100% con especies estrechamente emparentadas con *S. coelicolor*, como son el caso de *Streptomyces lividans* TK24 o *Streptomyces* sp. 2114.2. Sin embargo, la búsqueda de homologías entre las regiones intergénicas al completo (no únicamente el

RESULTADOS

fragmento insertado), mostraron una coincidencia completa en esos mismos casos, siendo el genoma anotado de *S. coelicolor* el único que carecía de esas regiones, tal y como se muestra en el ejemplo de la Figura R.17, en la que se detalla el alineamiento de la región *SCO4440-4441* entre las distintas especies o cepas anotadas.

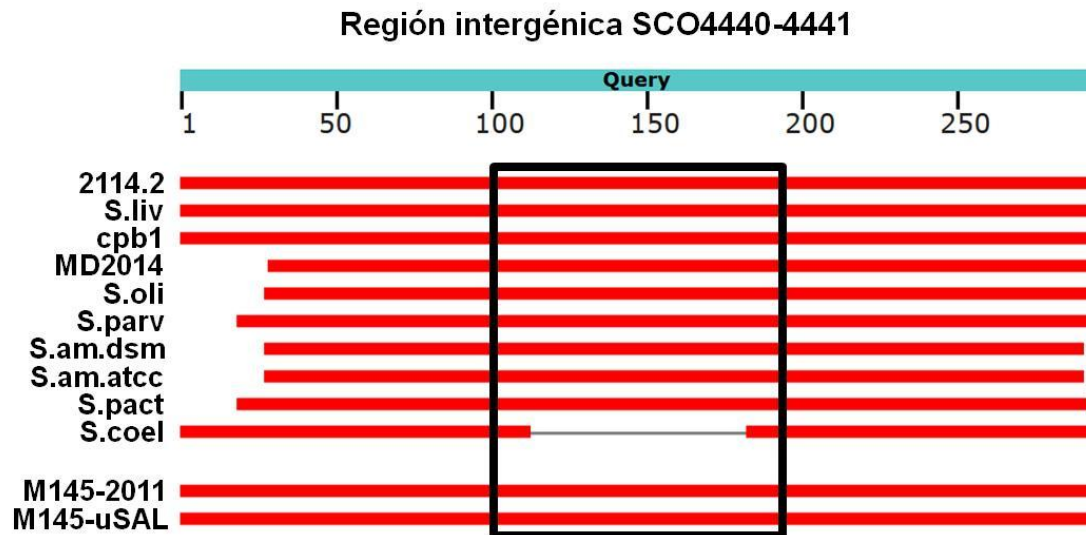


Figura R.17. Alineamiento de la región intergénica entre los *SCO4440-4441* de M145-2011 con otros genomas secuenciados. Correspondencia de las líneas, de arriba a abajo: *Streptomyces sp.* 2114.2 (2114.2), *Streptomyces lividans* TK24 (S.liv), *Streptomyces lividans cpb1* gene for chitinase promoter binding protein 1 (cpb1), *Streptomyces sp.* CCM_MD2014 (MD2014), *Streptomyces olivaceus* strain KLBMP 5084 (S.oli), *Streptomyces parvulus* strain 2297 (S.parv), *Streptomyces ambofaciens* strain DSM 40697 (S.am.dsm), *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (S.am.atcc), *Streptomyces pactum* strain ACT12 (S.pact) y *Streptomyces coelicolor* A3(2) (S.coel). Las dos líneas inferiores muestran cómo se encuentra esta región en las cepas M145-2011 y M145-uSAL.

Además de estos casos, encontramos gran cantidad de SNP e *indels* en M145-2011 con respecto al genoma de referencia (también presentes en M145-uSAL), algunos de las cuales podrían ser interesantes como *SCO4665* (que perdería el codón de parada y abarcaría a *SCO4664*) o *SCO4493* (que cambiaría completamente de fase el regulador transcripcional AsnC). La lista completa de estas diferencias puede encontrarse en el Anexo II.

Queda patente por lo tanto que lejos de poder achacar las diferencias fenotípicas encontradas entre las cepas M145-2011 y M145-uSAL a una única mutación, en ambas cepas se han generado un número importante de ellas como producto de la evolución constante en laboratorios diferentes, lo que remarca la importancia de utilizar las cepas isogénicas pertinentes como control en cada experimento, así como tener en cuenta este aspecto a la hora de repetir experimentos en distintas cepas.

RESULTADOS

CAPÍTULO 3

DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LA CEPA MUTANTE $\Delta abrA$ Y LA PARENTAL M145-uSAL

Uno de los objetivos principales del trabajo consistía en desentrañar la red de regulación que desencadena la activación del sistema AbrA para así comprender en detalle los procesos que provocan una mayor producción de antibióticos y una aceleración en la diferenciación morfológica en los mutantes del sistema. Con el fin de cumplir este objetivo se decidió identificar aquellos genes que se encontraban diferencialmente expresados en la cepa $\Delta abrA$ con respecto a la cepa silvestre, realizándose para ello un ensayo de RNA-Seq empleando para ello la cepa M145-uSAL (a la que en este apartado denominaremos simplemente M145) y su correspondiente mutante $\Delta abrA$.

3.1 Condiciones del ensayo de RNA-Seq y fenotipos de las muestras analizadas

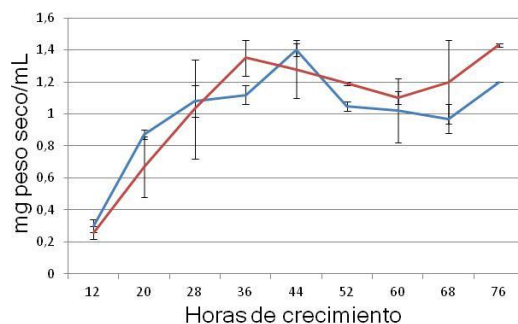
Para llevar a cabo el experimento se emplearon tanto la cepa mutante M145 $\Delta abrA$ (obtenida mediante el sistema CRISPR/Cas9) como la silvestre M145, crecidas en medio NMMP líquido, el principal medio empleado en estudios previos referentes a este sistema, y recogidas a dos tiempos de crecimiento: 24 y 36 horas. Dichos tiempos correspondían según su cinética de crecimiento en el medio empleado a la fase exponencial y al final de esta y comienzo de la estacionaria, respectivamente (Figura R.18). Se decidió además emplear cuatro réplicas biológicas para obtener una mayor fiabilidad de los datos.

Dado que los volúmenes más reducidos de cultivo presentaban una menor variabilidad entre réplicas, el experimento se llevó a cabo en matraces indentados de 50 mL con 10 mL de medio NMMP inoculado con 10^6 esporas/mL. Dichos cultivos se emplearon, en primer lugar, para tomar muestras cada 24 horas a partir de las cuales

RESULTADOS

cuantificar la producción de ACT y RED. Se pudo apreciar cómo en el mutante $\Delta abrA$ existe un incremento significativo en la producción de ambos compuestos con respecto a la cepa silvestre, que llega a ser de más del doble en el caso de la ACT a 96 horas (Figura X).

A



B

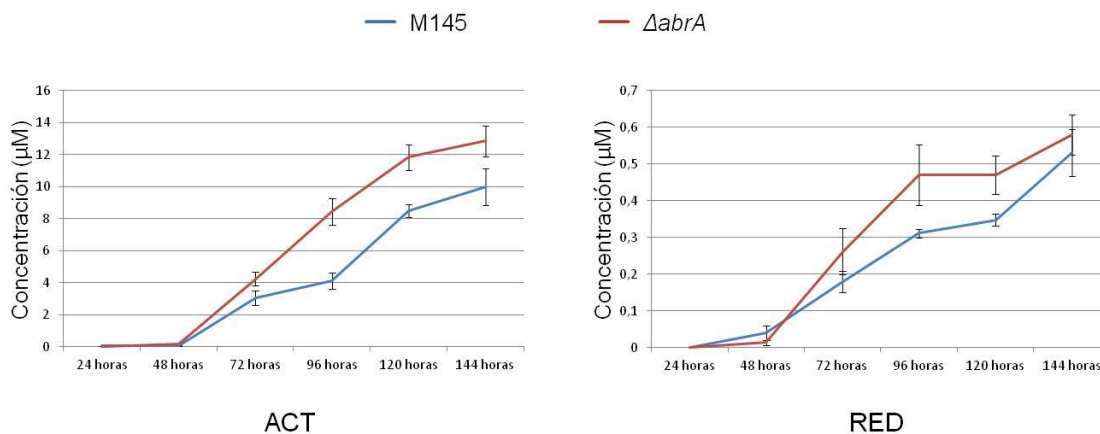


Figura R.18. A: Curva de crecimiento en medio NMMP (Antoraz, 2013). B: Producción de ACT y RED (μM) en las cepas silvestre M145 y mutante $\Delta abrA$.

Por otra parte, el resto de cultivos se recogieron, como se ha mencionado, a los tiempos de 24 y 36 horas desde su inoculación. Para cada réplica biológica, un total de cuatro por tiempo y cepa, se juntó el contenido de tres matraces, cuyo micelio se conservó con *RNA Protect* hasta la extracción del RNA, ambos procesos descritos en detalle en la sección “Materiales y métodos”. La concentración del RNA obtenida fue medida por NanoDrop, y su calidad mediante Bioanalyzer, mostrando que ambos datos eran excelentes al presentar la mayoría de ellos un RIN (*RNA Integrity Number*) de 10 (Figura R.19).

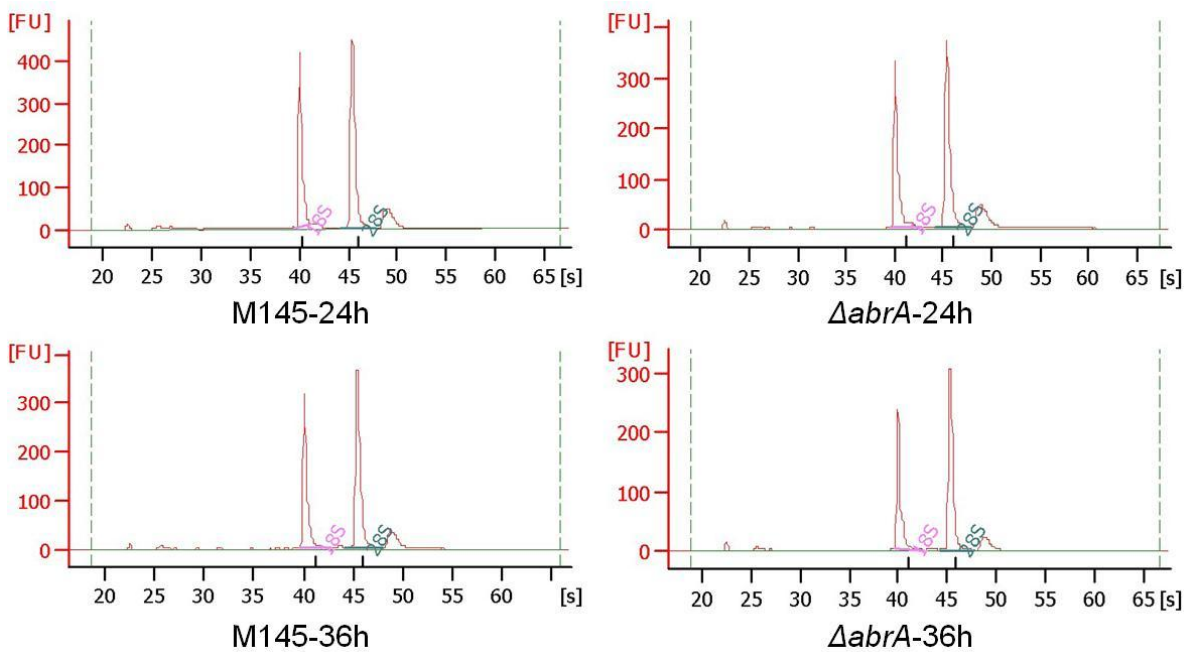


Figura R.19: Gráficas de Bioanalyzer (una muestra por cepa y tiempo).

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio ofrecido por Macrogen, que se hizo responsable de la eliminación del rRNA, la elaboración de una librería *stranded* para cada réplica y el proceso de secuenciación en sí utilizando un Novaseq 6000 para proporcionar lecturas *paired end* de 100 bases. De esta manera se obtuvieron entre 25 y 60 millones de lecturas por ambos extremos de los fragmentos, diferenciadas en función de la cadena de la que provenía el RNA, las cuales fueron filtradas según su calidad (Q35), mapeadas en el genoma de referencia, y cuantificadas y normalizadas para obtener los datos de expresión diferencial entre las dos cepas. Esta labor fue realizada por el Dr. Alzate, que nos proporcionó los resultados de expresión con los que trabajar.

3.2 Resultados de la secuenciación de los mRNA

Una vez llevados a cabo los análisis descritos, los resultados de expresión diferencial obtenidos se filtraron de acuerdo con dos criterios: el *fold change* (FC) y el *false discovery rate* (FDR). El FC, en muchas ocasiones dado en escala logarítmica de base 2 (LogFC), hace referencia a la cantidad de veces que los transcritos de un determinado gen se encuentran reprimidos o sobreexpresados entre las condiciones a comparar como, por ejemplo, entre la cepa mutante con respecto a la silvestre. Por su

RESULTADOS

parte, el FDR se define como la proporción esperada de errores de tipo I, es decir, la probabilidad de que el resultado sea un falso positivo.

En este experimento se decidió partir de unos valores normalmente aceptados de $FC \geq 2$ y $FDR \leq 0,05$ para filtrar los datos obtenidos, considerándose además que todos los datos obtenidos tuvieran un $p\text{-valor} \leq 0,05$. Con estos umbrales se obtuvieron un gran número de genes diferencialmente expresados en el mutante $\Delta abrA$: 129 genes (72 sobreexpresados y 57 reprimidos) a las 24 horas y 1063 (669 sobreexpresados y 394 reprimidos) a las 36 horas (Figura R.20, Anexos III y IV). Resulta por tanto destacable que las mayores diferencias aparezcan a las 36 horas, coincidiendo con el final de la fase exponencial.



Figura R.20: Número de genes diferencialmente expresados en el mutante $\Delta abrA$ con respecto a la cepa silvestre conforme a los umbrales establecidos ($FC \geq 2$ y $FDR \leq 0,05$).

En todos los casos, los genes obtenidos se analizaron a su vez con bases de datos como DAVID Database (<https://david.ncifcrf.gov/>) o Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) para conocer su función y facilitar de esta manera el análisis de los datos obtenidos.

A continuación se detallan los resultados obtenidos agrupándolos en diferentes categorías, centrandó el estudio en identificar principalmente aquellos genes que ayuden a entender los fenotipos observados en el mutante.

3.2.1 Genes implicados en el metabolismo secundario

A partir de las listas de clústeres de producción de metabolitos secundarios de *S. coelicolor*, tanto conocidos como predichos, descritos en bibliografía y bases de datos

(Nett 2009), se identificaron aquellos genes de esta categoría expresados diferencialmente en este estudio. Así, a 24 horas de crecimiento se incluirían tan solo 3 genes en este apartado (2 sobreexpresados en el mutante *ΔabrA* y 1 reprimido) mientras que a 36 horas son 83 genes (64 sobreexpresados y 19 reprimidos) los que superan los filtros establecidos.

Se puede apreciar por tanto que 36 horas parecería ser el tiempo clave para entender las diferencias encontradas en la producción de antibióticos del mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre. Dentro de los clústeres sobreexpresados a este tiempo encontramos 17 de los 22 genes del clúster de la ACT (incluyendo su CSR, *actII-ORF4*, *SCO5085*), 11 de 22 de la RED, 6 de 16 en el de CPK y 14 de 40 en el CDA, los cuales encajan con los resultados fenotípicos que se dan en este mutante. También vemos sobreexpresado el clúster de la coelibactina (*SCO7681-7691*, 9 genes de 11) y el de una desferrioxamina (*SCO2782-2785*, 4 de 4) (Tabla R.4). Este último clúster puede resultar de gran interés ya que los compuestos que produce en *S. coelicolor*, una mezcla de desferrioxamina G1 y E, están descritos como sideróforos no peptídicos que se secretan en condiciones en las que existe un déficit de hierro, hecho muy significativo si se tiene en cuenta que el sistema estudiado parecería responder a los niveles de hierro como se ha mostrado en antecedentes (Rico et al., 2014b).

Tabla R.4. Genes expresados diferencialmente en el mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre a 24 y 36 horas. En el caso de las 36 h se muestra solo un representante de cada clúster diferencialmente expresado. En la última columna se indican el número de genes que aparecen diferencialmente expresados en cada clúster (Dif. Exp/Total). En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante.

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 24 HORAS						
GEN	FC	P- VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER	DIF. EXP./ TOTAL
SCO2783	2,66E+00	9,87E-09	1,59E-07	Monooxigenasa	SCO2782-2785 Desferrioxamina	1/4
SCO5895	-2,14E+00	8,54E-05	5,40E-04	Metiltransferasa	SCO5877-5898 RED	1/22
SCO6682	2,17E+00	6,82E-10	1,28E-08	Proteína hipotética	SCO6681-6685 Péptido SapB que contiene lantionina	1/5

RESULTADOS

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 36 HORAS						
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER	DIF. EXP./TOTAL
SCO0125	-2,62E+00	1,62E-13	2,78E-12	Oxidorreductasa	SCO0124-0129 Ácido eicosapentaenoico	2/6
SCO0188	-2,23E+00	2,67E-21	9,73E-20	Metilesterasa	SCO0185-0191 Isorenierateno	1/7
SCO0268	-2,55E+00	7,32E-29	4,70E-27	Proteína hipotética	SCO0267-0270 Lantibiótico	1/4
SCO1208	-2,39E+00	2,19E-10	2,40E-09	Proteína hipotética	SCO1206-1208 THN , flaviolina	1/3
SCO1266	3,27E+00	1,28E-02	2,91E-02	3-oxoacyl-ACP sintasa	SCO1265-1273 Poliquétido aromático	1/9
SCO2782	3,25E+00	6,89E-12	9,33E-11	Descarboxilasa dependiente de piridoxal	SCO2782-2785 Desferrioxamina	4/4
SCO3230	2,51E+00	1,31E-05	7,13E-05	Péptido sintasa I de CDA	SCO3210-3249 CDA	14/40
SCO5085	2,36E+00	6,98E-24	3,09E-22	Proteína activadora de operones. actII-ORF4	SCO5071-5092 ACT	17/22
SCO5892	6,92E+00	5,69E-05	2,67E-04	Poliquétido sintasa	SCO5877-5898 RED	11/22
SCO6274	4,08E+00	8,34E-05	3,76E-04	Poliquétido sintasa tipo I	SCO6273-6288 CPK	6/16
SCO6432	2,81E+00	9,62E-04	3,23E-03	Péptido sintasa	SCO6429-6438 Dipéptido	2/10
SCO6681	-2,10E+00	3,02E-13	5,03E-12	Ser/Thr quinasa	SCO6681-6685 Péptido SapB que contiene lantionina	3/5
SCO6771	-2,04E+00	7,01E-07	4,81E-06	Hipotética proteína pequeña hidrofóbica	SCO6759-6771 Hopeno	3/13
SCO6827	4,14E+00	4,30E-05	2,09E-04	Poliquétido sintasa	SCO6826-6827 Poliquétido	1/2
SCO6931	-2,77E+00	3,71E-07	2,65E-06	Proteína hipotética	SCO6927-6932 Lantibiótico	3/6
SCO7669	6,54E+00	1,77E-03	5,47E-03	Oxidorreductasa	SCO7669-7671 Poliquétido aromático	2/3
SCO7682	8,28E+00	1,90E-05	9,99E-05	Peptido sintasa no ribosomal	SCO7681-7691 Coelibactina	9/11
SCO7701	-3,51E+00	2,32E-22	9,26E-21	Metiltransferasa	SCO7700-7701 2-Metilisoborneol	2/2

En cuanto a los clústeres reprimidos a este tiempo, identificamos el del 2-metilisoborneol (*SCO7700-7701*, 2 de 2), que es un compuesto semi-volátil que produce un olor similar al de la geosmina, así como varios genes del clúster de un lantibiótico

(SCO6927-6932, 3 de 6) y del péptido SapB (SCO6681-6685, 3 de 5), además de genes concretos de otros clústeres.

3.2.2 Genes que codifican posibles reguladores

Si bien en esta categoría se han incluido elementos muy diferentes, se trata de uno de los grupos de mayor importancia a la hora de comprender la cascada reguladora del sistema, dado que las diferencias transcripcionales encontradas pueden ser debidas a una regulación directa de AbrA sobre estos genes o a una regulación indirecta a través de otros reguladores. Conocer qué reguladores presentan cambios transcripcionales en el mutante *ΔabrA* puede servir como orientación sobre qué otros genes encontrados en este estudio están regulados de forma directa o indirecta por AbrA. Así, a las 24 horas se encontraron 12 genes en esta categoría (6 sobreexpresados y 6 reprimidos) y a 36 horas, 60 genes (26 sobreexpresados y 34 reprimidos).

De entre los que se pueden encontrar a las 24 horas destacan algunos genes sobreexpresados en la cepa *ΔabrA* como *nusG* (SCO4647), *wblH* (SCO6715) y *absR1* (SCO6992), así como dos factores sigmas reprimidos *sigK* (SCO6520) y *sigM* (SCO7314) (Tabla R.5). Especialmente relacionados con producción de antibióticos está AbsR1, clasificado como un activador del metabolismo secundario, y SigK, un factor sigma cuya eliminación resulta en una aceleración y aumento de la producción de ACT y RED, así como un adelanto en la diferenciación morfológica; cuya sobreexpresión y represión respectiva coincide con las diferencias fenotípicas previamente descritas.

Además, tanto SigK como SigM, cuyos genes aparecen de nuevo reprimidos con respecto a la cepa silvestre a las 36 horas, están señalados como posibles desencadenantes de respuestas a estrés osmótico (Mao et al., 2009). A su vez, a este tiempo se pueden identificar entre los datos, genes implicados en regular este tipo de respuestas, como pueden ser *sigJ* (SCO1276) y *dpsA* (SCO0596), ambos reprimidos, o *dmdR2* (SCO4017), que se encuentra sobreexpresado. Este último caso, el de *desR2*, resulta contradictorio tanto con los efectos vistos como con el hecho de que dianas tales como el clúster de la desferrioxamina (SCO2782) o el SCO4049 (codificante para una proteína de unión a antibiótico) se encuentren también sobreexpresados (Flores et al., 2005; Flores and Martin, 2004). Dicha contradicción se analizará en la sección “Discusión”.

RESULTADOS

Tabla R.5. Expresión diferencial del mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre a 24 y 36 horas de los genes mencionados en el texto que codifican para posibles proteínas reguladoras. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante.

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 24 HORAS					
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	NOMBRE
<i>SCO4647</i>	2,01E+00	1,25E-59	4,93E-57	Proteína antiterminadora de transcripción	<i>nusG</i>
<i>SCO6520</i>	-6,50E+00	1,55E-198	1,04E-194	Factor sigma de la RNA polimerasa	<i>sigK</i>
<i>SCO6715</i>	2,06E+00	6,66E-05	4,37E-04	Regulador transcripcional	<i>wblH</i>
<i>SCO6992</i>	2,45E+00	1,07E-18	5,13E-17	Proteína reguladora	<i>absR1</i>
<i>SCO7314</i>	-3,18E+00	8,49E-33	1,21E-30	Factor sigma de la RNA polimerasa	<i>sigM</i>
GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 36 HORAS					
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	NOMBRE
<i>SCO0596</i>	-2,87E+00	6,70E-39	9,52E-37	Proteína de unión a DNA	<i>dpsA</i>
<i>SCO1276</i>	-2,48E+00	3,15E-03	8,94E-03	Factor sigma ECF de la RNA polimerasa	<i>sigJ</i>
<i>SCO1839</i>	-4,47E+00	8,95E-25	4,32E-23	Regulador transcripcional	
<i>SCO2935</i>	-2,14E+00	3,33E-17	8,58E-16	Regulador transcripcional	<i>scrX</i>
<i>SCO3579</i>	-2,39E+00	2,72E-20	9,35E-19	Proteína reguladora	<i>wblA</i>
<i>SCO3926</i>	-2,25E+00	6,83E-18	1,89E-16	Regulador	
<i>SCO4017</i>	2,13E+00	7,79E-12	1,04E-10	Represor dependiente de hierro	<i>dmdR2</i>
<i>SCO6520</i>	-6,28E+00	2,61E-40	4,10E-38	Factor sigma de la RNA polimerasa	<i>sigK</i>
<i>SCO7289</i>	-3,27E+00	1,67E-07	1,24E-06	Regulador	<i>ssgC</i>
<i>SCO7314</i>	-2,73E+00	2,61E-12	3,78E-11	Factor sigma de la RNA polimerasa	<i>sigM</i>
<i>SCO7325</i>	-2,57E+00	3,30E-24	1,51E-22	Antagonista de factor anti-sigma	<i>rsbV</i>

Existen otros reguladores que pueden resultar de interés y que se encuentran reprimidos en el mutante *ΔabrA*. Estos serían *scrX* (*SCO2935*), que parece estar implicado en la formación de esporas (Yang et al., 2000); *wblA* (*SCO3579*), un regulador transcripcional pleiotrópico que regula producción de antibióticos, diferenciación, y respuesta a estrés oxidativo (Kim et al., 2005); *ssgA* (*SCO3926*) y *ssgC* (*SCO7289*), reguladores implicados en desarrollo y esporulación (Noens et al.,

2005); *rsbV* (*SCO7325*), un gen fuertemente inducido por estrés osmótico cuyo producto es un antagonista de la acción inhibitoria de RsbA sobre SigB (Lee et al., 2004); o el gen *SCO1839*, una proteína asociada al nucleóide que se uniría al DNA de forma poco específica influyendo en procesos tales como expresión génica, protección del DNA, recombinación y reparación del DNA.

3.2.3 Genes que codifican proteínas de membrana

Una de las categorías más representadas entre estos datos de genes diferencialmente expresados en este ensayo es la de genes que codifican para proteínas de membrana, principalmente transportadores. En este grupo se podrían incluir 12 genes a las 24 horas (9 sobreexpresados y 3 reprimidos) y 125 a las 36 horas (97 sobreexpresados y 28 reprimidos).

Entre los diferencialmente expresados a 36 horas se encuentran diversos genes implicados en el transporte del hierro, como el clúster *cdtABC* (*SCO7398-7400*), *SCO2273* (que codifica una proteína de transporte de la familia FecCD), *SCO1046* (ATPasa transportadora de metal) y *SCO7678* (proteína integral de membrana transportadora de metal) (Tabla R.6). Todos ellos se encuentran sobreexpresados en el mutante *ΔabrA*.

Además, dado que en estudios referentes al clúster *cdtABC* se señala que transportadores de sideróforos también pueden servir para transportar antibióticos con estructuras similares (Braun, 1999; Bunet et al., 2006), se observaron también otros genes implicados en resistencia a antibióticos no situados dentro de los clústeres biosintéticos ya descritos. Así se encontraron otros genes, también sobreexpresados en la cepa mutante, tales como *cmIR1* (*SCO7526*), el cual codifica para una bomba de flujo de cloranfenicol, y también *tcmA* (*SCO2373*), una bomba de flujo que confiere resistencia a la tetracenicina C.

En cuanto al resto de genes que se incluyen en este apartado, la mayoría de ellos son considerados transportadores de distintas clases, entre los que destaca un gran número de transportadores ABC, aunque también se pueden observar un número importante de lipoproteínas presumiblemente implicadas en otras funciones (Anexo IV).

RESULTADOS

Tabla R.6. Expresión diferencial de los genes mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre las 36 horas que codifican para posibles proteínas transportadoras sobreexpresados en la cepa mutante y mencionados en el texto.

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 36 HORAS					
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	NOMBRE
<i>SCO1046</i>	3,20E+00	2,00E-03	6,05E-03	ATPasa transportadora de metal	
<i>SCO2273</i>	3,34E+00	2,06E-06	1,31E-05	Proteína de membrana transportadora de la familia FecCD	
<i>SCO2373</i>	2,11E+00	3,70E-19	1,15E-17	Proteína de eflujo de tetracenomicina C	<i>tcmA</i>
<i>SCO7398</i>	2,28E+00	9,57E-16	2,12E-14	Subunidad de permeasa transportadora de hierro-hidroxamato	<i>cdtA</i>
<i>SCO7399</i>	2,04E+00	4,67E-20	1,58E-18	Lipoproteína transportadora dependiente de unión a proteína	<i>cdtAB</i>
<i>SCO7526</i>	5,82E+00	1,15E-03	3,79E-03	Proteína de resistencia a cloranfenicol	<i>cmlR1</i>
<i>SCO7678</i>	5,54E+00	6,39E-04	2,26E-03	Proteína integral de membrana transportadora de metal	

3.2.4 Otros genes de interés

Además de las categorías comentadas, existen múltiples genes en los distintos tiempos que pueden ser de interés (Tabla R.7). Entre ellos se pueden identificar genes que codifican para flavohemoproteínas, como *SCO7094* y *SCO7428*, proteínas relacionadas con la respuesta a estrés nitrosativo que también funcionan como reductasas de complejos hierro-sideróforo y que en el mutante se encuentran sobreexpresadas. También se observan genes que codifican proteínas relacionadas con respuestas a hierro o estrés oxidativo, como la bacterioferritina *SCO2113* (reprimida); con esporulación como *SCO4620* y *SCO4621* (sobreexpresadas); con choque térmico, como *SCO4684* (sobreexpresada), *SCO4295* (reprimida) y *SCO1405* (sobreexpresada); y genes de proteínas secretadas como *SCO2798*, *SCO6012*, *SCO7176* y *SCO2474* (sobreexpresadas).

Otros genes que podrían tener un papel importante en los fenotipos descritos son los relacionados con metabolismo del nitrógeno, *nirB*, *nirC* y *nirD* (*SCO2486-2488*, sobreexpresados) (Fischer et al., 2012); el operón *bkdA2B2C2* (*SCO3831-3829*, reprimidos), implicado en la degradación de aminoácidos ramificados (Sprusansky et al.,

2005); y el operón *nuoA-N* (*SCO4562-4575*, reprimidos), codificante para las 14 subunidades de la NADH deshidrogenasa 1 que son necesarias para oxidar el NADH a NAD⁺ en la cadena transportadora de electrones (Botas Muñoz, 2013).

Tabla R.7. Expresión diferencial del mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre a 24 y 36 horas de diversos genes de interés mencionados en el texto. Reprimidos en la cepa mutante en azul y sobreexpresados en rojo.

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 24 HORAS				
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN
<i>SCO4563</i>	-2,01E+00	1,59E-26	1,47E-24	Subunidad B de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4620</i>	4,06E+00	7,26E-39	1,43E-36	Proteína de esporulación
<i>SCO4621</i>	5,17E+00	6,58E-33	9,56E-31	Proteína de esporulación
<i>SCO7428</i>	2,45E+00	9,28E-25	7,36E-23	Flavohemoproteína
GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE A 36 HORAS				
GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN
<i>SCO1405</i>	2,69E+00	8,92E-17	2,21E-15	Proteína de la familia HSP90 de shock por calor
<i>SCO2113</i>	-2,95E+00	2,03E-30	1,47E-28	Bacterioferritina
<i>SCO2474</i>	8,82E+00	9,85E-05	4,35E-04	Metaloproteinasas secretada
<i>SCO2486</i>	3,73E+00	1,80E-05	9,53E-05	Nitrito reductasa NirB
<i>SCO2487</i>	3,81E+00	1,01E-05	5,64E-05	Subunidad grande de nitrito reductasa NirB
<i>SCO2488</i>	4,86E+00	3,91E-04	1,48E-03	Subunidad pequeña de nitrito reductasa NirB
<i>SCO2798</i>	4,38E+00	1,62E-04	6,77E-04	Celobiosa hidrolasa
<i>SCO3829</i>	-2,07E+00	6,28E-23	2,59E-21	Deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada E2
<i>SCO3830</i>	-2,23E+00	3,77E-16	8,68E-15	Subunidad beta de deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada EE1
<i>SCO3831</i>	-2,51E+00	3,19E-16	7,46E-15	Deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada E1-alfa
<i>SCO4295</i>	-2,43E+00	2,25E-18	6,57E-17	Proteína de shock por frío
<i>SCO4562</i>	-3,68E+00	7,42E-24	3,26E-22	Subunidad A de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4563</i>	-2,71E+00	6,74E-15	1,37E-13	Subunidad B de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4564</i>	-2,39E+00	6,79E-13	1,07E-11	Subunidad C de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4565</i>	-3,48E+00	1,26E-38	1,73E-36	Subunidad D de NADH deshidrogenasa

RESULTADOS

<i>SCO4566</i>	-3,14E+00	1,78E-20	6,24E-19	Subunidad E de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4567</i>	-2,87E+00	5,25E-24	2,35E-22	Subunidad NuoF de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4568</i>	-2,62E+00	2,83E-32	2,30E-30	Subunidad G de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4569</i>	-3,12E+00	2,07E-26	1,15E-24	Subunidad H de NADH deshidrogenasa
<i>SCO4620</i>	3,12E+00	1,70E-12	2,54E-11	Proteína de esporulación
<i>SCO4621</i>	4,76E+00	1,11E-05	6,12E-05	Proteína de esporulación
<i>SCO4684</i>	2,51E+00	2,46E-20	8,48E-19	Proteína de shock por frío
<i>SCO6012</i>	3,12E+00	1,94E-02	4,16E-02	Quitinasa
<i>SCO7094</i>	5,46E+00	6,16E-04	2,19E-03	Flavohemoproteína
<i>SCO7176</i>	7,62E+00	1,20E-04	5,22E-04	Peptidasa secretada
<i>SCO7428</i>	2,08E+00	2,80E-12	4,03E-11	Flavohemoproteína

3.3 Conclusiones del analisis comparativo de las cepas *ΔabrA* y M145 mediante RNA-Seq

En conjunto, el estudio de los datos obtenidos en este experimento de RNA-Seq da buena muestra de las profundas alteraciones que presenta la expresión génica de la cepa mutante *ΔabrA* con respecto a la silvestre M145. Dichas alteraciones no sólo afectan a la producción de metabolitos secundarios o diferenciación, sino que también parece sufrir alteraciones importantes a nivel de transportadores e, interesantemente, cambios en la expresión de genes cuyos productos están relacionados con la homeostasis del hierro. Dado que este compuesto está descrito como una de las señales activadoras del sistema AbrA, la sobreexpresión de estos genes en un mutante carente del mismo apoya fuertemente los estudios previos realizados sobre el mismo (Rico et al., 2014b; Yepes, 2010). Determinar si la regulación ejercida sobre los genes implicados es directa o indirecta, lo cual resulta perfectamente factible dado el amplio número de reguladores que aparecen entre los datos, requerirá de ensayos de tipo ChIP-Seq, cuya puesta a punto se trató de llevar a cabo en este trabajo sin éxito. Todos estos puntos se abordarán con más detalle en el apartado "Discusión".

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DEL REGULADOR Aor1

Tal y como se mencionó en la sección de antecedentes, uno de los RR que podrían resultar de mayor interés a causa de su relación con la producción de antibióticos era el RR huérfano Aor1, por lo que su estudio más detallado formaba parte de los objetivos de este trabajo.

Para profundizar en su estudio, y dado que la delección de dicho regulador tenía un efecto pleiotrópico negativo muy fuerte sobre la producción de antibióticos ACT, RED y CDA, así como sobre la diferenciación, se procedió a sobreexpresar el gen *aor1* para tratar de conseguir una mayor producción de estos compuestos. Además, también se realizó un estudio sobre el efecto que su delección produce a nivel transcripcional en comparación con la cepa silvestre con el fin de contribuir a esclarecer las redes de regulación en las que está implicado.

Los resultados que se presentan a continuación están recogidos en el artículo "The Orphan Response Regulator Aor1 Is a New Relevant Piece in the Complex Puzzle of *Streptomyces coelicolor* Antibiotic Regulatory Network", el cual se anexa al final de la memoria.

4.1 Sobreexpresión del gen *aor1*

Con el fin de analizar el efecto de la sobreexpresión del gen *aor1* se construyó el plásmido pNaor1, un plásmido con alto número de copias derivado del vector pN702GEM3 en el cual el gen *aor1* se había insertado bajo el control del promotor del operón, la región situada *upstream* del gen *SCO2282* y que ya había demostrado ser funcional en los experimentos previos de complementación de la cepa mutante $\Delta aor1$ (Antoraz et al., 2017; Tejada, 2015). Tanto pNaor1 como su control se introdujeron en la cepa silvestre M145 de nuestro laboratorio (M145-uSAL) y se comprobaron sus fenotipos en medio LB sólido y líquido. Aunque este medio no es uno de los usados

RESULTADOS

rutinariamente en *Streptomyces*, fue el elegido para los estudios que se realizan con este regulador por los motivos que se expondrán en el siguiente apartado.

Al contrario de lo que se esperaría para un regulador positivo, la sobreexpresión en estas condiciones no conllevó un incremento apreciable en la producción de ACT ni en medio líquido ni en sólido (Figura R.21). Aunque inicialmente se planteó la hipótesis de que esto pudiera ser debido a que el promotor propio del operón no fuera suficiente para incrementar en gran medida la expresión del gen *aor1* por ser un promotor débil, experimentos de qRT-PCR demostraron que la cantidad de transcrito de este gen era muy superior en la cepa con el plásmido pNaor1 que en el control (Figura R.21).

Ciertamente, el incremento transcripcional observado no tiene por qué estar necesariamente asociado a un mayor nivel de la proteína, ya que incluso en estos casos la cantidad de Aor1 es baja y no se puede visualizar directamente en geles de proteínas; los anticuerpos necesarios para visualizarlo mediante *western blot* se están poniendo a punto en estos momentos. Si bien no se puede descartar por el momento que la falta de efecto observada se deba a una regulación traduccional, la hipótesis planteada tras analizar los datos del estudio transcriptómico podría señalar que la sobreexpresión es real, tal y como se ve en el experimento de qRT-PCR, pero que no conlleva un incremento en la producción de ACT por tratarse de un posible regulador negativo de otros reguladores negativos (ver “Discusión”).

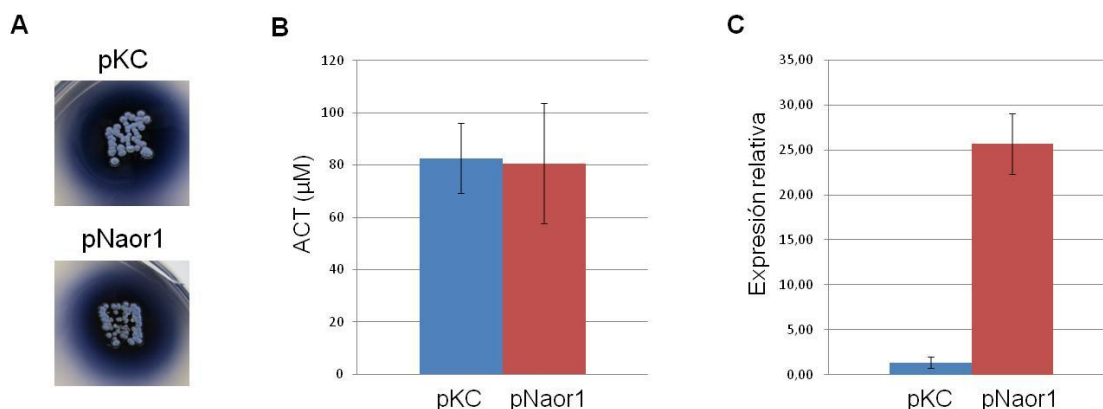


Figura R.21. A: Producción de ACT en medio LB sólido a los 7 días de crecimiento. pKC: control, plásmido vacío. pNaor1: sobreexpresión de *aor1*. B: Producción de ACT (μM) en LB líquido a los 7 días de crecimiento. C: Expresión relativa detectada por qRT-PCR del gen *aor1* en la cepa control con el plásmido vacío (pKC) y la cepa con el gen sobreexpresado (pNaor1). La barra de error corresponde a tres réplicas.

4.2. Diferencias de expresión génica entre la cepa mutante $\Delta aor1$ y la parental M145 mediante RNA-Seq

Para estudiar en profundidad este regulador se quisieron determinar cuáles eran las diferencias de expresión génica entre el mutante $\Delta aor1$ y la cepa silvestre M145 llevando a cabo para ello un experimento de RNA-Seq.

4.2.1 Condiciones del ensayo y fenotipos

Para establecer las condiciones del ensayo de RNA-Seq, se realizaron diferentes pruebas con los medios de cultivo disponibles en los que habíamos detectado diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre y la cepa carente del gen *aor1* (LB, NMMP, PGA, R2YE, R5A y SFM), resultando ser el medio LB el más reproducible, además de ser uno de los que mayor diferencia fenotípica mostraban (Figura R.22). Como se puede observar, en este medio la producción tanto de ACT como de RED es inapreciable en el mutante $\Delta aor1$, que además presenta una diferenciación morfológica fuertemente atrasada con respecto a la cepa silvestre. Es por esto que se decidió realizar este experimento en la versión líquida de dicho medio, así como el resto de los experimentos relacionados con este regulador (como los de sobreexpresión, expuestos en el apartado anterior).

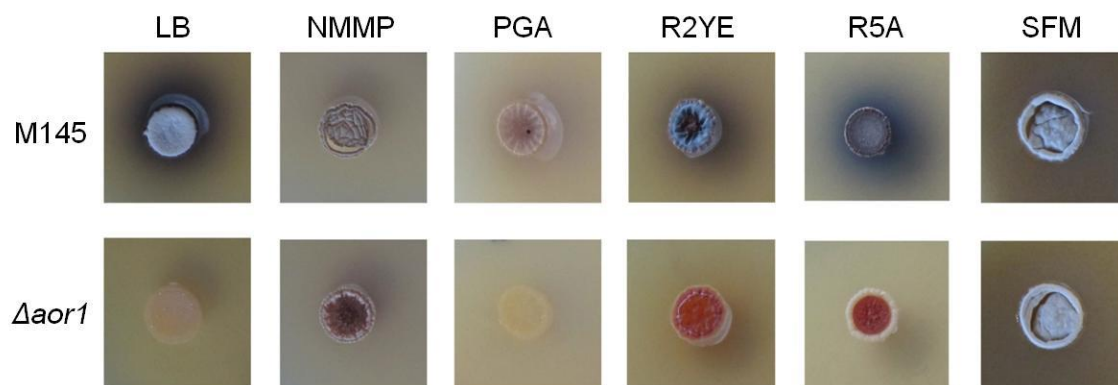


Figura R.22. Diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre M145 y la cepa mutante $\Delta aor1$ en diferentes medios sólidos (LB, NMMP, PGA, R2YE, R5A y SFM) tras 4 días de crecimiento.

RESULTADOS

Para este experimento, las cepas empleadas fueron la M145 de nuestro laboratorio (M145-uSAL) y su mutante $\Delta aor1$ obtenido previamente a este trabajo por el método REDIRECT, ya que cuando se comenzó este trabajo todavía no estaba puesta a punto la mutación por CRISPR-Cas9 y no disponíamos de dicho mutante. De nuevo, dado que se observó una menor variabilidad fenotípica entre réplicas en volúmenes pequeños, el experimento se llevó a cabo en matraces indentados de 50 mL con 10 mL de medio LB inoculado con 10^6 esporas/mL.

Se recogieron muestras cada 24 horas para cuantificar la producción de ACT y RED, evidenciándose en ambos casos grandes diferencias de producción entre una y otra cepa hasta las 96 h de cultivo, las cuales se reducían a tiempos largos de cultivo (Figura R.23).

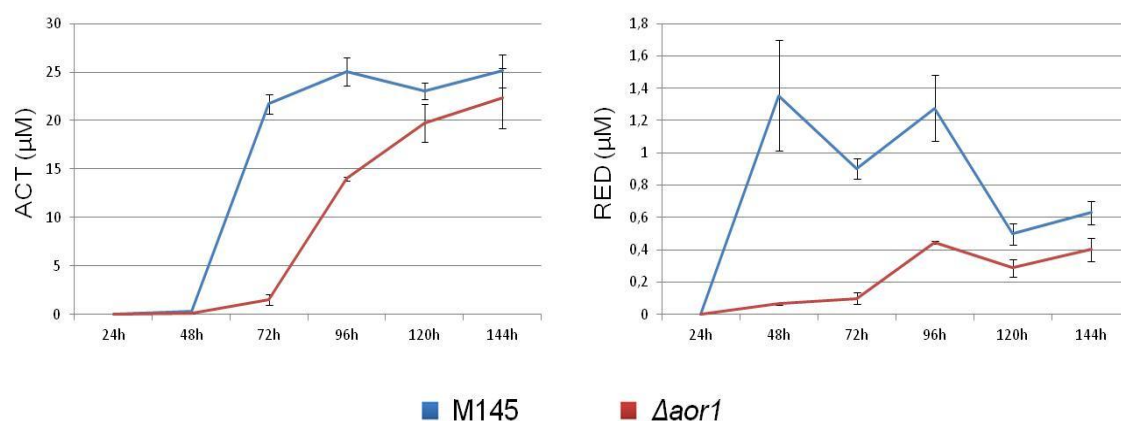


Figura R.23. Producción de antibióticos ACT (izquierda) y RED (derecha) en las cepas silvestre M145 y mutante $\Delta aor1$ en LB líquido.

De otra parte, se recogieron cultivos a 36 horas, tiempo elegido para extraer RNA de los mismos y analizar el transcriptoma en este caso. El ensayo de RNA-Seq entre las cepas M145 y $\Delta aor1$ se realizó, por lo tanto, con tres réplicas de cada una de las cepas de cultivos crecidos durante 36 horas en LB líquido a 28 °C. En este caso, cada uno de los triplicados que se emplearían en el experimento se obtuvo juntando el contenido de dos matraces, cuyas células se conservaron con *RNA Protect* antes de realizar a la extracción del RNA, procesos descritos en mayor detalle en Materiales y métodos. Como paso previo a los procesos de elaboración de librerías y secuenciación, se comprobó la concentración de los RNA por Nanodrop y su calidad mediante Bioanalyzer, viéndose que ambos datos eran especialmente buenos (RIN=10) (Figura R.24).

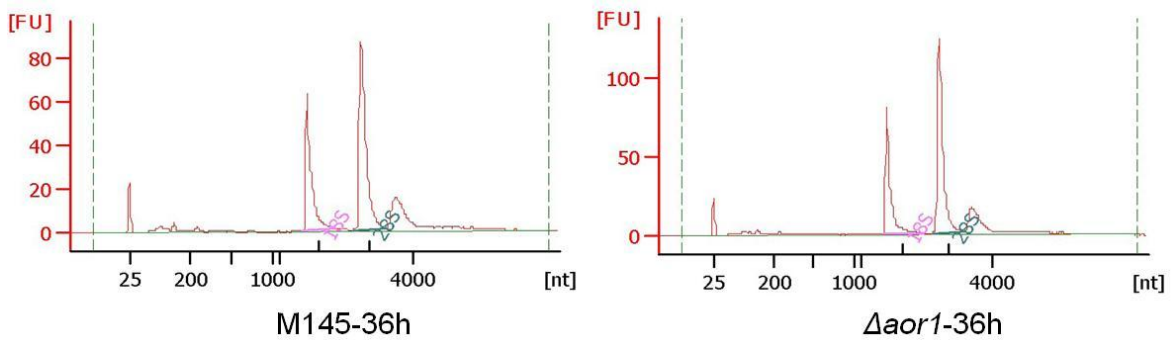


Figura R.24: Gráficas de Bioanalyzer (una muestra por cepa y tiempo).

La secuenciación fue llevada a cabo por Macrogen, que eliminó el rRNA, elaboró una librería *stranded* para cada réplica y secuenció las muestras en un HiSeq2500, dando lugar a lecturas *paired end* de 100 bases. Así se obtuvieron aproximadamente 25 millones de lecturas por ambos extremos para cada réplica, diferenciadas en función de la cadena de RNA de procedencia para cada réplica. Dichas lecturas fueron procesadas por el Dr. Alzate, de la Universidad de Medellín, de manera que, tras filtrar según su calidad (Q35), mapearlas en el genoma de referencia, cuantificarlas y normalizarlas, se obtuvieron los valores correspondientes a la expresión diferencial de cada gen entre las dos cepas empleadas.

Estos análisis mostraron que tanto las réplicas de la cepa silvestre como del mutante presentaban una gran repetitividad entre ellos, lo que causaba unos valores de error excepcionalmente bajos. Debido a esto, ya que los cambios que se producen en el mutante *Δaor1* parecen afectar a un número de genes muy elevado, se decidió poner unos umbrales mucho más restrictivos que los que suelen utilizarse en este tipo de ensayos. Los umbrales que se establecieron fueron: $FC \geq 3$ y de $FDR \leq 0,01$. Además, todos los genes seleccionados para su análisis por presentar una expresión diferencial presentaban un $p\text{-valor} \leq 0,01$.

Usando estos umbrales se obtuvieron un total de 504 genes: 217 sobreexpresados en el mutante y 287 reprimidos (Anexo V). Dichos datos fueron analizados usando DAVID Database para conocer su función y agruparlos en distintas categorías. Además, también se representaron gráficamente los cambios sobre el cromosoma de *Streptomyces*, pudiéndose apreciar cómo ciertas zonas que se comentarán en próximos apartados muestran una variación considerable entre las dos cepas (Figura R.25).

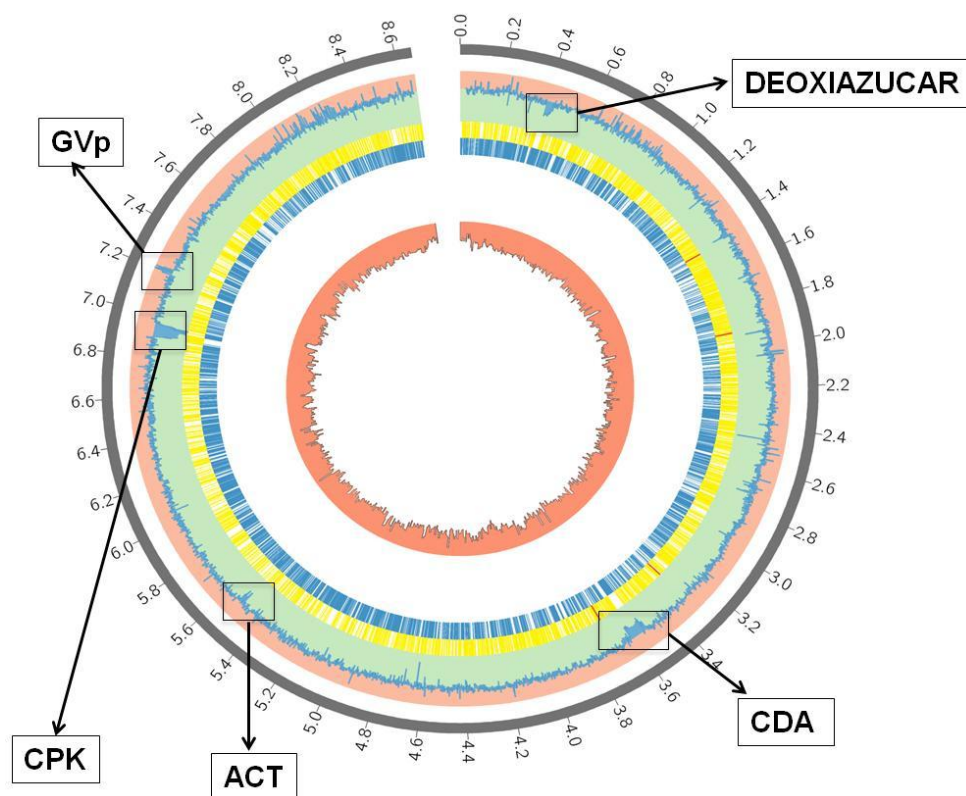


Figura R.25. Cobertura de los resultados del RNA-Seq de *S. coelicolor* M145 frente a *Δaor1*. Círculos, de fuera hacia adentro: gris, cromosoma a escala (Mb); azul, LogFC (hacia la zona rosa, genes sobreexpresados en el mutante, hacia la verde, reprimidos); amarillo, CDS (Coding Sequence) en la cadena negativa; azul, CDS en la cadena positiva; naranja, porcentaje GC. Algunos de los clústeres diferencialmente expresados más significativos están marcados: deoxiazucar, CDA, ACT, CPK y GVp (*Gas Vesicle proteín*, proteínas de vesículas de gas).

4.2.2 Genes implicados en el metabolismo secundario

Dadas las grandes diferencias encontradas en producción de antibióticos entre las dos cepas estudiadas, se puso especial atención en la expresión de aquellos genes correspondientes a clústeres de metabolitos secundarios, tanto conocidos sus productos como predichos bioinformáticamente (Nett et al., 2009). De esta manera, 96 de los genes diferencialmente expresados de acuerdo con los filtros utilizados estarían incluidos en esta categoría, 93 de ellos reprimidos en el mutante *Δaor1* y tan sólo 3 sobreexpresados (Tabla R.8).

Tabla R.8. Genes expresados diferencialmente en el mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre a 36 horas. Se muestra solo un representante de cada clúster diferencialmente expresado. En la última columna se indican el número de genes que aparecen diferencialmente expresados en cada clúster (Dif. Exp/Total). En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante.

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER	DIF. EXP/TOTAL
SCO0270	-3,07E+00	3,93E-07	3,74E-06	Proteína hipotética	SCO0267-0270 Lantibiótico	2/4
SCO0381	-2,12E+01	4,36E-32	3,32E-30	Glicosil transferasa	SCO0381-0401 Deoxiazúcar	21/21
SCO0753	4,73E+00	2,31E-27	1,33E-25	Proteína hipotética	SCO0753-0756 Bacteriocina	1/4
SCO1266	-3,11E+00	1,33E-05	7,82E-05	3-oxoacil-ACP-sintasa	SCO1265-1273 Poliquétido aromático	1/9
SCO3230	-8,81E+00	2,96E-22	1,23E-20	Péptido sintasa I de CDA	SCO3210-3249 CDA	33/40
SCO5085	-5,86E+00	5,71E-34	4,85E-32	Proteína activadora de operones. actII-ORF4	SCO5071-5092 ACT	17/22
SCO6266	-3,39E+01	2,15E-52	3,17E-50	Proteína ScbA	SCO6266 γ-butirolactona Scb1	1/1
SCO6280	-3,59E+01	2,26E-08	2,87E-07	Proteína reguladora. kasO	SCO6273-6288 CPK	16/16
SCO6682	4,96E+00	8,58E-11	1,61E-09	Proteína hipotética	SCO6681-6685 Péptido SapB que contiene lantionina	2/5
SCO7669	-3,08E+00	2,52E-05	1,35E-04	Oxidorreductasa	SCO7669-7671 Poliquétido aromático	2/3

De entre aquellos que se encuentran reprimidos podemos encontrar los clústeres de la ACT (incluido el gen de su regulador, *actII-Orf4*), el CPK (incluido el del regulador *kasO*) o el del CDA. Aunque este último no se suele identificar en medios líquidos, a la luz de este resultado se quiso demostrar su presencia en las condiciones del ensayo, realizándose un bioensayo con el sobrenadante del cultivo. Este experimento mostró cómo, efectivamente, existía una producción en la cepa silvestre que no se daba en el mutante, aunque la aparición de halo en el control negativo apunta a la posible presencia de otros compuestos activos frente a *Bacillus subtilis* además del CDA (Figura R.26).

RESULTADOS

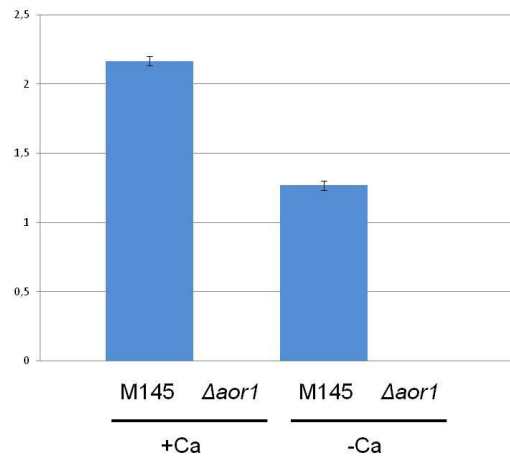


Figura R.26. Halo de inhibición (diámetro en cm) frente a *B. subtilis* a partir de sobrenadantes de cultivos de 48 horas en LB líquido. +Ca, muestras en medio con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. -Ca, controles negativos sin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

En este último clúster del CDA resulta llamativo que entre los escasos genes que no se encuentran reprimidos estén los dos correspondientes al TCS AbsA, que está descrito que actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos (McKenzie and Nodwell, 2007). Además, se puede apreciar que, si bien el gen de la HK AbsA1 (*SCO3225*) no presenta apenas variación entre ambas cepas, el del RR negativo AbsA2 (*SCO3226*) se encontraría sobreexpresado en la cepa mutante, aunque por debajo de los umbrales de FC establecidos en nuestro ensayo ($\text{FC}=1,8$, $\text{FDR}= 4,25 \times 10^{-5}$). Si bien puede parecer extraño que tan sólo el segundo gen del operón se encuentre sobreexpresado, podemos corroborar en la bibliografía la existencia de un promotor interno entre ambos genes, dando validez a las observaciones hechas (Santos-Beneit et al., 2012) (Figura R.27).

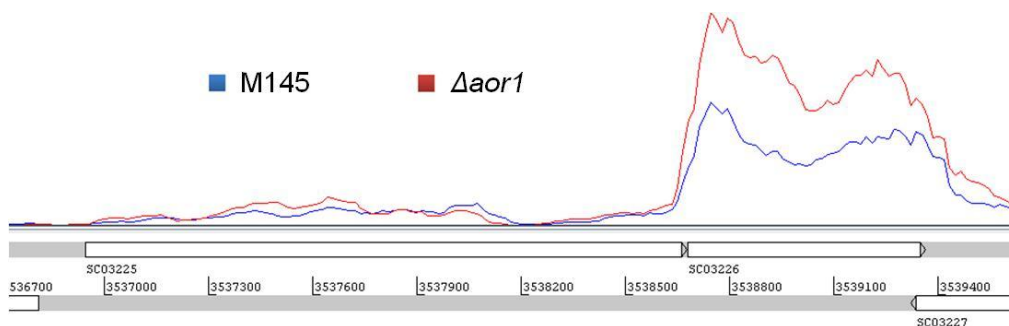


Figura R.27. Representación gráfica de las lecturas obtenidas de la cadena *forward* en los genes *SCO3225-3226*.

También aparecen reprimidos entre los datos obtenidos el gen implicado en la síntesis de la γ -butirolactona SCB1 (*scbA*, *SCO6266*) así como el del regulador responsable de unir esta butirolactona y unirse a distintas zonas promotoras (*scbR*, *SCO6265*). El interés de estos dos genes reside en que las γ -butirolactonas son hormonas implicadas en procesos de comunicación celular en los que la bacteria usa la producción y detección de autoinductores para sincronizar la expresión génica y el crecimiento, y su adición al medio de cultivo es capaz de promover la producción de antibióticos (Tan et al., 2013). Además, el gen *kasO*, el CSR del clúster del CPK, está fuertemente regulado por estos compuestos, ya que ScbR regula su expresión de forma negativa en condiciones normales hasta que la unión de γ -butirolactonas produce su liberación del promotor (Takano et al., 2005a).

Dentro de los clústeres de metabolitos secundarios no descritos encontramos el de un antibiótico (*SCO0267-0270*), un deoxiazúcar (*SCO0381-0401*) o un poliquétido aromático (*SCO7669-7671*).

4.2.3 Genes que codifican posibles reguladores

Exceptuando aquellos genes que codifican proteínas reguladoras ya incluidos en clústeres de metabolitos secundarios, se pudieron encontrar un total de 50 genes que codificarían proteínas posiblemente implicadas en procesos regulatorios, 24 sobreexpresados y 26 reprimidos en el mutante *Δaor1*. Entre ellos se encuentran varios TCS, tanto sobreexpresados como reprimidos: *SCO0870-0871*, *SCO1369-1370*, *SCO1801-1802*, *SCO2517-2518*, *SCO6421-6422* y las HK huérfanas *SCO3750*, *SCO6268* y *SCO7463*. También aparecen genes responsables de reguladores como AtrA (*SCO4118*), de reguladores transcripcionales de las familias TetR, LysR o GntR, de proteínas de unión a DNA y de varios factores sigma (Tabla R.9).

Estos últimos parecerían de gran importancia de cara a explicar la cascada regulatoria del regulador Aor1, así como también para orientar acerca de qué tipo de respuestas produciría y a qué señales podría estar respondiendo. Esto es debido a que varios de estos factores tales como SigB (*SCO0600*), SigH (*SCO5243*), SigK (*SCO6520*), SigL (*SCO7278*), y SigM (*SCO7314*), se encuentran estrechamente relacionados entre sí en lo que está descrito como una cascada de respuesta a estrés osmótico (Facey et al., 2011) (Figura R.28). A su vez, también se pueden encontrar sobreexpresados en el mutante otros reguladores relacionados con esta cascada, como pueden ser *dpsA* (*SCO0596*) además de muchos genes regulados directamente por el

RESULTADOS

propio SigB, tales como aquellos de los reguladores *catB* (SCO0666), *ssgC* (SCO7289), *ssgG* (SCO2924) y el SCO7277; el factor anti-sigma SCO5244 y el anti-anti-sigma SCO7325; así como proteínas de vesículas de gas, de membrana o sin función conocida (Lee et al., 2004) (Tabla R.10).

Tabla R.9. Expresión diferencial del mutante *ΔaorI* con respecto a la cepa silvestre a 36 horas de los genes mencionados en el texto que codifican para posibles proteínas reguladoras. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante.

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	NOMBRE
SCO0596	2,61E+01	2,00E-62	5,69E-60	Proteína de unión a DNA	<i>dpsA</i>
SCO0870	3,22E+00	3,25E-15	8,90E-14	Regulador de respuesta	
SCO0871	3,17E+00	9,54E-15	2,54E-13	Histidina quinasa	
SCO1369	-5,85E+00	1,33E-30	9,08E-29	Histidina quinasa	
SCO1370	-4,58E+00	4,90E-33	3,85E-31	Regulador de respuesta	
SCO1801	-4,59E+00	4,59E-11	8,86E-10	Regulador de respuesta	
SCO1802	-4,14E+00	1,09E-11	2,25E-10	Histidina quinasa	
SCO2517	-6,86E+00	4,44E-41	4,76E-39	Regulador de respuesta	
SCO2518	-7,99E+00	5,99E-50	7,91E-48	Histidina quinasa	
SCO2924	3,79E+00	4,81E-25	2,39E-23	Regulador	<i>ssgG</i>
SCO3134	-4,18E+00	7,41E-19	2,58E-17	Regulador de respuesta	
SCO3750	-3,78E+00	7,98E-20	2,96E-18	Histidina quinasa	
SCO4118	-5,62E+00	1,19E-21	4,92E-20	Regulador transcripcional de la familia TetR	<i>atrA</i>
SCO5243	1,26E+01	1,60E-41	1,80E-39	Factor sigma	<i>sigH</i>
SCO6268	-1,30E+01	7,56E-04	2,33E-03	Histidina quinasa	
SCO6421	-4,36E+00	4,38E-25	2,20E-23	Histidina quinasa	
SCO6422	-3,78E+00	7,35E-17	2,27E-15	Regulador de respuesta	
SCO6520	6,63E+00	5,46E-35	4,81E-33	Factor sigma	<i>sigK</i>
SCO7314	3,17E+01	5,29E-86	7,82E-83	Factor sigma	<i>sigM</i>
SCO7463	3,47E+00	2,58E-10	4,46E-09	Histidina quinasa	

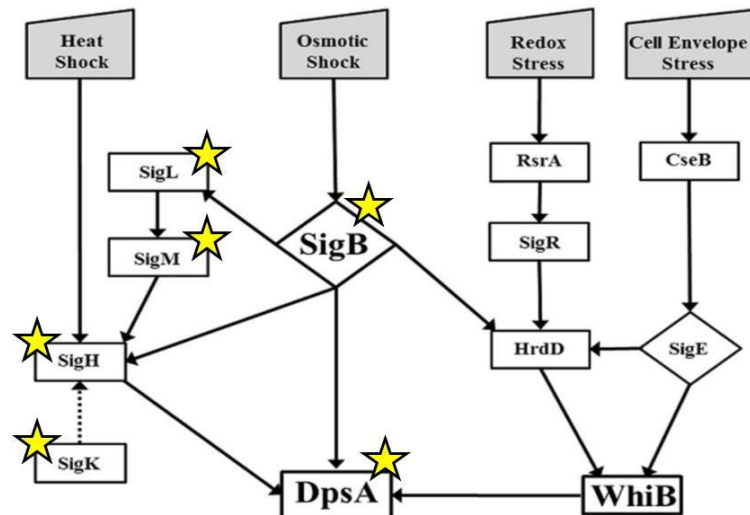


Figura R.28. Cascada regulatoria de SigB según (Facey et al., 2011). La estrella amarilla señala aquellos genes sobreexpresados en el mutante *Δaor1* con respecto a la cepa silvestre.

Tabla R.10. Genes diferencialmente expresados en *Δaor1* con promotores posiblemente regulados por SigB (Lee et al., 2004). En rojo, genes sobreexpresados en el mutante.

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN
SCO0600	5,67E+00	3,82E-27	2,16E-25	Factor sigma SigB
SCO0666	1,14E+01	6,45E-34	5,42E-32	Catalasa
SCO0759	6,21E+00	6,02E-28	3,53E-26	Proteína hipotética
SCO0792	3,05E+00	1,40E-14	3,70E-13	Proteína hipotética
SCO2372	7,20E+00	2,74E-46	3,49E-44	Proteína hidrofóbica
SCO5244	1,14E+01	2,46E-41	2,67E-39	Factor anti-sigma
SCO6494	7,22E+00	3,75E-36	3,43E-34	Proteína de membrana
SCO6496	5,52E+00	5,32E-28	3,20E-26	Deshidrogenasa
SCO6516	2,92E+01	1,36E-79	1,25E-76	Proteína hipotética
SCO7041	1,13E+01	2,28E-36	2,13E-34	Proteína hipotética
SCO7237	1,93E+01	7,09E-83	8,73E-80	Proteína secretada
SCO7238	1,16E+01	8,52E-56	1,57E-53	Proteína hipotética
SCO7277	3,58E+00	6,31E-23	2,73E-21	Proteína reguladora
SCO7278	6,68E+00	7,09E-32	5,30E-30	Factor sigma SigL
SCO7289	8,40E+00	1,72E-41	1,89E-39	Regulador
SCO7325	1,47E+01	1,91E-64	6,72E-62	Antagonista de factor anti-sigma
SCO7374	6,25E+00	9,66E-18	3,19E-16	Nitrato reductasa NarB
SCO7378	9,34E+00	1,65E-23	7,41E-22	Proteína hipotética
SCO7431	9,54E+00	7,51E-56	1,42E-53	Proteína integral de membrana

RESULTADOS

Por otra parte, también resulta importante el factor sigma SigU, teóricamente relacionado con secreción de proteínas, cuyo gen (*SCO2954*) se encuentra reprimido en el mutante. De igual manera, también se encuentran reprimidos varios de los genes a los cuales se ha descrito que regula de forma directa (Gordon et al., 2008) (Tabla R.11).

Tabla R.11. Genes diferencialmente expresados en *Δaor1* con posibles promotores regulados por SigU (Gordon et al., 2008). En azul los genes reprimidos en la cepa mutante.

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN
SCO0644	-4,13E+00	1,81E-14	4,70E-13	Proteína de membrana
SCO0752	-4,47E+00	2,28E-22	9,62E-21	Precursor de proteasa
SCO0930	-5,49E+00	3,81E-21	1,55E-19	Lipoproteína
SCO1356	-3,62E+00	5,92E-21	2,38E-19	Proteína secretada
SCO1573	-4,37E+00	2,72E-22	1,14E-20	Proteína de membrana
SCO2217	-4,49E+00	8,64E-17	2,64E-15	Proteína secretada
SCO2408	-3,89E+00	1,65E-14	4,31E-13	Aminotransferasa
SCO2495	-3,43E+00	2,98E-16	8,77E-15	Proteína de membrana
SCO2954	-3,00E+00	5,12E-18	1,72E-16	Factor sigma SigU
SCO6647	-4,28E+00	1,34E-12	3,05E-11	Proteína integral de membrana
SCO6650	-3,28E+00	1,96E-19	7,13E-18	Proteína hipotética

4.2.4 Genes que codifican proteínas de membrana

Otra de las categorías en las que se encuentra un gran número de genes diferencialmente expresados entre las dos cepas utilizadas es el de proteínas relacionadas con las membranas. En este grupo se incluirían 95 genes, 43 sobreexpresados y 52 reprimidos. Entre ellos encontramos tanto proteínas estructurales como también transportadores de distintos tipos: ABC (*ATP-binding Cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*) o RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*) (Anexo V).

4.2.5 Otros genes de interés

Además de estos grupos con mayor representación en los datos obtenidos, existen otros genes que pueden resultar interesantes (Tabla R.12). Unos de ellos son los

que codifican proteínas de vesículas de gas, el operón *SCO6496-6508*, fuertemente sobreexpresado en la cepa mutante *ΔaorI*. Este operón, cuyo promotor es también diana de SigB, es uno de los dos existentes en *S. coelicolor* que codifican este tipo de proteínas, las cuales tendrían papeles relacionados con la regulación de la homeostasis y de respuesta a estrés osmótico.

Así mismo, también se encuentran un número importante de genes relacionados con proteínas secretadas (25 en total, 9 sobreexpresados y 16 reprimidos). También pueden ser interesantes genes como el *SCO2113*, codificante de una bacterioferritina cuyo papel exacto en *Streptomyces* permanece desconocido. Otros genes de interés pueden ser *sapA* (*SCO0409*), que codifica una proteína de la cubierta de las esporas; *efp* (*SCO1491*), responsable del factor de elongación P; *rplM* (*SCO4734*), codificante de la proteína ribosomal 50S L13; y genes encargados de la síntesis de citocromo P450 (*SCO7417-7418*).

Tabla R.12. Expresión diferencial del mutante *ΔaorI* con respecto a la cepa silvestre a 36 horas de diversos genes de interés mencionados en el texto. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante.

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN
SCO0409	-5,64E+00	1,35E-29	8,74E-28	Proteína asociada a esporas
SCO1491	3,71E+00	1,72E-10	3,06E-09	Factor de elongación P
SCO2113	3,35E+00	2,22E-04	8,41E-04	Bacterioferritina
SCO4734	3,42E+00	1,73E-08	2,27E-07	Proteína ribosomal 50S L13
SCO6496	5,52E+00	5,32E-28	3,20E-26	Deshidrogenasa
SCO6497	5,83E+00	1,07E-27	6,25E-26	Transcetolasa
SCO6499	2,45E+01	3,61E-65	1,48E-62	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6500	2,25E+01	3,84E-74	2,03E-71	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6501	2,29E+01	4,26E-56	8,50E-54	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6502	3,33E+01	2,17E-92	4,02E-89	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6503	1,63E+01	8,68E-68	4,28E-65	Proteína hipotética
SCO6504	2,21E+01	2,28E-77	1,53E-74	Proteína hipotética
SCO6505	1,94E+01	7,61E-77	4,69E-74	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6506	1,18E+01	4,43E-63	1,42E-60	Proteína de vesícula de gas
SCO6507	1,61E+01	3,18E-29	2,03E-27	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO6508	1,41E+01	1,96E-50	2,68E-48	Proteína de síntesis de vesículas de gas
SCO7417	4,23E+00	2,01E-20	7,91E-19	Proteína de la familia citocromo P450
SCO7418	3,83E+00	3,06E-20	1,17E-18	Proteína de la familia citocromo P450

4.2.6 Conclusiones del análisis comparativo de las cepas *Δaor1* y M145 mediante RNA-seq

El análisis de los datos resultantes del experimento de RNA-Seq ha resultado especialmente significativo a la hora de aportar nueva información sobre el papel del RR huérfano Aor1 en la célula. A las ya observables diferencias en producción de antibióticos y diferenciación podemos añadir cambios significativos en el metabolismo secundario en su conjunto y en las redes regulatorias relacionadas con estrés osmótico, estas últimas sobreexpresadas de forma importante en el mutante *Δaor1*. Pese a que ello no esclarece si estas respuestas son directas o indirectas, lo cual se está tratando de determinar mediante un experimento de ChIP-Seq, sí permitirá orientar futuros experimentos con este regulador a dilucidar la profundidad de esas respuestas y determinar el estímulo que las provoca.

Discusión

1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTIBIÓTICOS, UNA APROXIMACIÓN NO EXENTA DE PROBLEMAS

La producción heteróloga de distintos compuestos es una técnica que se lleva a cabo de forma habitual en diversos ámbitos. Muchas investigaciones centradas en encontrar nuevas alternativas válidas para combatir microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos actualmente empleados están poniendo el foco en este método para tratar de activar los clústeres silenciados de metabolitos secundarios que se han podido detectar en muchos genomas secuenciados. No obstante, existen diversos problemas que impiden que dicha aproximación sea totalmente efectiva, ya que el hecho de aislar un clúster de una especie e introducirlo en otra se realiza ignorando en muchos casos cuáles son las causas de que no se esté expresando en la primera y sí pueda hacerlo en la segunda. Por ello, garantizar el éxito de este tipo de estrategias requiere ensayar un número ingente de variables, desde cepas receptoras a medios y condiciones de cultivos, cuya realización suele conllevar una gran cantidad de tiempo y recursos, razón por la cual en muchos casos se están comenzando a llevar a cabo con nuevas tecnologías automatizadas que facilitan en gran medida este tipo de ensayos masivos (Chao et al., 2017). En la línea de investigación que hemos llevado a cabo durante los últimos años se buscó desarrollar cepas que fueran susceptibles de ser usadas como hospedadoras de la mayor variedad de rutas posible.

El empleo de las cepas M1146 y M1154 de *S. coelicolor*, cuya utilidad para estos fines está plenamente acreditada (Alt and Wilkinson, 2015; Linares-Otoya et al., 2017; Niu et al., 2013; Yu et al., 2018; Zong et al., 2018), ha demostrado nuevamente durante este trabajo su enorme potencial para estos fines. La producción obtenida de oviedomicina, eloramycin, rebecamicina, tetracenomicina C y mitramicina, antibióticos y antitumorales producidos por especies muy diversas, dan buena cuenta de la enorme ventaja que supone su uso con respecto a una cepa silvestre, tanto cuantitativa como cualitativa, a la vez que apuntan a cómo *S. coelicolor* parece disponer de todo lo necesario para producir una gran variedad de compuestos principalmente cuando se evita la producción de sus principales antibióticos propios. Aún con todo, la producción de estaurosporina ha continuado siendo esquiva en las condiciones probadas durante

DISCUSIÓN

este trabajo, producción que presumiblemente podría llegar a darse empleando diferentes medios y condiciones u optando por otras técnicas como cambiar los promotores de los genes reguladores de la ruta.

Precisamente, la puesta a punto de condiciones parece esencial para conseguir los objetivos de mejora de producción que se plantearon. Si bien para casi todos los experimentos que se realizaron se encontraron los medios adecuados para conseguir niveles aceptables de producción y reproducibilidad, no se puede dejar de notar la presencia de una variabilidad fenotípica característica en *S. coelicolor* que podría corresponder en algunos casos a factores externos desconocidos. Por ejemplo, la menor variabilidad encontrada al crecer cultivos líquidos en volúmenes más pequeños (10 mL) podría estar asociada con una mayor homogeneidad en la oxigenación, al ser los matraces de menor volumen más uniformes en el tamaño y forma de sus indentaciones. A la vista del efecto que la luz tiene sobre la producción de carotenoides en *S. coelicolor*, tampoco se puede dejar de reflexionar si una iluminación desigual en un incubador orbital podría llegar a influir de alguna manera en la variabilidad entre réplicas, lo cual de hecho podría tener un sustento teórico (Takano et al., 2015; Takano et al., 2005b), aunque experimentos muy preliminares realizados en esta línea no parecen indicar que esto juegue un papel importante al respecto.

Así mismo, la técnica de mutación con el sistema CRISPR/Cas9 (Tong et al., 2015) puesta a punto en nuestro laboratorio durante este trabajo puede suponer un gran salto de cara a futuras investigaciones. No sólo por la disminución drástica de los tiempos necesarios para obtener mutantes, sino por su mayor efectividad y las posibilidades que abre su uso. Aunque en este trabajo no se ha empleado, existe también una versión catalíticamente muerta de la nucleasa Cas9 (dCas) que permite bloquear la transcripción de un determinado gen en momentos concretos sin necesidad de mutarlo (Tong et al., 2015) Esta versión podría ser de gran utilidad siempre que se consigan ajustar las condiciones del promotor inducible por tioestreptona que controla la expresión de la nucleasa dCas para que funcione como tal, ya que, en nuestras manos, hasta el momento, se ha comportado como si tuviera una expresión basal independiente del inductor y suficiente para que funcione el sistema.

Es necesario mencionar, no obstante, que si bien el sistema CRISPR/Cas9 desarrollado por Tong funcionó a la perfección, aquel desarrollado por Cobb y colaboradores que se trató de poner a punto en primer lugar para mutar el sistema *AbrA*

no llegó a dar resultados positivos. El diseño y construcción de los plásmidos derivados de su vector, pCRISPomyces2, se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el artículo de referencia (Cobb et al., 2014) sin encontrar ninguna clase de dificultad, pero el sistema resultó completamente inviable en su último paso, consistente en introducir los plásmidos en *Streptomyces*.

Concretamente, los resultados esperados en esta etapa cuando se realizan los controles correspondientes serían los mismos que se describieron al emplear el sistema de Tong: la conjugación con el plásmido vacío original (pCRISPomyces2) debería haber dado lugar a un gran número de conjugantes; la construcción intermedia que contiene la secuencia guía que dirige el corte pero en la cual aún no se ha introducido el molde con el que repararla (que habíamos denominado pCRISPomyces2-sgA), no tendría que haber generado ningún conjugante; y por último, con el plásmido final con todos los elementos (pCRISPomyces2-AbrA), se tendría que haber encontrado un número intermedio de conjugantes que habrían tenido la mutación deseada.

Sin embargo, en ninguno de estos tres casos se obtuvieron apenas conjugantes. Lo mismo ocurría si se intentaba introducir mediante transformación de protoplastos o si en lugar de utilizar *S. coelicolor* se probaba en *S. lividans*, resultando especialmente sorprendente que incluso el plásmido inicial pCRISPomyces2 sin ningún tipo de modificación no fuera capaz de conjugarse acorde a lo esperado. Además, las escasas colonias que se pudieron obtener tras múltiples intentos y que teóricamente hubieran podido ser mutantes no sólo no habían perdido los genes del sistema AbrA, sino que tampoco llegaban a eliminar el plásmido termosensible ni cuando se crecían a alta temperatura o se les daba sucesivos pases sin antibiótico que lo seleccionara.

Se llevaron a cabo distintos intentos de cara a determinar la causa de estos problemas, para lo cual se generó una versión del plásmido sin el gen de la nucleasa Cas9 (para descartar que de alguna manera estuviera cortando de forma inespecífica el genoma de *S. coelicolor*) y otra versión en la que se había sustituido su origen de replicación en *Streptomyces* por otro similar (tal y como se detalla en el artículo original, este tiene una ligera modificación para eliminar un sitio de corte de enzimas de restricción para facilitar el proceso de construcción). En ambos casos, el resultado fue igualmente negativo, por lo que se descartó este sistema y se pasó a ensayar el desarrollado por Tong y colaboradores.

DISCUSIÓN

Pese a los avances que puedan haber supuesto la introducción del sistema CRISPR/Cas9, el empleo de las cepas M1146 y M1154 y los ajustes en las condiciones de cultivo, la meta final planteada como primer objetivo de este trabajo ha resultado ser más esquiva de lo previsto. Desde un punto de vista teórico, la eliminación sucesiva de TCS que por separado tuvieran un efecto negativo sobre la producción de antibióticos podría dar lugar a mutantes con una capacidad de sintetizar metabolitos secundarios muy superior a las encontradas hasta ahora. Esta hipótesis se vio refrendada en parte por los resultados obtenidos una vez que se dispuso de los mutantes individuales, dobles y triples, los cuales apuntan a un efecto generalmente beneficioso en cuanto a producción de los antibióticos propios se refiere.

No obstante, el principal impedimento en esta estrategia se encuentra a la hora de producir otros compuestos de forma heteróloga. El no poder tan siquiera obtener o crecer las cepas en varios de los casos ensayados supone un importante obstáculo, incluso cuando se sospecha que dicho efecto pueda venir dado por una toxicidad generada por la propia producción del compuesto.

Esta presunta toxicidad viene avalada por dos hechos. El primero es que los controles negativos (transformados con los vectores sin el clúster biosintético) no presentan estos problemas. El segundo, y más significativo, es que en el caso de la rebecamicina todas las cepas derivadas de la M145 se pudieron transformar y crecer tanto con el vector control como con aquel que incluía el clúster completo, mientras que las cepas mutantes derivadas de la M1146 y M1154 sólo crecieron en el caso del vector vacío. Esto resulta especialmente significativo porque, como se vio en experimentos anteriores, en el caso de la rebecamicina no se encuentra producción en la cepa M145 y sí en las M1146 y M1154. Así, las cepas que muestran problemas de transformación o crecimiento quedan restringidas básicamente a aquellas que tendrían que estar produciendo este compuesto, y más concretamente a los mutantes, los cuales deberían estar aumentando unos valores de producción ya de por sí elevados en las cepas parentales de las que proceden.

En el otro caso estudiado al respecto, el referente a la producción de mitramicina, si bien no se encontraron los problemas descritos para las otras rutas biosintéticas, el efecto de las mutaciones generadas resultó neutro en la mayoría de los casos. La producción de este compuesto se pudo obtener en los dos medios ensayados, con grandes diferencias entre las cepas M1146 y M1154 con respecto a la M145, pero el efecto positivo que mostraban las mutaciones individuales de los sistemas AbrA, AbrB

y la HK AbrC1 con la producción de compuestos como la tetracenomicina C o la oviedomicina no es apreciable en este caso, lo que a su vez hacía menos probable que mutaciones conjuntas de estos genes lo tuvieran.

El hecho de tener que utilizar medios específicos para cada ruta es un factor a tener en cuenta en futuros estudios en esta dirección, ya que los efectos de mutar un determinado gen o genes suelen variar en función de las condiciones empleadas. Al tratarse en estos casos de sistemas cuyo modo de acción aún no está claro, resulta fácil subestimar la influencia de otros sistemas regulatorios en los fenotipos encontrados, que probablemente se vea intensificado en el momento en que se delecionan en conjunto sistemas que pudieran compartir algún paso en la cascada regulatoria que generan. Mención aparte merece el hecho de que, aunque hemos visto que la producción heteróloga de algunos compuestos puede verse afectada por las estrategias aquí desarrolladas, puede ocurrir que la regulación propia de una ruta concreta no esté relacionada con este tipo de sistemas regulatorios o lo haga de diferente manera, dando lugar a los resultados observados en el caso de la mitramicina.

Ciertamente existirían otras aproximaciones que potencialmente podrían permitir tanto solucionar los problemas de toxicidad de los casos anteriores como incrementar los niveles de producción, pero quedan más alejadas del objetivo principal que se pretendía lograr en este trabajo. Modificar condiciones de cultivo, ensayar distintos tipos de plásmidos replicativos e integrativos, modificar los promotores de los reguladores de ruta o realizar procesos de mutación-selección serían estrategias perfectamente válidas para mejorar la producción de un compuesto concreto, pero, como hemos podido ver, encontrar una única cepa que consiga mejorar la producción de una gran variedad de compuestos parece altamente improbable.

2. EFECTO DE DIFERENTES FONDOS GENÉTICOS EN LA CEPA SILVESTRE

Una de las mayores pruebas de la complejidad regulatoria de *Streptomyces* se ha podido vislumbrar en la falta de repetitividad entre los resultados que se habían obtenido previamente en las investigaciones hechas en nuestro laboratorio con la cepa

DISCUSIÓN

M145-uSAL y sus derivadas (Antoraz, 2013, 2014; Yepes, 2010) con respecto a los obtenidos en las cepas usadas en la primera parte de este trabajo, M145-2011 y derivadas.

Como se ha visto, existen diferencias considerables entre las cepas usadas, M145-2011 y M145-uSAL, tanto en producción de antibióticos como en esporulación. En ambos casos, la cepa M145-uSAL muestra una clara ventaja con respecto a la M145-2011, produciendo mayor cantidad de ACT y mostrando unos niveles de esporulación muy superiores que facilitan en gran medida el trabajo con ella.

Estas diferencias fenotípicas no resultan del todo sorprendentes, habida cuenta de que ambas cepas provienen de diferentes laboratorios. La denominada M145-2011 es un clon aislado por Andrew Hesketh a partir de una spora única que mostraba el fenotipo más acorde al esperado con la cepa tipo y secuenciada por Darren Heavens. Por su parte, la M145-uSAL deriva de un *stock* procedente del INBIOTEC de León en el año 2001 con la que se comenzó un proyecto Nacional coordinado entre 8 grupos que trabajaban en *Streptomyces*. En cuanto al genoma de referencia, la secuencia del mismo se obtuvo a partir de una librería de cósmidos de *S. coelicolor* M145 (Bentley et al., 2002).

La comparativa entre el genoma de la cepa M145-2011 con las secuencias obtenidas de la M145-uSAL, la más importante por sus implicaciones prácticas al estar trabajando con ambas cepas, aportó una larga lista de pequeñas mutaciones, la mayoría de las cuales no parecen tan importantes por sí mismas como para generar las diferencias fenotípicas observadas. Aunque sólo se puede teorizar sobre el efecto de la mayoría de estos cambios, existen varios genes que a priori tendrían más probabilidad de influir en ello.

Uno de los más interesantes de estudiar podría ser el gen *SCO1417*. La delección de una C en la cepa M145-2011 genera un cambio de fase en un gen que está anotado como responsable de un putativo regulador transcripcional de la familia GntR pero que no está estudiado hasta el momento. Dada la complejidad de los sistemas regulatorios, no se puede descartar que una diferencia como esta en un gen regulador pueda estar implicada en los efectos descritos, aunque demostrarlo requeriría estudios en mayor detalle.

Se desconoce también el efecto que pueda tener la delección de una C en la cepa M145-uSAL en el gen *SCO5404*, que codifica la HK del sistema RapA (Lu et al., 2007). Aunque es cierto que este sistema está relacionado con producción de

antibióticos (el mutante del sistema presenta un descenso en la producción de ACT), la mutación encontrada no se encuentra en todas las lecturas obtenidas sino en algo menos de la mitad.

Tampoco resulta descartable el efecto que otra delección de una C en el gen *SCO2177* de M145-2011 pueda tener en el fenotipo. El producto de este gen está descrito como una cobalamina sintasa, siendo la cobalamina (también conocida como vitamina B12) un importante cofactor. De hecho, se ha relacionado esta molécula con la producción de carotenoides y respuesta a luz que se comentó en secciones anteriores, y cuya ruta regulatoria se encuentra descrita (Takano et al., 2015; Takano et al., 2005b). No obstante, es cierto que existen otros dos *loci* aparte del *SCO2173-2177* que son capaces de llevar a cabo esta función, por lo que tal vez el cambio de fase descrito carezca de efecto.

El gen *SCO1508*, con una G delecionada en M145-2011, también puede estar teniendo un papel relevante en estos fenotipos. Codifica para una histidil tRNA sintetasa, enzima responsable de la síntesis de histidil tRNA, que resulta esencial para la incorporación de histidina en proteínas, y por lo tanto dicha mutación podría estar afectando de forma global a otras muchas proteínas implicadas en diferentes procesos.

No hay que subestimar sin embargo otro tipo de mutaciones. Aunque apenas nos hemos centrado aquí en los SNP, el cambio de un aminoácido por otro puede tener efectos drásticos en una proteína, de igual manera que mutaciones en zonas intergénicas podrían estar afectando a la transcripción de ciertos genes en aquellos casos en que se encuentran en su promotor. No obstante, su efecto resulta aún más difícil de predecir que el de los *indels*, ya que puede ser completamente inocuo o alterar en gran medida el funcionamiento de una proteína.

En cualquier caso, lo más probable parecería ser que las diferencias fenotípicas encontradas provengan de varias de estas mutaciones en conjunto, no sólo de reguladores sino también de algunos efectores. Además, como se ha dicho anteriormente, no es del todo descartable que existan otras modificaciones en su genoma que debido a la técnica de secuenciación empleada no se hayan podido detectar. Reorganizaciones genómicas y duplicaciones o delecciones en zonas conflictivas (clústeres de poliquétidos como la ACT o zonas de RNA ribosomales) requieren de otras técnicas de secuenciación que permitan su correcto ensamblaje e, incluso así, no son 100% efectivas debido a las limitaciones de la técnica.

DISCUSIÓN

Por otra parte, este experimento de secuenciación también ha aportado información relevante cuando se realiza la comparativa de las cepas M145-2011 y M145-uSAL con la secuencia de referencia por varios motivos. Lo más significativo es que existen una gran cantidad de variaciones de tipo SNP e *indels* coincidentes en ambas cepas con respecto a dicho genoma de referencia. Ocurre igual con varias inserciones de mayor tamaño que se aprecian en la cepa M145-2011 con respecto al genoma de referencia: la inserción de un transposón en *SCO5461* también parece estar presente en la cepa M145-uSAL, de acuerdo con las lecturas obtenidas en sus extremos. Así mismo, inserciones intergénicas como la mencionada entre los *SCO4440-4441* también se dan en la M145-uSAL.

Este último en concreto, que es equivalente a lo que sucede en las otras inserciones en regiones intergénicas señaladas en la tabla R.3 (Resultados, página 77), resulta bastante revelador. Si bien las inserciones no resultan extrañas en *Streptomyces*, parece poco probable que todas las especies cercanas tengan esas regiones menos la cepa anotada de *S. coelicolor* y que de forma aleatoria dos cepas de este organismo hayan adquirido de forma independiente esta misma inserción exactamente en el mismo punto del genoma. Parecería más factible, sin embargo, que todas estas especies, incluida *S. coelicolor*, presentaran dichas regiones del genoma igual, y que por algún motivo no estuviera presente en la secuencia que se usa actualmente como referencia (Bentley et al., 2002). Si bien una posibilidad es que, debido a la antigüedad de la secuencia, puedan existir errores causados por la técnica utilizada en su momento, otra explicación es que la cepa de referencia se encuentre separada filogenéticamente de la que ha dado origen a las dos cepas utilizadas en este trabajo, que a su vez han evolucionado en diferentes laboratorios. Experimentos ajenos a este trabajo realizados en nuestro grupo sobre el cósmido StD6 (que abarca la secuencia que incluye la región intergénica *SCO4440-4441*) muestran que esta sección del cósmido es tal cual se recoge en la secuencia de referencia, lo que descarta un error en la secuenciación al menos en ese caso concreto.

La identificación de todas estas diferencias a nivel genético apoya que existan diferentes fenotipos entre las cepas M145-2011 y M145-uSAL, y a su vez abre una cierta discusión sobre si la secuencia de referencia, pese a ser tremendamente buena en todos los aspectos, pueda presentar diferencias o errores con respecto a las cepas

utilizadas actualmente, y sobre la necesidad de actualizar tanto secuencia como anotación en función de los nuevos avances que se hagan en el campo.

No obstante, el problema base que dio origen a este experimento de secuenciación, referente a la existencia de diferentes cepas con distintos fenotipos de producción de antibióticos según el medio y el mutante, no parece tener una solución fácil. Primeramente, el hecho de que en el mismo *stock* parezca existir una población con diferentes mutaciones que no están extendidas hace que de querer reducir esta diversidad haya que reaislar una nueva colonia y secuenciarla de nuevo, y conservarla posteriormente evitando resiembras sucesivas que puedan generar más variabilidad. También es conveniente avisar de que algunas de las mutaciones puntuales, si se encuentran en zonas de escasa cobertura y no suponen un gran porcentaje de las lecturas de esa región, podrían ser debidas a errores propios del proceso de secuenciación. Por otra parte, intentar aprovechar los datos de este experimento con la finalidad práctica de reducir las diferencias fenotípicas entre ambas cepas y extrapolar más efectivamente los resultados previos parecería una labor de gran complejidad en estos momentos, habida cuenta de que esto implicaría profundizar en el efecto de cada una de las mutaciones diferenciales.

3. AbrA, UN SISTEMA RELACIONADO CON LA CAPTACIÓN DE HIERRO

La determinación del papel que juega un determinado TCS en la célula ha sido durante años una labor ardua que requería de la realización de un buen número de experimentos para determinar la señal a la que respondían y su cascada regulatoria, hecho pese al cual se ha conseguido dar grandes pasos en la comprensión de estos sistemas. A día de hoy, el desarrollo de modernas técnicas como la aquí llevada a cabo, RNA-Seq, facilitan en gran medida recopilar grandes cantidades de información acerca de los cambios que sufre la célula cuando uno de estos elementos se elimina, aportando datos muy relevantes sobre su función en condiciones normales.

En el caso que aquí nos ocupa, el sistema AbrA, aunque se había determinado su implicación en producción de antibióticos y esporulación, y se mostró la utilidad de su eliminación de cara a la producción heteróloga de compuestos, hasta la fecha poco se

DISCUSIÓN

sabía acerca de su función. Algunos estudios previos realizados acerca del papel del TCS AbrA apuntaban a que este sistema podía estar respondiendo a los niveles de hierro del medio, si bien de una forma indirecta (Rico et al., 2014b). Determinar con total precisión la señal sería una tarea compleja pero plausible actualmente, gracias a técnicas tales como la interferometría de biocapa (*biolayer interferometry*) (Concepcion et al., 2009). Si bien el experimento de RNA-Seq realizado no sirve para demostrar claramente que el hierro actúa como activador del sistema, sí vuelve a apuntar con fuerza en la misma dirección. La cascada regulatoria que parece vislumbrarse entre la multitud de datos obtenidos muestra claros cambios de expresión en los genes responsables de múltiples mecanismos relacionados con la toma y aprovechamiento de hierro, los cuales son realmente consistentes con la relación del sistema con este elemento; en el mutante de delección del sistema todos estos genes se sobreexpresan, indicando que en esta cepa se están interpretando señales de carencia de hierro, probablemente porque no posee el sistema que detecta su presencia en el medio.

Aunque en los dos tiempos elegidos para llevar a cabo este experimento, 24 y 36 horas, se han podido observar cambios de expresión, queda claro que es en el último de ellos, coincidente con el cambio de fase de crecimiento exponencial a estacionaria, cuando se aprecian las mayores diferencias. No es de extrañar que ocurra de esta manera, ya que ese punto resulta clave tanto para la producción de metabolitos secundarios como para el desarrollo, lo cual requiere la integración de multitud de señales e interacción entre procesos muy diversos que pueden llegar a verse afectados incluso por ligeros cambios.

Como se ha podido ver, entre los genes diferencialmente expresados precisamente aquellos relacionados con metabolismo secundario constituyen uno de los grupos más numerosos. Además de ver sobreexpresados el clúster de la ACT, que resultaba esperable de acuerdo con los fenotipos observados, y buena parte de los del CDA y RED, se pueden encontrar otros datos importantes de metabolitos menos estudiados. Los casos de una desferrioxamina (*SCO2782-2785*) y la coelibactina (*SCO7681-7691*) son especialmente reveladores: primero, porque se trata de clústeres que están sobreexpresados en su conjunto (los 4 genes de la desferrioxamina y 9 de los 11 de la coelibactina); y segundo, porque su función enlaza con lo que ya se sabía del sistema AbrA.

La función de ambos parecería ser la de sideróforos, en el caso de la desferrioxamina, de hierro, y en el caso de la coelibactina, de zinc (Choi et al., 2017;

Kallifidas et al., 2010). Los sideróforos son moléculas que se secretan al medio, donde captan iones como el Fe^{3+} y lo solubilizan a Fe^{2+} para su aprovechamiento. El complejo hierro-siderofoforo resultante es entonces asimilado por la célula por medio de transportadores activos (Figura D.1). Existen diferencias notables entre ambos compuestos, no ya sólo en el ión con el que se los relaciona sino también en su estructura; mientras que la desferrioxamina es un sideróforo no peptídico (que de hecho en *S. coelicolor* consiste en una mezcla de desferrioxamina G1 y E), la coelibactina es un péptido no ribosomal.

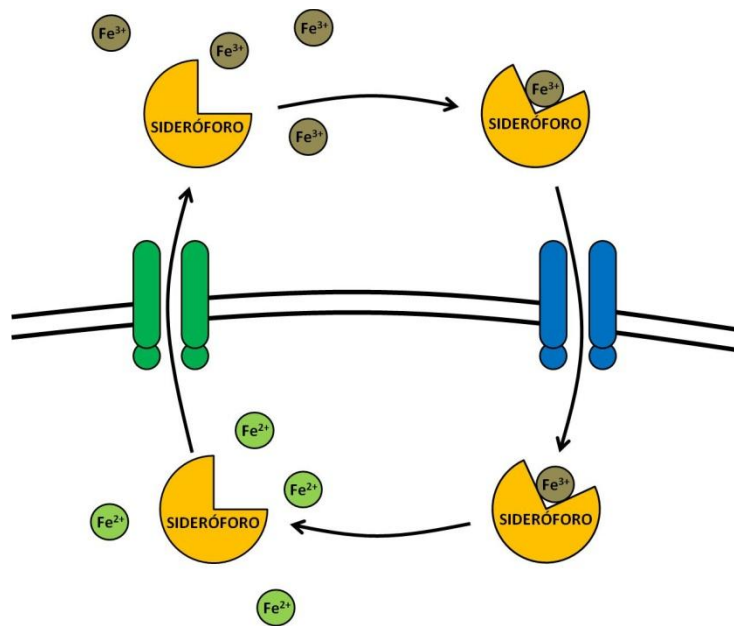


Figura D.1. Esquema del modo de acción de los sideróforos.

En el caso de la desferrioxamina, existen estudios que demuestran su activación en condiciones de ausencia de hierro (Tunca et al., 2007). El primer gen de este clúster se encuentra precedido por una región característica de repeticiones invertidas que determinan el sitio de unión de represores dependientes de Fe^{2+} (Barona-Gómez et al., 2006; Barona-Gómez et al., 2004). La unión del represor a estas *iron boxes* (que en *S. coelicolor* son TTAGGTTAGGCTCACCTAA) (Figura D.2) bloquea la unión de la RNA polimerasa, reprimiendo así la transcripción. Dentro de los 10 sitios del genoma descritos con esta secuencia (Flores and Martin, 2004), los dos que presentan una coincidencia total con la misma aparecen sobreexpresados en el mutante $\Delta abrA: desA$ (*SCO2782*, el primer gen del clúster de la desferrioxamina) y *SCO4049* (codificante para una proteína de unión a antibióticos). El resto de los casos, entre los que se

DISCUSIÓN

incluirían por ejemplo el clúster del sideróforo coelichelina, si bien aparecen también sobreexpresados, no lo están lo suficiente como para superar los umbrales que están establecidos.



Figura D.2. Secuencia consenso de las *iron boxes* descritas en *S. coelicolor* según Flores and Martin, 2004.

Existen dos proteínas represoras descritas que se unen a estas cajas: DmdR1 (de *divalent metal-dependent regulatory protein*, también conocida como DesR1, *SCO4394*) y DmdR2 (o DesR2, *SCO4017*) (Flores et al., 2005; Flores and Martin, 2004; Tunca et al., 2007). Ambas presentan un alto grado de similitud requiriendo la presencia de Fe^{2+} (o en todo caso otro ión bivalente como Mn^{2+}), si bien DmdR1 se encontraría formando dímeros y DmdR2 también puede formar tetrámeros. La búsqueda de los genes que codifican estas proteínas entre los datos obtenidos en el experimento, sin embargo, resultan contradictorios: el gen *dmdR1* se encuentra reprimido, pero no supera los filtros establecidos de FC, y el gen *dmdR2*, que sí lo hace, se encuentra sobreexpresado en lugar de reprimido, que sería lo esperable.

Si bien es cierto que, dada la gran complejidad de las redes regulatorias, este hecho contradictorio podría ser explicable por la influencia predominante de otros reguladores, conviene reseñar un dato adicional que podría tener un cierto peso aquí. Esta descrito que DmdR1 tiene un papel predominante en el metabolismo del hierro con respecto a DmdR2, regulando negativamente la expresión de este último (que no se expresa en condiciones normales), probablemente de forma indirecta (Flores et al., 2005; Flores and Martin, 2004). Esto genera que una disminución de DmdR1 cause un aumento de DmdR2, lo cual, teniendo en cuenta que la función de ambas proteínas parecería ser la misma, podría llevar a incoherencias como la aquí observada. Curiosamente, si se observan los valores de expresión de cada uno de estos dos genes (el número de lecturas obtenidas en cada uno de ellos) se aprecia que, aunque el aumento de expresión del gen *dmdR2* en la cepa mutante da un $\text{FC}=2,13$, su nivel de expresión es muy bajo. Sin embargo, el gen *dmdR1*, reprimido con un FC de tan solo

1,39 (aunque el FDR sí supera el umbral fijado, al estar en $1,17 \times 10^{-4}$) muestra unos niveles de expresión 50 veces superiores a los de *dmdR2*. Por tanto, no parece descabellado pensar que, en este caso de funciones duplicadas, una ligera disminución en un gen altamente expresado pudiera llegar a tener un mayor efecto que un aumento significativo en uno muy poco expresado.

Si bien esto no puede ser demostrado con los datos de que disponemos, quedando por lo tanto en una mera discusión teórica que ayudaría a encajar el resto de los datos, resulta sumamente interesante por evidenciar el principal problema que supone trabajar con la inmensa cantidad de datos generada en un experimento de estas características. El hecho de no poder asimilar al unísono todos los datos en conjunto implica tener que imponer unos filtros, en este caso $FC \geq 2$ y $FDR \leq 0,05$, que si bien pueden ser más o menos restrictivos, siempre resultan artificiales. Fijar estos umbrales, usados en la bibliografía de forma extendida cuando se trata de apreciar diferencias transcripcionales generales, podría implicar, hipotéticamente hablando, incluir genes con bajos niveles de transcripción y escasa relevancia pero con un $FC=2,00$, mientras que otros fuertemente expresados o más importantes quedarían fuera por tener un $FC=1,99$.

Resulta además interesante comprobar cómo otra serie de datos avalan el hecho de que se esté desencadenando una respuesta de captación de hierro (u otros iones divalentes). Un buen ejemplo son la gran cantidad de genes sobreexpresados que codifican para proteínas transportadoras que se encuentran entre los datos obtenidos, muchas de ellas directamente relacionadas con el hierro, como pueden ser *SCO1046* (ATPasa transportadora de metal) y *SCO7678* (proteína integral de membrana transportadora de metal) o el clúster *cdtABC* (*SCO7398-7400*). Este último no sólo está implicado en la captación de hierro, sino que también se lo relaciona con el transporte de antibióticos parecidos a los sideróforos, ya que la eliminación del sistema vuelve al mutante más resistente dado que de esta manera los antibióticos no entran en la célula (Bunet et al., 2006).

Esto abre también la puerta a considerar que otros de los reguladores sobreexpresados aparentemente no relacionados con la toma de hierro realmente sí lo estén. Está descrito que algunos antibióticos son activamente transportados por transportadores de sideróforos, tanto para liberar el sideróforo al medio como para recoger el complejo sideróforo-hierro (Braun, 1999). *cmlR1* (*SCO7526*) es una de las

DISCUSIÓN

más significativas, ya que está descrito que entre los posibles sustratos de los transportadores de su clase se encuentran tanto sideróforos como cloranfenicol o tetraciclinas (Miethke and Marahiel, 2007).

Por tanto, este experimento de RNA-Seq parece dejar claro que el mutante *ΔabrA* muestra cambios significativos en genes relacionados con una serie de mecanismos dedicados a captar, transportar y aprovechar hierro. Sideróforos como la desferrioxamina o la coelibactina y transportadores para secretarlos e introducirlos en la célula se encuentran sobreexpresados, al igual que moléculas que permiten el aprovechamiento del hierro como las flavohemoproteínas SCO7094 y SCO7428, las cuales se encargarían de reducir el Fe^{3+} del complejo hierro-sideróforo a Fe^{2+} ; mientras que por otra parte algunas moléculas con actividad quelante (como puede ser el caso de *dpsA* o la bacterioferritina *SCO2113*) se reprimen. Estas respuestas no carecen de sentido, ya que tal y como se ha descrito, el sistema parece estar relacionado con la detección de los niveles de hierro (Rico et al., 2014b), de tal manera que eliminar este sistema podría ser interpretado a nivel celular como una situación de estrés por falta de hierro (o, tal vez, otros iones como Mn^{2+} o Zn^{2+}) y eso desencadenaría esta reacción.

En cuanto a los fenotipos más evidentes, aquellos relacionados con producción de antibióticos y diferenciación, su explicación podría residir en estos mecanismos o en otros diferentes. Se ha descrito que las desferrioxaminas añadidas al medio de cultivo pueden causar la estimulación del crecimiento, el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios no ya sólo en la propia especie, sino entre distintas especies de *Streptomyces* (Yamanaka et al., 2005). Así, dado que el clúster de la desferrioxamina se encuentra sobreexpresado en el mutante *ΔabrA*, la mayor producción de ACT y RED y la diferenciación morfológica acelerada podrían ser debidas al impulso en estos procesos que genera la desferrioxamina.

Efectivamente, existen una serie de reguladores capaces de explicar el fenotipo de sobreproducción de antibióticos y diferenciación, aunque no se puede determinar si de forma directa debido a la influencia del sistema AbrA o indirecta a causa del efecto de los sideróforos. Uno de los más significativos es el gen *sigK* (*SCO6520*), codificante para un factor sigma, cuya delección resulta en una aceleración y aumento de la producción de antibióticos ACT y RED y un adelanto en la diferenciación morfológica

(Mao et al., 2009). Este regulador negativo se encuentra fuertemente reprimido en el mutante, lo que enlaza los fenotipos observados con los datos transcripcionales.

De igual forma, otros genes reguladores reprimidos también resultan sumamente interesantes, como pueden ser *sigM* (*SCO7314*), *sigJ* (*SCO1276*) o *dpsA* (*SCO0596*), todos ellos relacionados con respuestas frente a estrés osmótico (Facey et al., 2009; Facey et al., 2011; Viollier et al., 2003). El caso de DpsA es especialmente llamativo, ya que esta ferritina contribuye a la protección del DNA frente a estrés oxidativo no sólo actuando como quelante (y previniendo por tanto la formación de radicales libres), sino también interviniendo en la condensación del nucleoide.

Ciertamente, existen otros muchos genes relacionados con la regulación de la producción de antibióticos y diferenciación en *Streptomyces* que aparecen en los resultados procesados, como son los casos del activador del metabolismo secundario *absR1* (*SCO6992*) sobreexpresado, y de los reprimidos *wblA* (*SCO3579*) (Kim et al., 2012), *ssgA* (*SCO3926*), *ssgC* (*SCO7289*) (Noens et al., 2005), o *SCO1839* (Bradshaw et al., 2013), pero encuadrarlos en el esquema regulatorio de una forma coherente en cascadas ya descritas resulta realmente complicado.

Elucidar la cascada exacta generada por el sistema AbrA requiere determinar con precisión cuáles son los genes directamente regulados por el RR AbrA2. Durante el desarrollo de esta tesis se planteó la realización de un experimento de ChIP-Seq, si bien debido a sucesivos problemas en las etapas iniciales se abandonó para poder centrarnos en el resto de los apartados que componen este trabajo. Al carecer de anticuerpos adecuados para realizar este tipo de experimentos, pese a que se habían tratado de obtener y caracterizar en diferentes ocasiones (Franco-Echevarría, 2013), se trató de aprovechar la tecnología CRISPR-Cas9 para generar una cepa idéntica a la silvestre con la única excepción de una triple etiqueta FLAG en el RR AbrA2. Dicha aproximación falló sucesivas veces, tanto por dificultades encontradas en el diseño y construcción de los plásmidos necesarios como a la hora de obtener esta cepa en *S. coelicolor*, ya que la guía empleada finalmente no llegó a mostrar la especificidad y efectividad necesaria para completar exitosamente ese paso. No obstante, esta aproximación no se ha abandonado, y se están diseñando y valorando otras opciones para poder llevarla a cabo.

Es de esperar que los resultados que se obtendrían de este experimento contribuyeran a fijar el papel del sistema AbrA en la célula, aclarando si el fenotipo observado en el mutante es efecto directo del sistema o más bien se trata de una

consecuencia colateral derivada de las respuestas de captación de hierro como la producción de sideróforos (Figura D.3). Sin embargo, sí se puede concluir que este experimento de RNA-Seq ha contribuido notablemente a esclarecer la contribución del TCS AbrA en la regulación génica en *S. coelicolor*, reforzando la hipótesis de que es capaz de responder a la concentración de hierro (Rico et al., 2014b; Yepes, 2010) y enfocando futuros trabajos en la dirección de aquellas respuestas que aquí se han observado a nivel transcripcional.

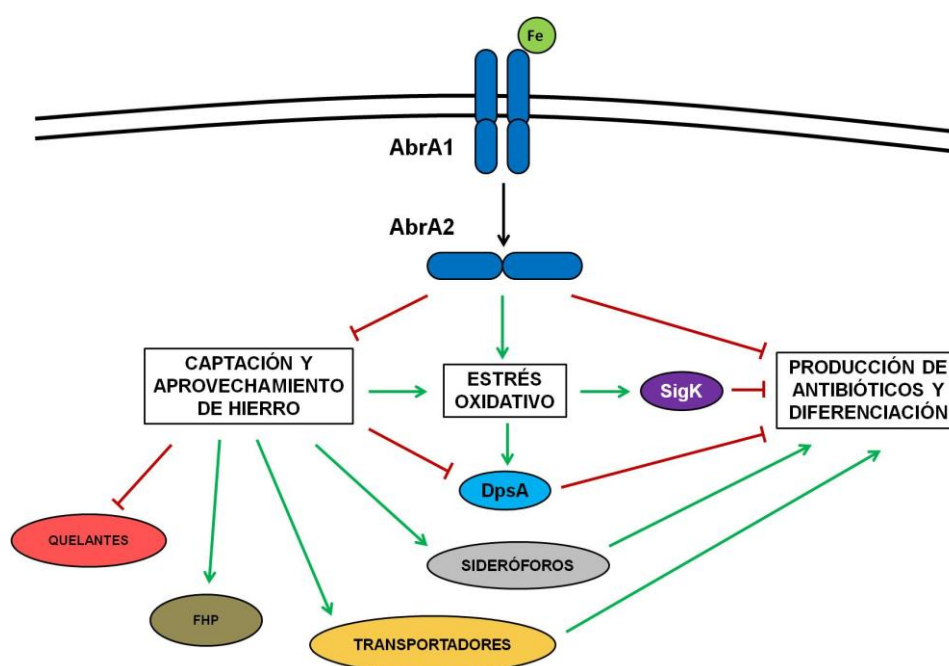


Figura D.3. Esquema de la posible red regulatoria del sistema AbrA de *S. coelicolor*. Flechas: regulación positiva. Líneas romas: regulación negativa. FHP: Flavohemoproteínas

4. Aor1, UN REGULADOR HUÉRFANO CLAVE PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Cómo se ha podido observar en el apartado anterior, la utilización de la técnica de RNA-Seq puede resultar de gran ayuda a la hora de orientar las posibles causas y efectos de la activación de la activación de un determinado TCS. Si bien en el caso

anteriormente detallado, el del sistema AbrA, ya existían indicios que nos permitieron orientar la búsqueda de forma más precisa, en el caso del RR Aor1 la información disponible era mucho más reducida. Hay que tener en cuenta que este RR es huérfano, es decir, carece de una HK contigua en el genoma, por lo que la ya de por sí complicada tarea de determinar la señal encargada de activar un sistema se topa con el hecho de no saber tan siquiera qué quinasa está captándola y activando a Aor1.

En este caso, la reproducibilidad del experimento fue un aspecto crucial. Aún con el fenotipo drástico que mostraba el mutante *Δaor1* con respecto a la cepa silvestre en todos los medios, la elección del medio LB, que no es un medio habitual de *Streptomyces*, resultó ser totalmente acertada. El hecho de lograr que las distintas réplicas fueran especialmente repetitivas, sin prescindir por ello de las enormes diferencias fenotípicas existentes entre mutante y silvestre, ha demostrado ser de vital importancia, permitiendo obtener ingentes cantidades de datos acerca de qué está ocurriendo en dicho mutante a nivel transcripcional. Así, se optó por fijar unos umbrales de FC y FDR muy restrictivos para poder focalizar mejor los datos más importantes, lo cual no es obstáculo sin embargo para que, en aquellos casos en que se quiera buscar información sobre un gen concreto, se puedan tener en consideración datos que hayan quedado por debajo (pero que sigan siendo suficientemente significativos).

De acuerdo con dichos datos, el RR Aor1 parecería estar implicado en procesos de respuesta a estrés osmótico. Esta relación se puede apreciar en la sobreexpresión tanto de *sigB* como de gran parte de sus dianas y otros genes que se encuentran en niveles inferiores de su cascada regulatoria, como los ya mencionados *sigH*, *sigK*, *sigL*, *sigM*, *dpsA*, *catB*, *ssgC* y *ssgG*, entre otros. Es especialmente remarcable además que los productos de muchos de estos genes pueden tener además importantes implicaciones en *S. coelicolor*, ya que la mayoría tienen función reguladora y, como es el caso de DpsA, su función en la condensación del nucleosoma, ya mencionada en el anterior apartado, podría afectar a la transcripción de muchos genes.

La asociación con el estrés osmótico también se aprecia en la sobreexpresión de genes tales como los del clúster de vesículas de gas situado entre los *SCO*s6496-6508 o el de la 5-hidroxiectoína (*SCO*1864-1867). La función de las vesículas de gas, formadas por proteínas anfipáticas, generalmente suele relacionarse con flotación en ambientes acuáticos, pero dado que también se han encontrado en actinomicetos asociados únicamente a suelos y sedimentos también se las asocia a regulación de la homeostasis y respuesta a estrés osmótico (van Keulen et al., 2005). Por su parte, la 5-hidroxiectoína

DISCUSIÓN

juega un papel importante en el balance osmótico de la célula, con un efecto protector sobre enzimas lábiles, ácidos nucleicos y membranas (Eilert et al., 2013). Este compuesto se reseña aquí, y no en la sección de resultados, por un hecho peculiar: si bien no supera el umbral de FC establecido ($FC=1,7$, aproximadamente) sí parece reseñable por el hecho de ser el único clúster de metabolitos secundarios en este experimento que, como conjunto, muestra una tendencia a la sobreexpresión (el resto de ellos, incluso los que no se han tenido en cuenta por no llegar a los umbrales marcados, se muestran mayormente reprimidos en el mutante *Aaor1*).

Si se tiene en cuenta que todos estos genes mencionados se encuentran sobreexpresados en la cepa carente del gen *aor1*, se puede llegar a apuntar a que la función regulatoria ejercida por Aor1 tal vez actúe como un regulador negativo en los niveles más altos de esta cascada, incluso por encima de SigB. Su eliminación por tanto causa la desrepresión de estos reguladores, que a su vez son capaces de activar a otros genes, generando así los profundos cambios detectados. La represión de los distintos clústeres de metabolitos secundarios, por su parte, podría ser debida a la activación de estas respuestas a estrés, ya que está demostrado que la inducción de estrés osmótico tiene un efecto negativo sobre la producción de antibióticos. Sin embargo, tampoco puede descartarse una implicación directa de Aor1 en este aspecto: el hecho de ver sobreexpresado (aunque por debajo de los filtros) el gen del regulador negativo global AbsA2 mientras todo su clúster y otros que se pueden ver regulados por él están subexpresados, tal vez señale una regulación negativa sobre negativa. De esta forma, al faltar un primer regulador negativo en un nivel superior (que sería Aor1), los segundos quedarían libres de la represión a la que estaban sometidos y producirían su efecto negativo sobre la producción de antibióticos (Figura D.4).

El posible papel de Aor1 como regulador negativo, aunque pueda resultar rebuscado al menos en cuanto a producción de antibióticos se refiere (por recaer esta explicación en su totalidad en un regulador que no supera nuestros propios filtros o, en todo caso, en otros de los muchos reguladores diferencialmente expresados, pero con funciones desconocidas hasta la fecha) puede aportar también una explicación coherente a los resultados del experimento de sobreexpresión. Si se asumiera que Aor1 es un regulador negativo de tanta importancia como se intuye por el fenotipo de su mutante y los datos del experimento de RNA-Seq, sobreexpresar el mismo puede no tener efectos significativos ya que, si en condiciones normales ya consigue bloquear la expresión de otros reguladores negativos, una dosis mayor no tendría ningún efecto. Los

experimentos de sobreexpresión realizados no muestran efectos fenotípicos apreciables, hecho que corrobora la hipótesis propuesta.

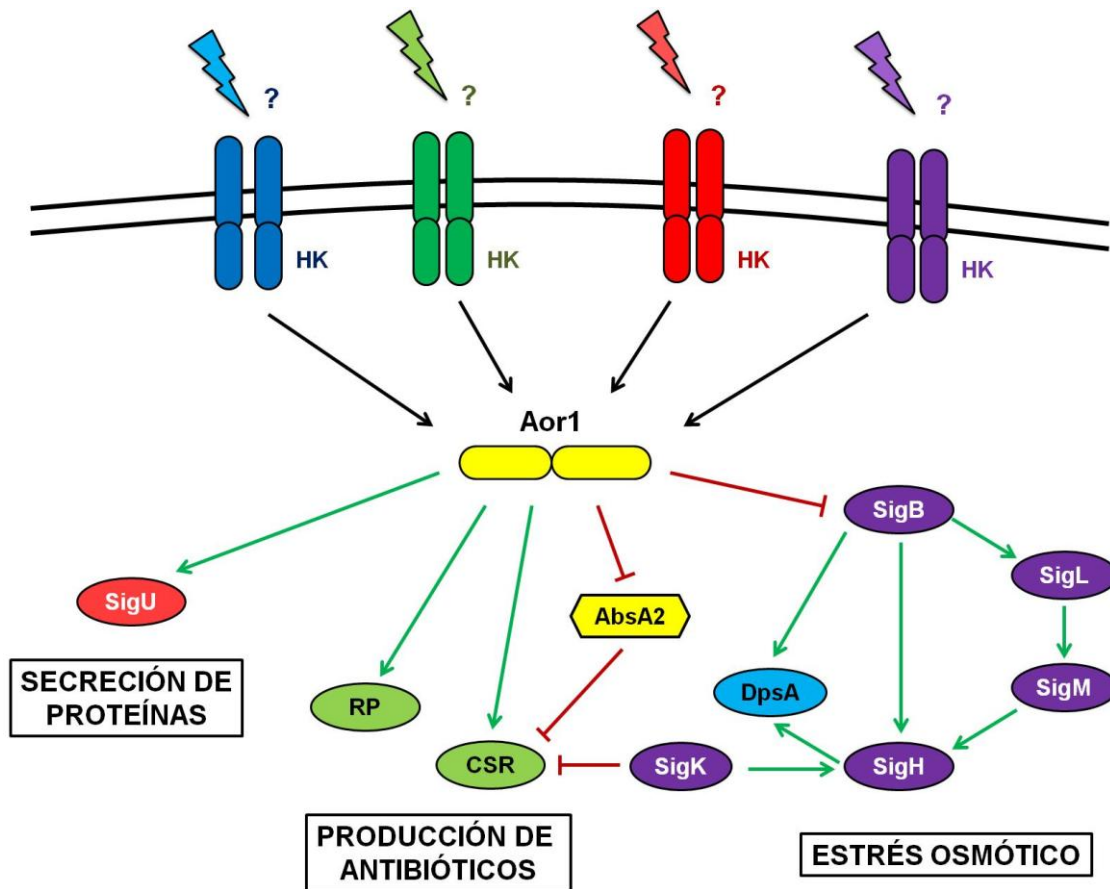


Figura D.4. Esquema de la posible red regulatoria de Aor1 en *S. coelicolor*. Se desconoce la HK que fosforilan este regulador. Flechas: regulación positiva. Líneas rojas: regulación negativa. CSR: *Cluster situated regulators*. RP: *Regulatory proteins*.

Además, tampoco puede descartarse que el regulador Aor1, que es considerado huérfano por no tener un gen que codifique para una HK contiguo en el genoma, pueda encontrarse integrando las señales de distintas HK (Figura D.4), y que por lo tanto las respuestas que se observan en el mutante sean especialmente drásticas debido a que se estén interpretando múltiples condiciones captadas por varios sistemas.

5. *Streptomyces coelicolor*, UN MICROORGANISMO CON UNA GRAN COMPLEJIDAD REGULATORIA

Aunque a lo largo de este trabajo se han realizado diferentes experimentos de cara a cumplir con los objetivos planteados, en todos ellos se han encontrado en mayor o menor medida dificultades tanto técnicas como a la hora de analizar los resultados. Afrontar las primeras, pese a no ser una labor especialmente fácil, es relativamente factible, habida cuenta de que los avances científico-técnicos permiten allanar el camino de forma lenta pero constante. Así, aquí se ha podido ver cómo la irrupción del sistema CRISPR-Cas9 supone un avance de gran calado a la hora de manipular genéticamente a estos organismos, labor esencial para comprender su funcionamiento molecular. También hemos podido comprobar cómo los experimentos de RNA-Seq aportan una visión global de lo que pueda estar ocurriendo a nivel transcripcional dentro de la célula con gran precisión. Así mismo, otras técnicas planteadas para futuros trabajos, como la utilización de HK híbridas (Lehning et al., 2017) o la ya mencionada interferometría de biocapa (Concepcion et al., 2009) para conocer las señales activadoras, el empleo de ChIP-SICAP-Seq (Rafiee et al., 2016) para descubrir tanto los sitios de unión de los reguladores como las proteínas con las que interacciona, y el uso de criomicroscopía electrónica para determinar la estructura de las moléculas de interés a nivel atómico, abrirán el camino a nuevos descubrimientos de una forma difícilmente imaginable hasta la fecha.

Sin embargo, estas técnicas topan también con la segunda de las dificultades mencionadas: la de analizar los resultados. Esta complicación tiene varias vertientes. Por una parte, se debe tener en cuenta que la enorme complejidad de las rutas regulatorias en *Streptomyces* (o en cualquier organismo) dificultan considerablemente el llegar a conclusiones totalmente fiables. Por ejemplo, eliminar los TCS AbrA, AbrB y la HK AbrC1 produce unos fenotipos claros, pero apenas aporta información de su papel y funcionamiento en *S. coelicolor*. El fallo como estrategia de mutar sucesivamente estos sistemas para producir mayores cantidades de antibióticos deriva necesariamente de no haber tenido en cuenta que los fenotipos observados vienen dados por una conjunción de multitud de reguladores actuando coordinadamente. En los experimentos de RNA-Seq también resulta evidente que una gran parte de los genes diferencialmente expresados tienen que haberse vistos afectados de forma más o menos

indirecta. Por lo tanto, no se puede perder de vista que los fenotipos de producción de antibióticos y diferenciación en los que generalmente nos fijamos, y que parecen verse afectados por una proporción importante de los genes de *Streptomyces*, pueden en muchos casos ser efectos colaterales de alteraciones en otras funciones y no el objeto directo de una determinada cascada regulatoria.

Por otro lado, las aproximaciones que tratan de dar una perspectiva más global de distintos procesos biológicos, las técnicas -ómicas, si bien han conseguido un nivel de exactitud bastante elevado (aunque todavía mejorable), presentan serias complicaciones a la hora de asimilar la inmensa cantidad de datos que generan. Un buen ejemplo de ello puede observarse si se piensa en experimentos como los de RNA-Seq realizados en este trabajo. Aunque los archivos con las lecturas en crudo contienen toda la información del experimento, en los sucesivos pasos se hace necesario filtrarlos para tener datos más manejables que los aproximadamente 50 millones de lecturas de 100 bases en cada uno de los cuadruplicados de las 2 cepas empleadas a 2 tiempos diferentes. Todos los filtros empleados, desde marcar unos cortes de FC y FDR a extraer conclusiones a partir de las posibles funciones biológicas de dichos genes y de la bibliografía disponible sobre los mismos, conllevan una pérdida de información considerable. Un pequeño atisbo se ha podido apreciar en la discusión sobre el papel de DmdR2 en el mutante $\Delta abrA$ (Discusión, página 120): al manejar tal cantidad de datos, podríamos estar teniendo en cuenta genes poco importantes o con bajos niveles de transcripción pero con unos valores de FC y FDR, mientras que otros tal vez más interesantes pueden quedar fuera de nuestro análisis incluso aunque estuvieran altamente expresados y tuvieran un FC de 1,99 en lugar del 2 marcado como umbral.

Es evidente que la reducción de conjuntos de datos complejos a propiedades estadísticas más fácilmente analizables puede conducir a importantes pérdidas de información (Matejka and Fitzmaurice, 2017). Sin embargo, tampoco parece posible llegar a alcanzar un nivel de comprensión adecuada de cantidades tan enormes de datos, de la misma manera que resulta tremendamente complicado asimilar todas las interacciones que pueden darse en las redes de regulación de *Streptomyces*. Una de las posibles soluciones a este respecto, y que podría llegar a suponer un paso de gigante no ya sólo en el campo de *Streptomyces* sino para la genómica y la biología molecular en conjunto, son las aproximaciones de *machine learning* o inteligencia artificial (IA).

Este campo se encuentra en un estado muy temprano aún, pero ya ha comenzado a emplearse en áreas de investigación como el diseño de biomoléculas activas (Merk et

DISCUSIÓN

al., 2018), la medicina (Gligorijevic et al., 2016) o la agricultura (Morota et al., 2018). Esta tecnología, que podría ser aplicable en cualquier caso en el que se requiera integrar Big Data, no sólo resulta sumamente compleja, sino que también necesita de equipos multidisciplinares, ya que requiere poner a punto los algoritmos, entrenarlos, y comprobar experimentalmente los resultados de las simulaciones. Sin embargo, ya existen investigaciones que empiezan a tratar de aplicar estos métodos (García-Quismondo et al., 2017; Lobo and Levin, 2015; Lobo et al., 2017), por lo que, aunque conseguir desarrollar un mapa regulatorio completo de *Streptomyces coelicolor* vaya a ser una tarea ardua y a largo plazo, comenzar a dar forma a algoritmos que permitan predecir pequeñas redes o integrar mejor los datos de técnicas -ómicas sería un enfoque muy a tener en cuenta.

Conclusiones

1. Las cepas de *S. coelicolor* M1146 y M1154 son mejores hospedadoras de clústeres de metabolitos secundarios heterólogos que la cepa silvestre M145, al permitir la síntesis de una mayor variedad de compuestos. La cepa M1146 es la que mejor resultados da en la mayoría de los casos.
2. La mutación sucesiva de los sistemas de dos componentes AbrA y AbrB, así como de la histidina quinasa AbrC1, en la cepa silvestre M145, tiene por lo general un efecto positivo sobre la producción de los antibióticos propios actinorrodina y undecilprodigiosina, si bien dicho efecto es dependiente de medio.
3. La mutación sucesiva de los sistemas de dos componentes AbrA, AbrB y la histidina quinasa AbrC1 en las cepas M1146 y M1154 impide la introducción del clúster de la eloramicina y la rebecamicina, debido probablemente a problemas de toxicidad.
4. La introducción del clúster de la mitramicina en la batería de mutantes individuales, dobles y triples de los sistemas de dos componentes AbrA, AbrB y la histidina quinasa AbrC1, generada sobre las cepas M145, M1146 y M1154, permite la producción de dicho compuesto, aunque no se llega a apreciar una mayor producción derivada de las mutaciones generadas en este trabajo.
5. Las dos cepas silvestres empleadas durante este trabajo, M145-uSAL y M145-2011, muestran diferencias fenotípicas en producción de antibióticos propios y en esporulación. Dichas diferencias pueden ser debidas al gran número de SNP e *indels* que se han detectado en ambas cepas durante el análisis de su secuencia genética. Además, la comparación del genoma de estas cepas con el genoma de referencia de *S. coelicolor* revela la existencia de un importante número de diferencias comunes.
6. El estudio de las diferencias de expresión génica entre el mutante Δ *abrA* y la cepa silvestre M145-uSAL muestra un gran número de genes afectados, especialmente a 36 horas. Entre dichos genes se encuentran algunos relacionados con metabolismo secundario, pero también otros implicados en la captación y aprovechamiento del hierro o en respuesta a estrés oxidativo.
7. El estudio de las diferencias transcripcionales entre el mutante Δ *aor1* y la cepa silvestre M145-uSAL muestra importantes cambios en el metabolismo secundario, así como en cascadas regulatorias relacionadas con estrés osmótico y secreción de proteínas.

CONCLUSIONES

Materiales y métodos

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y GENERADOS

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

Tabla M.1. Microorganismos utilizados en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>S. coelicolor</i> M145-2011	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	(Gómez-Escribano and Bibb, 2011; Kieser et al., 2000)
<i>S. coelicolor</i> M1146	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda$	(Gómez-Escribano and Bibb, 2011)
<i>S. coelicolor</i> M1154	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda rpoB[C1298T] rpsL[A262G]$	(Gómez-Escribano and Bibb, 2011)
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrA$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO1744/1745$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrA \Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrA \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta abrA \Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145-2011. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrA$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO1744/1745$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrA \Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrA \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1146 $\Delta abrA \Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1146. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrA$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO1744/1745$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrA \Delta abrB$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrA \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M1154 $\Delta abrA \Delta abrB \Delta abrC1$	Derivada de <i>S.coelicolor</i> M1154. $\Delta SCO1744/1745 \Delta SCO2165/2166 \Delta SCO4598$	Este trabajo

<i>S. coelicolor</i> M145-uSAL	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	(Kieser et al., 2000; Yepes et al., 2011)
<i>S. coelicolor</i> Δ abrA	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145-uSAL. Δ SCO1744/1745	(Yepes et al., 2011). Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> Δ aor1	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145-uSAL. Δ SCO2281	(Antoraz et al., 2017)
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, ϕ 80dlacZ[M15, [(lacZYAargF)U169, recA1, endA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> ET12567	dam, dcm, hsdS, cat, tet	(MacNeil et al., 1992)
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 4522	Cepa silvestre	CECT

2. VECTORES UTILIZADOS

En este trabajo se han utilizado y generado los vectores señalados en la Tabla M.2.

Tabla M.2. Vectores utilizados y generados durante este trabajo.

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pWHM3	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , alto número de copias, AmpR en <i>E. coli</i> , TioR en <i>Streptomyces</i>	(Vara et al., 1989)
pWHM1026	Derivado del pWHM3 con la ruta de biosíntesis de la tetracenomicina C	(Decker and Hutchinson, 1993)
pKC505	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , bajo número de copias, ApraR	(Richardson et al., 1987)
cosAB4	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta de biosíntesis de la ovidomicina	(Lombó et al., 2004)
cos16F4	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta de biosíntesis de la eloramycinina	(Decker et al., 1995)
cos14E8	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta de biosíntesis de la rebecamicina	(Sánchez et al., 2002)
cos32D1	Cósmido derivado del pKC505, contiene la ruta de biosíntesis de la estaurosporina	(Salas et al., 2005)
pCLY10	Vector trifuncional <i>Saccharomyces cerevisiae-E. coli-Streptomyces</i> , sitio de integración del fago VWB. ApraR.	(Bilyk et al., 2016)
pMTMF	Derivado del pCLY10, contiene la ruta de biosíntesis de la mitramycinina	(Novakova et al., 2018)
pCRISPR-Cas9	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , ApraR, TioR. Termosensible. Contiene el gen <i>cas9</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> bajo el promotor <i>tipA</i> , y el cassette sgRNA bajo el promotor <i>ermE</i> .	(Tong et al., 2015)
pCRISPR-Cas9-sgAbrA	Derivado de pCRISPR-Cas9. Secuencia de sgRNA dirigida al sistema AbrA <i>SCO1744</i> .	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-AbrA	Derivado de pCRISPR-Cas9. Secuencia de sgRNA dirigida al sistema AbrA. Molde para recombinación homóloga adyacente a los genes del sistema AbrA.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-sgAbrB	Derivado de pCRISPR-Cas9. sgRNA dirigido al sistema AbrB.	Este trabajo

pCRISPR-Cas9-AbrB	Derivado de pCRISPR-Cas9. Secuencia de sgRNA dirigida al sistema AbrB. Molde para recombinación homóloga adyacente a los genes del sistema AbrB.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-sgAbrC1	Derivado de pCRISPR-Cas9. sgRNA dirigido al gen <i>SCO4598</i> .	Este trabajo
pCRISPR AbrC1	Derivado de pCRISPR-Cas9. Secuencia de sgRNA dirigida al gen <i>SCO4598</i> . Molde para recombinación homóloga adyacente al gen <i>SCO4598</i> .	Este trabajo
pCRISPomyces 2	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , ApraR. Termosensible. Contiene el gen <i>cas9</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> y un cassette LacZ.	(Cobb et al., 2014)
pN702GEM3	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> , alto número de copias, NeoR	(Fernández-Abalos et al., 2003)
pNaor1	Derivado del pN702GEM3. Gen <i>aor1</i> bajo el control de su propio promotor.	(Antoraz et al., 2017; Tejada, 2015)
pUZ8002	Derivado de RK2. NeoR.	(Paget et al., 1999)

La construcción de los plásmidos pCRISPR AbrA, pCRISPR AbrB y pCRISPR AbrC1 así como de sus respectivos intermediarios se detalla en el punto 7 de esta sección.

3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1 Medios de cultivo

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

-LB (Green and Sambrook, 2012): bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5. Empleado líquido o sólido añadiendo agar 2 %. De uso general para el crecimiento de *E. coli* y también utilizado para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos.

-SOB (Green and Sambrook, 2012): bacto triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, pH 7,0. Antes de usar se añadió MgCl₂ 10 mM. Utilizado para obtener mayor masa celular.

-TSB (Hopwood et al., 1985): peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, NaCl 5 g/L, K₂HPO₄ 2,5 g/L, dextrosa 2,5 g/L, pH 7,3. Medio rico utilizado para crecer cultivos y aislar ADN.

-2XYT (Bentley et al., 2002; Green and Sambrook, 2012): bacto triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,0. Utilizado en conjugaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

-**YES** (Sevillano et al., 2017): extracto de levadura 10 g/L, sacarosa 10,3 %. Suplementado con glucosa 0,5 %, glicina 0,5 % y MgCl_2 5 mM. Medio utilizado para la obtención de protoplastos.

-**R2YE** (Bentley et al., 2002): sacarosa 103 g/L, K_2SO_4 0,25 g/L, $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, glucosa 10,12 g/L, casaminoácidos 0,1 g/L, elementos traza* 2 mL/L, extracto de levadura 5 g/L, TES 5,73 g/L, pH 7,2. Empleado líquido o sólido añadiendo agar 2 %. Antes de utilizarlo se añadió por cada 100 mL: KH_2PO_4 0,5 %, 1 mL, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 M, 0,4 mL, L-prolina 20 %, 1,5 mL. Medio sólido de uso general y para la regeneración de protoplastos.

*Elementos traza (en un litro de agua): ZnCl_2 40 mg, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg.

-**SFM** (MSA) (Bentley et al., 2002): manitol 20 g/L, harina de soja 20 g/L, agar 2 %. En la elaboración de este medio se usa agua de grifo. Medio de esporulación.

-**NMMP** modificación de (Hopwood et al., 1985): $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/L, casaminoácidos 5 g/L, elementos traza** 1 mL/L, pH 7,2. Después de autoclavar se añadió: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M pH 6,8 15 mL/L, glucosa 0,5 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %. Medio utilizado para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos.

**Elementos traza (en un litro de agua): $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 g, CaCl_2 1 g.

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

-**NA** (Hopwood et al., 1985): extracto de levadura 2 g/L, extracto de carne 1 g/L, peptona 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,4. Este medio se empleó tanto en forma líquida (**NB**) como sólida, añadiendo agar 2 %, para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos. También se utilizó en forma semisólida (**agar nutritivo blando**) añadiendo agar 0,5 % para inocular *B. subtilis* en el bioensayo de actividad del CDA.

-**R5A** (Fernández et al., 1998): sacarosa 103 g/L, K_2SO_4 0,25 g/L, $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10,12 g/L, glucosa 10g/L, casaminoácidos 0,1 g/L, extracto de levadura 5 g/L, MOPS 21 g/L, elementos traza 2mL/L (empleamos los del R2YE). Ajustar el pH antes de autoclavar hasta 6,85 con KOH . Empleado líquido o sólido añadiendo agar 2 %. Medio utilizado para visualizar y cuantificar la producción de antibióticos.

-**SM17**: glucosa 2 g/L, glicerol 40 g/L, almidón soluble 2 g/L, Alkasoy (harina de soja) 5 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5g/L, CaCO₃ 2 g/L. Medio utilizado para detectar la producción de mitramicina.

3.2 Aditivos para medios de cultivo.

Los antibióticos empleados a lo largo de este trabajo, así como sus concentraciones para seleccionar y mantener los plásmidos y cósmidos utilizados, se detallan en la Tabla M.3.

Tabla M.3. Antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>E. coli</i>	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>Streptomyces</i>
Apramicina	50	15
Ampicilina	100	-
Kanamicina	50	-
Neomicina	-	50
Cloranfenicol	25	-
Tioestreptona	-	10
Ácido nalidíxico	25	-

3.3 Condiciones de cultivo.

Los cultivos en medios sólidos de *Streptomyces* se incubaron en placas Petri a 30 °C. Para los ensayos fenotípicos en gota se sembraron 10⁵ esporas en gotas de 5 μL . En los experimentos de luz-oscuridad (Resultados, página X) se sembraron 10⁶ esporas por placa, las cuales se crecieron durante 2 días a 30 °C antes de exponerlas a condiciones de luz (manteniéndolas sobre la mesa) u oscuridad (cubiertas de papel de aluminio) durante 1 día.

Los cultivos de *Streptomyces* en medio líquido, por su parte, se realizaron en matraces de vidrio indentados con 1/5 de su capacidad a 28 °C (con excepción del paso de eliminación de los derivados del plásmido CRISPR Cas9, que requieren de una mayor temperatura, 37 °C) y 200 rpm en un incubador orbital. Los estudios fenotípicos de antibióticos ACT y RED se realizaron sembrando 10⁵ esporas/mL en matraces con 10 mL de medio. En el caso de los estudios de producción heteróloga, el inóculo

consistió en un taco obtenido con un sacabocados de 0,8 cm de diámetro sobre un parche en medio sólido, o bien de micelio conservado en glicerol (100 µL).

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C tanto en su versión sólida (placas Petri incubadas en estufa) como líquida (matraces en incubador orbital a 200 rpm).

4. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas de *Streptomyces* utilizadas se conservaron en forma de suspensiones de esporas o micelio en glicerol al 20 % y a -20 °C. Las esporas de las diferentes cepas se recogieron siguiendo el protocolo descrito por (Hopwood et al., 1985) y la población del stock fue cuantificada creciendo diluciones seriadas del stock y contando las colonias obtenidas.

Las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* se conservaron en glicerol al 20 % y congeladas a -80 °C.

5. OBTENCIÓN, MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE DNA

5.1 Extracción de DNA genómico de *Streptomyces*:

Las obtenciones de DNA genómico llevadas a cabo tanto para comprobar que los mutantes estaban contruidos correctamente como para realizar su secuenciación (Resultados, página 74), se realizaron siguiendo el método descrito por Kieser (Kieser et al., 2000). Partiendo de cultivos frescos en medio TSB líquido, se centrifugó 1 mL de cultivo para continuar con el micelio resultante, el cual se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis (lisozima 2 mg/mL, sacarosa 0,3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl 25 mM, RNasa 50 µg/mL pH 8,0). Tras incubar a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron 250 µL de SDS 2 %. Se agitó al vórtex y se añadieron 500 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) equilibrado. Se recuperó la fase acuosa tras la centrifugación. Este paso de fenolización se repitió en tubos *Phase Lock Gel* (5 Prime) hasta que la interfase quedó limpia. A continuación se añadió 0,1 volumen de AcNa 3M pH 4,8 y 0,8 vol. de isopropanol para precipitar. Este precipitado se lavó con etanol al 70 %, y tras secarse a temperatura ambiente se resuspendió en 100 µL de agua o TE.

5.2 Extracción de DNA plasmídico y cósmidos de *E. coli*.

La obtención de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó utilizando el kit comercial *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* (Macherey-Nagel). El aislamiento de cósmidos, por su parte, se llevó a cabo siguiendo el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979) en el cual se introdujo una etapa de fenolización previa a la precipitación del DNA.

5.3 Electroforesis en gel de agarosa.

La separación de los fragmentos de DNA en función de su tamaño se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio. La concentración de agarosa empleada fue del 0,8 %, aumentando la misma a 1,6 % o 2 % cuando era necesario. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 120 V en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM) (Green and Sambrook, 2012) y las bandas se observaron en el transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 2000 de Bio-Rad con el programa Quantity One. Los tamaños de los fragmentos se estimaron usando como referencia el marcador *O`GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific).

5.4 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa y reacciones de PCR se llevó a cabo usando el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5 Técnicas básicas de ingeniería genética

Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética, tales como digestiones con enzimas de restricción, desfosforilaciones de extremos y relleno de extremos 5' cohesivos, se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en el manual (Green and Sambrook, 2012) y siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales en cada caso (New England Biolabs, Promega, Fermentas o Roche).

5.6 PCR

Para la construcción de los cassettes de sgRNA y de los moldes de homología de los plásmidos pCRISPR Cas9, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). El diseño de oligonucleótidos se hizo utilizando el programa *Gene Construction Kit* y la página

http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy_scoeli/ en el caso de las guías del sistema CRISPR-Cas9, y la temperatura de hibridación en cada caso se determinó según la fórmula $T_m=4(GC)+2(AT)-10$.

Las condiciones empleadas fueron:

1. Desnaturalización: 98 °C 30 s
 2. Desnaturalización: 98 °C 10 s
 3. Hibridación: T_m , 30 s
 4. Extensión: 72 °C, t s
 5. Extensión final: 72 °C, 10 min
- } 30 ciclos

T_m : temperatura de hibridación de cada pareja de oligonucleótidos.

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

En aquellos casos en que no se requería de una alta fidelidad, como la comprobación de mutantes, se empleó la enzima *DNA Polymerase* (Biotools), con las condiciones:

1. Desnaturalización: 94 °C 1 min
 2. Desnaturalización: 94 °C 30 s
 3. Hibridación: T_m , 30 s
 4. Extensión: 72 °C, t s
 5. Extensión final: 72 °C, 10 min
- } 30 ciclos

T_m : temperatura de hibridación de cada pareja de oligonucleótidos.

t: tiempo de extensión, 1 min por cada kilobase a amplificar.

5.7 qRT-PCR

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes a analizar usando el servidor online Primer3 (Tabla M.4).

El RNA de las cepas M145 pN702GEM3 y M145 pNaor1 se obtuvo a partir de cultivos de 48 horas en matraces indentados de 50 mL con 10 mL de LB suplementado con Neo, los cuales habían sido inoculados con 200 μ L de glicerol en cada caso. Tras

comprobar que la cantidad y la calidad de los RNA era la óptima, se trataron 2 µg con DNasa libre de RNasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 µg del RNA resultante se utilizó como molde para la síntesis del cDNA en 20 µl de volumen final de *iScript Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad).

Para llevar a cabo las qRT-PCR se usaron 2 µl de cDNA diluido 1:1 en agua destilada junto a 10 pmoles de oligonucleótidos directo y reverso y 5 µl de SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Biorad) en un volumen final de 10 µl. Cada reacción de PCR se hizo por duplicado en el termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) y se incluyeron controles negativos (sin síntesis previa de cDNA) para verificar que no había contaminación por DNA en las muestras.

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

5.7 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla M.4.

Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO
SAM-018	TTTTTTTCTAGAAATCAACCGGGGACGGCTGGT	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología izquierdo del sistema AbrA para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio XbaI
SAM-019	GTGTGCGGGGGCTCAGTTCACGCCAGATCGCG CCG	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología izquierdo del sistema AbrA para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-020	CGATCTGGCGTGAAGTACGCCCCGCACACCGT GG	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología derecho del sistema AbrA para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-021	TTTTTTTCTAGACCCACGAGAGGGGCCCCCG	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología derecho del sistema AbrA para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio XbaI
SAM-022	CGGGTCCCGATCTCACCTCC	Secuenciación del molde de homología del sistema AbrA
SAM-051	ACGCCTACGTAAAAAAAGCACCGACTCGGTGC C	Oligonucleótido reverso para la construcción de los <i>cassettes</i> de sgRNA. Con sitio SnaBI
SAM-052	CATGCCATGGGTCACGGTGACGCTCCACTAGTT TTAGAGCTAGAAATAGC	Oligonucleótido directo para construcción del <i>cassette</i> sgRNA AbrA. Con sitio NcoI
SAM-053	GTCACGGTGACGCTCCACTA	Oligonucleótido directo para comprobación de plásmido pCRISPR-Cas9-sgA
SAM-056	TCCACACGTGGCACCGCGAT	Oligonucleótido para la secuenciación de los <i>cassettes</i> sgRNA.
SAM-057	AGAGCATACCGGCTGTAC	Secuenciación de moldes de homología insertados en XbaI
SAM-058	CTAACGTCTGAAAGACGACA	Secuenciación de moldes de homología insertados en XbaI

MATERIALES Y MÉTODOS

SAM-059	CATGCCATGGCCGCCGGGAAATTCGCCAACGTT TTAGAGCTAGAAATAGC	Oligonucleótido directo para construcción del <i>cassette</i> sgRNA <i>AbrC1</i> . Con sitio <i>NcoI</i>
SAM-060	CCGCCGGGAAATTCGCCAAC	Oligonucleótido directo para comprobación de plásmido pCRISPR-Cas9- <i>sgC1</i>
SAM-062	TTTTTTGCTAGCGAGGAAAGCGCCGCGTCCAG	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología izquierdo del gen <i>abrC1</i> para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio <i>XbaI</i>
SAM-063	GCACGGCACGCTGACGTGTGAAAACCCCACT CCGCAGA	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología izquierdo del gen <i>abrC1</i> para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-064	CTGCGGAGTGGGGTTTTCCACACGTCAGCGTGC CGTGCG	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología derecho del gen <i>abrC1</i> para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-065	TTTTTTGCTAGCGAACGTAGACGTCGACGGG	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología derecho del gen <i>abrC1</i> para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio <i>XbaI</i>
SAM-066	CCAGTCCTACTCGGTCGTCG	Secuenciación del molde de homología del gen <i>abrC1</i>
SAM-067	CATGCCATGGGCAGGACACGGATCGTCATAGT TTTAGAGCTAGAAATAGC	Oligonucleótido directo para construcción del <i>cassette</i> sgRNA <i>AbrB</i> . Con sitio <i>NcoI</i>
SAM-068	GCAGGACACGGATCGTCATA	Oligonucleótido directo para comprobación de plásmido pCRISPR-Cas9- <i>sgB</i>
SAM-069	TTTTTTTCTAGAGGAGCTTGTCTCGACGGCG	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología izquierdo del sistema <i>AbrB</i> para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio <i>XbaI</i>
SAM-070	CCGGCTACCGTAAAAGACCCCTCCGCCGCGTG TACTGC	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología izquierdo del sistema <i>AbrB</i> para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-071	CAGTACACGGGCGGAGGGGTCTTTTACGGT AGCCGGA	Oligonucleótido directo en la construcción del molde de homología derecho del sistema <i>AbrB</i> para el sistema pCRISPR-Cas9
SAM-072	TTTTTTTCTAGAGTCCGGCAAGCTGGAGGACC	Oligonucleótido reverso en la construcción del molde de homología derecho del sistema <i>AbrB</i> para el sistema pCRISPR-Cas9. Con sitio <i>XbaI</i>
SAM-095	ATGATCTCCGCGCGAAGGC	Oligonucleótido directo para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrB</i>
SAM-096	GGGTCAGGGTCTCTTTCTG	Oligonucleótido reverso para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrB</i>
SAM-097	GTGCGCCCCTCGTCCCTGT	Oligonucleótido directo para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrC1</i>
SAM-098	TCAGCCGGTGAGCGGCTCGT	Oligonucleótido reverso para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrC1</i>
SAM-117	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Oligonucleótido directo para qRT-PCR. Control 16S
SAM-118	ATTACCGCGCTGCTGG	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR. Control 16S
DS-001	TATATACATATGAGCACCTCGCGAGA	Oligonucleótido directo para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrB</i>
DS-002	TATATAAAGCTTATCTACTCCACCCTTGG	Oligonucleótido reverso para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrB</i>
SRG-043	TTTTTTCATATGACCGAACGCCTCTCGACATC	Oligonucleótido directo para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrC1</i>
SRG-044	TTTTTTTCTAGACTACCCCTGGGGCGCGAGC	Oligonucleótido reverso para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrC1</i>
AY-061	GGGCTCGCCGCGGCGCTCC	Oligonucleótido directo para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrA</i>
S-004	GCTCCAGCTTCCGGGCAACG	Oligonucleótido reverso para comprobación externa de mutantes <i>ΔabrA</i>
AY-040	CGTCGAGGAGGCACTGACCAAC	Oligonucleótido directo para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrA</i>
AY-070	GCACCCGGGGCGGGGAGTCG	Oligonucleótido reverso para comprobación interna de mutantes <i>ΔabrA</i>
2281-f-bis	GTCTGGGGTACCTGCTCAAG	Oligonucleótido directo para qRT-PCR del gen <i>aorI</i>
2281-r-bis	GAACAACCTGGGCGACGAC	Oligonucleótido reverso para qRT-PCR del gen <i>aorI</i>

6. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS

6.1 Transformación de *E. coli*

Las transformaciones con plásmidos se llevaron a cabo utilizando células competentes de *E. coli* DH5 α y ET12567 siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

6.2 Transformación de *Streptomyces*

El método utilizado para transformar *Streptomyces* fue el descrito por (Kieser et al., 2000). Se obtuvieron protoplastos que fueron transformados con los distintos vectores demetilados (obtenidos a partir de la cepa de *E. coli* ET12567) y se regeneraron en placas de R2YE. Tras 24 horas de crecimiento se añadió una cobertera del antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes.

Para obtener los protoplastos se cultivaron las distintas cepas inoculando $2,5 \times 10^5$ esporas en 25 mL de medio YEG durante 36 horas. Tras recoger las células por centrifugación, se trataron con solución P con lisozima (2 mg/mL) hasta que se obtuvieron los protoplastos (37 °C, 30 min).

Solución P: TES 5,73 g/L; Sacarosa 103 g/L; $\text{Cl}_2\text{Mg } 6\text{H}_2\text{O}$ 2,03 g/L; K_2SO_4 0,25 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,68 g/L; elementos traza (empleamos los del R2YE) 2 mL/L; pH 7,2. Tras autoclavar añadir 5 mL de KH_2PO_4 1 % por litro.

6.3 Conjugación interespecífica

El proceso de conjugación se llevó a cabo entre *E. coli* ET12567 pUZ8002 con el plásmido o cósmido de interés y las diferentes cepas de *Streptomyces* según el protocolo descrito en (Gust et al., 2003).

La selección de colonias de *Streptomyces* portadoras del vector de interés se realizó empleando el antibiótico correspondiente más ácido nalidíxico.

7. SISTEMA CRISPR-Cas9

El sistema de mutación CRISPR-Cas9 empleado durante este trabajo fue el desarrollado por Tong y colaboradores (Tong et al., 2015).

7.1 Elección y construcción de la secuencia guía

La elección de los 20 nucleótidos que sirven de guía para producir la rotura de la doble cadena de DNA se hizo mediante la página http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy_scoeli/. Dentro de todas las secuencias posibles dentro del gen o sistema a deleccionar, se seleccionó aquella sin más coincidencias exactas en el genoma y con el menor número de coincidencias parciales tanto en el conjunto de la guía como en los últimos 13 nucleótidos, teóricamente los más específicos. Las secuencias seleccionadas, eliminando el NGG final necesario para el corte que no se puede incluir en la guía, se detallan en la Tabla M.5.

Tabla M.5. Secuencias seleccionadas para el diseño de los sgrRNA.

GENES DELECCIONADOS	SECUENCIA DIANA
<i>abrA1/A2 (SCO1744/1745)</i>	GTCACGGTGACGCTCCACTA
<i>abrB1/B2 (SCO2165/2166)</i>	GCAGGACACGGATCGTCATA
<i>abrC1(SCO4598)</i>	CCGCCGGGAAATTCGCCAAC

A partir de dichas secuencias se diseñó un oligonucleótido *forward* específico para cada caso, con la siguiente secuencia. Las x representan las distintas secuencias diana.

CATGCCATGGxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

En cuanto al oligonucleótido *reverse*, su secuencia no varía en los distintos casos:

ACGCCTACGTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC

Como DNA molde se empleó el propio plásmido pCRISPR-Cas9, que porta la guía completa con excepción de los 20 nucleótidos que determinan el sitio de corte. Las condiciones de la PCR fueron:

1. Desnaturalización: 98 °C 30 s
 2. Desnaturalización: 98 °C 10 s
 3. Hibridación: 48 °C, 30 s
 4. Extensión: 72 °C, 15 s
 5. Desnaturalización: 98 °C 30 s
 6. Hibridación: 55 °C, 30 s
 7. Extensión: 72 °C, 15 s
 8. Extensión final: 72°, 10 min
- } 10 ciclos
- } 15 ciclos

La amplificación genera un fragmento de 123 pares de bases, el cual se purifica, se corta con las enzimas NcoI y SnaBI (cuyos sitios de corte están subrayados en las secuencias de los oligonucleótidos), y se liga en el vector pCRISPR (Tabla M.2) previamente digerido con estas mismas enzimas. La ligación resultante se transformó en *E. coli* DH5 α , y se seleccionaron las construcciones correctas mediante PCR y secuenciación.

De este modo se generaron los plásmidos intermediarios pCRISPR-Cas9-sgAbrA, pCRISPR-Cas9-sgAbrB y pCRISPR-Cas9-sgAbrC1 (ver tabla X).

7.2 Construcción de la secuencia molde

Una vez integrada la secuencia guía, se procedió a insertar el molde de DNA necesario para reparar la rotura de doble cadena. Este molde consiste en la unión de las dos secuencias de 1 kb que flanquean a los genes que se pretendían eliminar. Si bien en el artículo esto se lleva a cabo mediante Gibson Assembly en el sitio de corte de la enzima StuI, con el fin de aprovechar los moldes previamente diseñados para el sistema de Cobb (Cobb et al., 2014) que no dio resultados (ver “Discusión”), en este trabajo se realizó de una forma distinta.

Dicha forma consistió en la realización de una PCR para cada fragmento del molde, seguida de una PCR solapante para generar así el molde completo de 2 kb en cuyos extremos se generaron puntos de corte XbaI. Así, los oligos de las primeras PCR, además de la zona necesaria para hibridar con la secuencia molde (en los casos expuestos, el cósmido que porta la zona de interés), tienen una secuencia de otros 20 nucleótidos que permitirán que hibriden los dos trozos de la construcción, o un sitio de corte en el extremo por el que se vaya a insertar en el plásmido, según corresponda

(Figura M.1). Una vez insertados los distintos moldes en el vector correspondiente que portaba su sgRNA, se comprobaron mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación.

Los oligonucleótidos empleados para generar los moldes en los distintos casos fueron SAM-018/SAM-019 y SAM-020/SAM-021 para AbrA, SAM-069/SAM-070 y SAM-071/SAM-072 para AbrB y SAM-062/SAM-063 y SAM-064/SAM-065 para AbrC1 (Tabla M.4).

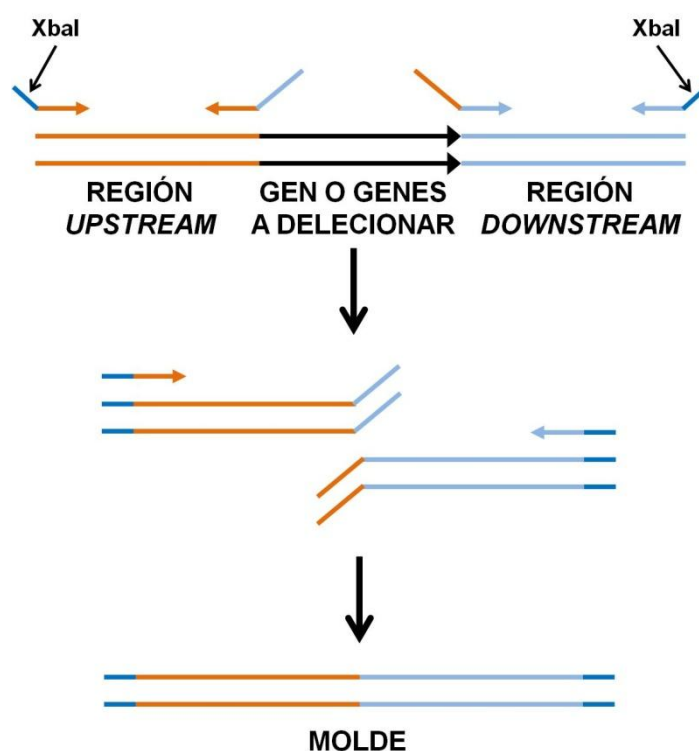


Figura M.1. Construcción del molde de homología para el sistema CRISPR-Cas9.

De este modo se generaron los plásmidos finales pCRISPR-AbrA, pCRISPR AbrB y pCRISPR AbrC1 (Tabla M.2).

7.3 Transferencia, eliminación del plásmido y comprobación de mutantes.

Tras construir y comprobar cada plásmido con guía y molde, este se transforma en la cepa demetilante *E. coli* ET12567 pUZ8002. El plásmido pUZ8002 es necesario para permitir la transferencia de otros plásmidos conjugativos mediante conjugación interespecífica a *S. coelicolor*. Se seleccionaron varias de las colonias resultantes, las cuales se inocularon en TSB líquido y se mantuvieron a 37 °C durante 2 días. Tras este

tiempo, se comprobó si las células habían perdido el plásmido pCRISPR-Cas9 correspondiente, dado que este plásmido es termosensible, sembrando 200 μ L del cultivo en placas de R2YE y R2YE + Apra y dándolo por perdido si crecía en el primero y no en el segundo.

La comprobación de que los mutantes obtenidos eran correctos se llevó a cabo obteniendo DNA genómico a partir de las colonias seleccionadas que hubieran perdido el plásmido y realizando PCR tanto con oligonucleótidos que hibridaran dentro del gen (y que solo producirán un fragmento en el control positivo o cepas que no sean mutantes) como con oligonucleótidos externos que permitan ver una diferencia de tamaño en el fragmento generado en función de si la cepa es mutante o no. En caso de resultar correctas las mutaciones, se seleccionó una única cepa y se conservó en forma de esporas.

8. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

8.1 Ensayos en medio sólido

Para llevar a cabo los estudios de producción de antibióticos en medio sólido se partió de suspensiones de esporas de las diferentes cepas a partir de las cuales se sembraron en distintos medios gotas de 5 μ L que contuvieran 10^5 esporas. Dichas placas se incubaron a 30 °C y se siguió su progresión cada 24 horas.

8.2 Bioensayo para la valoración de CDA

El análisis de la producción de CDA a partir de los sobrenadantes obtenidos de las cepas M145 y $\Delta aor1$ se realizó sembrando en primer lugar placas de NA con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o sin él, en el caso del control, 200 μ L con un cultivo de *Bacillus subtilis* ($\text{DO}_{600} = 0,25$) como microorganismo sensible. Tras secarse, se empleó un sacabocados de 0,8 cm de diámetro para generar pocillos en los que se inocularon 200 μ L de sobrenadante. Dicho sobrenadante provenía de cultivos de 10 mL de LB líquido inoculados con 10^6 esporas/mL a 48 horas, tal y como se detalló en Resultados (página 102).

8.3 Cuantificación en medio líquido

La producción de ACT y RED en medio líquido se cuantificó a partir de cultivos por triplicado de cada cepa. Dichos cultivos se realizaron en matraces de 50 mL inoculados con 10 mL de medio con una concentración final de 10^6 esporas/mL. Se tomaron muestras de 700 μ L de cada matraz a los diferentes tiempos y se cuantificaron los antibióticos siguiendo un método colorimétrico modificado del descrito por Kieser (Kieser et al., 2000). Así, las muestras fueron tratadas con KOH 1M e incubadas toda la noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 640 nm, y se calculó la concentración de ACT aplicando la ley de Lambert-Beer (coeficiente de extinción molar de la ACT: $\epsilon_{640} = 25320$).

Por su parte, el precipitado se lavó el precipitado celular dos veces con HCl 0,5 M, y se resuspendió en HCl-metanol 0,5 M. Tras incubar 2 horas, se centrifugó y se midió la absorbancia a 530 nm para obtener los datos de concentración de RED ($\epsilon_{530} = 100500$).

9. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El análisis de la producción de los antibióticos sintetizados de forma heteróloga se hizo a partir de muestras de 1 mL de cultivo, las cuales se trataron con 700 μ L de acetato de etilo acidificado con 1 % de ácido fórmico. Tras centrifugar, se recogió la fase orgánica y se evaporó, resuspendiéndose el extracto resultante en DMSO metanol (1:1).

El análisis de producción de los compuestos producidos de forma heteróloga se realizó en un sistema analítico UPLC Acquity formado por los módulos Binary Solvent Delivery, Sample Manager y PDA Detector (Waters). La columna empleada fue una Acquity UPLC BHC C18, 1,7 μ M, 2,1x100 mm (Waters). Como solventes se emplearon acetonitrilo y 0,1 % TFA en agua, a 0,5 mL/min y 35 °C, comenzando con 10 % de acetonitrilo, que se mantiene durante 1 min, para a partir de ese punto iniciar un gradiente lineal durante 7 min, alcanzando el 100 % de acetonitrilo en el minuto 8. Dichos análisis fueron realizados por el Dr. Alfredo Braña de la Universidad de Oviedo y el Dr. César Raposo de la Universidad de Salamanca

10. SECUENCIACIÓN

La secuenciación del genoma de la cepa M145-uSAL fue realizado por la empresa Macrogen. El DNA empleado se obtuvo mediante el protocolo descrito en el apartado 5.1 de esta sección, obteniendo una concentración de 290 ng/ μ L con unos porcentajes de pureza de $260/280 = 1,88$ y $260/230 = 2,34$. A partir de este DNA se preparó una librería Nextera XT que fue secuenciada mediante una plataforma HiSeq 2500 de Illumina, la cual generó 15 millones de lecturas de 100 bases por cada uno de los dos extremos de cada fragmento (30 millones totales). Estas lecturas fueron procesadas por el doctor Juan Alzate, que alineó las lecturas con el programa BWA v0.7.13-r1126 y obtuvo las variantes mediante SAMtools v1.3 (htslib 1.3) y BCFtools v1.3 (htslib 1.3).

11. RNA-Seq

11.1 Aislamiento de RNA

Cada una de las muestras de RNA para los experimentos de RNA-Seq fue obtenida a partir de dos réplicas biológicas en el caso del estudio del regulador Aor1 y de tres en el caso del sistema AbrA. Para ello se recogieron cultivos líquidos de 10 mL de LB (en el caso de Aor1) o NMMP (en el de AbrA) crecidos en matraces de 50 mL e inoculados con 10^6 esporas/mL en cada uno de los tiempos empleados. El micelio se trató con 2 mL de PBS y 4 mL de RNA Protect (Qiagen) antes de ser congelado a -20 °C.

La rotura del micelio se hizo incubando las muestras en TE con lisozima (15 mg/mL) a temperatura ambiente durante 15 min, para posteriormente continuar la extracción de acuerdo con las especificaciones del kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). La elución final se hizo en 50 μ L de agua libre de RNAsas, y la cantidad y calidad del RNA se comprobó en gel de agarosa, Nanodrop ND-1000 y Bioanalyzer 2100 (Agilent), obteniéndose en todos los casos valores de RIN superiores a 9 y concentraciones mayores a 200 ng/ μ L. El envío a Macrogen (Korea) se hizo precipitando el RNA con 0,25 volúmenes de NaCl (0,8M) y 3 volúmenes de etanol, según las indicaciones de la empresa.

11.2 Librería, secuenciación y análisis

Las muestras fueron tratadas con *Ribo-Zero rRNA Remo Kit Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)* y *TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit* para eliminar el rRNA y elaborar la librería. La secuenciación en los dos experimentos realizados fue de tipo *paired-end*, leyéndose fragmentos de 100 bases en cada extremo del fragmento, aunque en el caso del RR Aor1 el aparato empleado fue un HiSeq 2500 mientras que en el del TCS AbrA fue un Novaseq 6000.

En todos los casos se obtuvieron más de 40 millones de lecturas totales, las cuales fueron filtradas según su Q35 por el doctor Juan Alzate, que también llevó a cabo el subsiguiente análisis. El mapeado se realizó usando Bowtiew2 con el genoma de referencia de *S. coelicolor A3(2)* (GenBank NC_003888). Los archivos SAM se convirtieron a BAM mediante samtools, y las lecturas correspondientes a rRNA (menos del 8 %) fueron eliminadas.

El análisis diferencial se hizo contando las lecturas específicas de cadena correspondientes a cada CDS anotado usando HTSEQ v0.6.1p1. El análisis comparativo se usó con el paquete EDGER v3 de BIOCONDUCTOR, siguiendo el protocolo descrito para experimentos de RNA-Seq revisado el 20 de abril de 2016.

12. BASES DE DATOS ONLINE

-NCBI - *National Centre of Biotechnology Information*. Empleada para búsquedas de referencias a través de PubMed y comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante BLAST.

-StrepDB - *The Streptomyces Annotation Server*. Usada para consultas del genoma de *S. coelicolor*.

-P2CS - *Prokaryotic 2-Component Systems*. Utilizada para búsquedas de información sobre TCS bacterianos.

-DAVID - *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*. Empleada para enriquecer los datos obtenidos de los experimentos de secuenciación y RNA-Seq.

Bibliografía

Abdel-Halim, M.E., Sakr, A.A., Ali, M.F., Ghaly, M.F., and Sohlenkamp, C. (2013). Characterization of *Streptomyces* isolates causing colour changes of mural paintings in ancient Egyptian tombs. *Microbiol Res* *168*, 428-437.

Adamidis, T., Riggle, P., and Champness, W. (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol* *172*, 2962-2969.

Agamennone, V., Roelofs, D., van Straalen, N.M., and Janssens, T.K.S. (2018). Antimicrobial activity in culturable gut microbial communities of springtails. *J Appl Microbiol*.

Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P., and Pernodet, J.L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* *41*, 251-263.

Al-Bassam, M.M., Bibb, M.J., Bush, M.J., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2014). Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development. *PLoS genetics* *10*, e1004554.

Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., and Buschiazzo, A. (2009). Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 16185-16190.

Alt, S., and Wilkinson, B. (2015). Biosynthesis of the Novel Macrolide Antibiotic Anthracimycin. *ACS Chem Biol* *10*, 2468-2479.

Álvarez, A.F., Barba-Ostria, C., Silva-Jiménez, H., and Georgellis, D. (2016). Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environ Microbiol* *18*, 3210-3226.

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

Antón, N., Mendes, M.V., Martín, J.F., and Aparicio, J.F. (2004). Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol* *186*, 2567-2575.

Antoraz, S. (2013). Importancia del sistema de dos componentes AbrA1/A2 de *Streptomyces coelicolor* en la producción de antibióticos y diferenciación mediante el estudio de los mutantes carentes de sus genes (Universidad de Salamanca).

Antoraz, S. (2014). Empleo de cepas de *Streptomyces coelicolor* mutadas en el sistema de dos componentes AbrA para la expresión heteróloga de rutas de antibióticos (Universidad de Salamanca).

Antoraz, S., Rico, S., Rodríguez, H., Sevillano, L., Alzate, J.F., Santamaría, R.I., and Díaz, M. (2017). The Orphan Response Regulator Aor1 Is a New Relevant Piece in the

BIBLIOGRAFÍA

Complex Puzzle of *Streptomyces coelicolor* Antibiotic Regulatory Network. *Front Microbiol* 8, 2444.

Antoraz, S., Santamaría, R.I., Díaz, M., Sanz, D., and Rodríguez, H. (2015). Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front Microbiol* 6, 461.

Arias, P., Fernández-Moreno, M.A., and Malpartida, F. (1999). Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol* 181, 6958-6968.

Attwood, P.V. (2013). Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society transactions* 41, 1023-1028.

Bailly, C., Qu, X., Graves, D.E., Prudhomme, M., and Chaires, J.B. (1999). Calories from carbohydrates: energetic contribution of the carbohydrate moiety of rebeccamycin to DNA binding and the effect of its orientation on topoisomerase I inhibition. *Chem Biol* 6, 277-286.

Baltz, R.H., McHenney, M.A., Cantwell, C.A., Queener, S.W., and Solenberg, P.J. (1997). Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 179-187.

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

Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F.X., Leblond, P., Pernodet, J.L., and Challis, G.L. (2006). Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* 152, 3355-3366.

Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A.E., Derrick, P.J., and Challis, G.L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc* 126, 16282-16283.

Becerril, A., Álvarez, S., Braña, A.F., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R.I., Salas, J.A., and Méndez, C. (2018). Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *PLoS One* 13, e0198145.

Behie, S.W., Bonet, B., Zacharia, V.M., McClung, D.J., and Traxler, M.F. (2016). Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ. *Front Microbiol* 7, 2149.

Bekiesch, P., Basitta, P., and Apel, A.K. (2016). Challenges in the Heterologous Production of Antibiotics in *Streptomyces*. *Archiv der Pharmazie* 349, 594-601.

Bentley, S.D., Brown, S., Murphy, L.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Parkhill, J., Barrell, B.G., McCormick, J.R., Santamaría, R.I., Losick, R., *et al.* (2004). SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 51, 1615-1628.

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., *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* *417*, 141-147.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* *58*, 1-26.

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

Bilyk, O., Sekurova, O.N., Zotchev, S.B., and Luzhetskyy, A. (2016). Cloning and Heterologous Expression of the Grecoacycline Biosynthetic Gene Cluster. *PLoS One* *11*, e0158682.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* *7*, 1513-1523.

Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., and Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res* *14*, 893-900.

Bloemberg, G.V., Keller, P.M., Stucki, D., Trauner, A., Borrell, S., Latshang, T., Coscolla, M., Rothe, T., Homke, R., Ritter, C., *et al.* (2015). Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *The New England journal of medicine* *373*, 1986-1988.

Bobek, J., Šmídová, K., and Čihák, M. (2017). A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol* *8*.

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

Botas Muñoz, A.M. (2013). Regulación del metabolismo en *Streptomyces*: Control por ArgR (Universidad de León).

Bradshaw, E., Saalbach, G., and McArthur, M. (2013). Proteomic survey of the *Streptomyces coelicolor* nucleoid. *Journal of proteomics* *83*, 37-46.

Braña, A.F., Rodríguez, M., Pahari, P., Rohr, J., García, L.A., and Blanco, G. (2014). Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Archives of Microbiology* *196*, 345-355.

Braun, V. (1999). Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* *2*, 363-369.

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

BIBLIOGRAFÍA

Bunet, R., Brock, A., Rexer, H.U., and Takano, E. (2006). Identification of genes involved in siderophore transport in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* 262, 57-64.

Bush, J.A., Long, B.H., Catino, J.J., Bradner, W.T., and Tomita, K. (1987). Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J Antibiot (Tokyo)* 40, 668-678.

Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A., and Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178, 2238-2244.

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

Casino, P., Fernández-Álvarez, A., Alfonso, C., Rivas, G., and Marina, A. (2007). Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1774, 603-609.

Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139, 325-336.

Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* 14, 313-319.

Cobb, R.E., Wang, Y., and Zhao, H. (2014). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synth Biol* 4, 723-728.

Compton, C.L., Fernandopulle, M.S., Nagari, R.T., and Sello, J.K. (2015). Genetic and Proteomic Analyses of Pupylation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 197, 2747-2753.

Concepcion, J., Witte, K., Wartchow, C., Choo, S., Yao, D., Persson, H., Wei, J., Li, P., Heidecker, B., Ma, W., *et al.* (2009). Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 12, 791-800.

Corre, C., Song, L., O'Rourke, S., Chater, K.F., and Challis, G.L. (2008). 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17510-17515.

Chakraborty, R., and Bibb, M. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* 179, 5854-5861.

Challis, G.L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* 154, 1555-1569.

Challis, G.L. (2014). Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 219-232.

Challis, G.L., and Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100 Suppl 2*, 14555-14561.

Chang, H.M., Chen, M.Y., Shieh, Y.T., Bibb, M.J., and 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.

Chang, P.C., and Cohen, S.N. (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear streptomyces plasmid. *Science* *265*, 952-954.

Chao, R., Liang, J., Tasan, I., Si, T., Ju, L., and Zhao, H. (2017). Fully Automated One-Step Synthesis of Single-Transcript TALEN Pairs Using a Biological Foundry. *ACS Synth Biol* *6*, 678-685.

Chater, K.F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research* *5*, 2795.

Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T., and Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* *34*, 171-198.

Chater, K.F., and Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* *30*, 651-672.

Chater, K.F., and Horinouchi, S. (2003). Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol* *48*, 9-15.

Chater, K.F., and Losick, R. (1997). Mycelial Life Style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and Its Relatives. In *Bacteria as Multicellular Organisms*, J.A.S.a.M. Dworkin, ed. (New York and Oxford. Oxford University Press).

Chaudhary, A.K., Dhakal, D., and Sohng, J.K. (2013). An insight into the "-omics" based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction. *Biomed Res Int* *2013*, 968518.

Chen, C.W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet* *12*, 192-196.

Chen, C.W., Huang, C.H., Lee, H.H., Tsai, H.H., and Kirby, R. (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet* *18*, 522-529.

Chen, S., Zheng, G., Zhu, H., He, H., Chen, L., Zhang, W., Jiang, W., and Lu, Y. (2016). Roles of two-component system AfsQ1/Q2 in regulating biosynthesis of the yellow-pigmented coelimycin P2 in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett* *363*.

Choi, S.H., Lee, K.L., Shin, J.H., Cho, Y.B., Cha, S.S., and Roe, J.H. (2017). Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur. *Nat Commun* *8*, 15812.

Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* *74*, 417-433.

BIBLIOGRAFÍA

Decker, H., and Hutchinson, C.R. (1993). Transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens* tetracenomycin C biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol* 175, 3887-3892.

Decker, H., Rohr, J., Motamedi, H., Zahner, H., and Hutchinson, C.R. (1995). Identification of *Streptomyces olivaceus* Tü2353 genes involved in the production of the polyketide elloramycin. *Gene* 166, 121-126.

Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 185-201.

den Hengst, C.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K., and 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.

Diminic, J., Starcevic, A., Lisfi, M., Baranasic, D., Gacesa, R., Hranueli, D., Long, P.F., Cullum, J., and Zucko, J. (2014). Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 211-217.

Drautz, H., Reuschenbach, P., Zahner, H., Rohr, J., and Zeeck, A. (1985). Metabolic products of microorganisms. 225. Elloramycin, a new anthracycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation, characterization, structure and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 38, 1291-1301.

Dyson, P. (2011). *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*, Horizon Scientific Press Norfolk edn.

Eilert, E., Kranz, A., Hollenberg, C.P., Piontek, M., and Suckow, M. (2013). Synthesis and release of the bacterial compatible solute 5-hydroxyectoine in *Hansenula polymorpha*. *J Biotechnol* 167, 85-93.

Elliot, M., Damji, F., Passantino, R., Chater, K., and Leskiw, B. (1998). The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J Bacteriol* 180, 1549-1555.

Facey, P.D., Hitchings, M.D., Saavedra-Garcia, P., Fernandez-Martinez, L., Dyson, P.J., and Del Sol, R. (2009). *Streptomyces coelicolor* Dps-like proteins: differential dual roles in response to stress during vegetative growth and in nucleoid condensation during reproductive cell division. *Mol Microbiol* 73, 1186-1202.

Facey, P.D., Sevcikova, B., Novakova, R., Hitchings, M.D., Crack, J.C., Kormanec, J., Dyson, P.J., and Del Sol, R. (2011). The *dpsA* gene of *Streptomyces coelicolor*: induction of expression from a single promoter in response to environmental stress or during development. *PLoS One* 6, e25593.

Fang, J., and Dorrestein, P.C. (2014). Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies. *Curr Opin Microbiol* 19, 120-129.

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

Fernández-Abalos, J.M., Reviejo, V., Díaz, M., Rodríguez, S., Leal, F., and Santamaría, R.I. (2003). Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology* 149, 1623-1632.

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

Fernández, E., Weissbach, U., Sanchez Reillo, C., Braña, A.F., Méndez, C., Rohr, J., and 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, 4929-4937.

Fernández Martínez, L., Bishop, A., Parkes, L., Del Sol, R., Salerno, P., Sevcikova, B., Mazurakova, V., Kormanec, J., and Dyson, P. (2009). Osmoregulation in *Streptomyces coelicolor*: modulation of SigB activity by OsaC. *Mol Microbiol* 71, 1250-1262.

Fischer, M., Schmidt, C., Falke, D., and Sawers, R.G. (2012). Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases. *Res Microbiol* 163, 340-348.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bulletin of the World Health Organization* 79, 780-790.

Flores, F.J., Barreiro, C., Coque, J.J., and Martin, J.F. (2005). Functional analysis of two divalent metal-dependent regulatory genes *dmdR1* and *dmdR2* in *Streptomyces coelicolor* and proteome changes in deletion mutants. *The FEBS journal* 272, 725-735.

Flores, F.J., and Martin, J.F. (2004). Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *The Biochemical Journal* 380, 497-503.

Francis, I.M., Jourdan, S., Fanara, S., Loria, R., and Rigali, S. (2015). The Cellobiose Sensor CebR Is the Gatekeeper of *Streptomyces scabies* Pathogenicity. *MBio* 6.

Franco-Echevarría, E. (2013). Detección inmunológica del regulador de respuesta AbrA2 de un sistema de dos componentes de *Streptomyces coelicolor* (Universidad de Salamanca).

Furstner, A. (2003). Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 3582-3603.

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

García-Quismondo, M., Levin, M., and Lobo, D. (2017). Modeling regenerative processes with membrane computing. *Information Sciences* 381, 229-249.

Gligorijevic, V., Malod-Dognin, N., and Przulj, N. (2016). Integrative methods for analyzing big data in precision medicine. *Proteomics* 16, 741-758.

Gómez-Escribano, J.P., and Bibb, M.J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* 4, 207-215.

Gómez-Escribano, J.P., and Bibb, M.J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 425-431.

Gómez-Escribano, J.P., Martín, J.F., Hesketh, A., Bibb, M.J., and Liras, P. (2008). *Streptomyces clavuligerus* *relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology* 154, 744-755.

Gómez-Escribano, J.P., Song, L., Fox, D., Yeo, V., Bibb, M., and Challis, G. (2012). Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the *cpk* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chemical Science* 3, 2716-2720.

Gopel, Y., and Gorke, B. (2012). Rewiring two-component signal transduction with small RNAs. *Current opinion in microbiology* 15, 132-139.

Gordon, N.D., Ottaviano, G.L., Connell, S.E., Tobkin, G.V., Son, C.H., Shterental, S., and Gehring, A.M. (2008). Secreted-protein response to sigmaU activity in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 190, 894-904.

Gottelt, M., Kol, S., Gómez-Escribano, J.P., Bibb, M., and Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 156, 2343-2353.

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

Groban, E.S., Clarke, E.J., Salis, H.M., Miller, S.M., and Voigt, C.A. (2009). Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol* 390, 380-393.

Grohar, P.J., Glod, J., Peer, C.J., Sissung, T.M., Arnaldez, F.I., Long, L., Figg, W.D., Whitcomb, P., Helman, L.J., and Widemann, B.C. (2017). A phase I/II trial and

pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS-FLI1 fusion transcript. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 80, 645-652.

Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., and Saiz-Jiménez, C. (1999). Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Methods* 36, 115-122.

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

Gullón, S., Vicente, R.L., and Mellado, R.P. (2012). A Novel Two-Component System Involved in Secretion Stress Response in *Streptomyces lividans*. *PLoS one* 7, e48987.

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

Gust B, K.T.a.C.K.F. (2002). REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*.

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

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

He, J.M., Zhu, H., Zheng, G.S., Liu, P.P., Wang, J., Zhao, G.P., Zhu, G.Q., Jiang, W.H., and Lu, Y.H. (2016). Direct Involvement of the Master Nitrogen Metabolism Regulator GlnR in Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *J Biol Chem* 291, 26443-26454.

Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2008). Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 154, 905-914.

Ho, T.F., Ma, C.J., Lu, C.H., Tsai, Y.T., Wei, Y.H., Chang, J.S., Lai, J.K., Cheuh, P.J., Yeh, C.T., Tang, P.C., *et al.* (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 225, 318-328.

Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* 42, 47-238.

Hoe, C.H., Raabe, C.A., Rozhdestvensky, T.S., and Tang, T.H. (2013). Bacterial sRNAs: regulation in stress. *Int J Med Microbiol* 303, 217-229.

Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P.J., Rudd, B.A., Hayes, M.A., *et al.* (2002). Structure, biosynthetic origin, and

BIBLIOGRAFÍA

engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chemistry & biology* 9, 1175-1187.

Homerova, D., Knirschova, R., and Kormanec, J. (2002). Response regulator ChiR regulates expression of chitinase gene, *chiC*, in *Streptomyces coelicolor*. *Folia Microbiol (Praha)* 47, 499-505.

Hong, H.J., Hutchings, M.I., Neu, J.M., Wright, G.D., Paget, M.S., and Buttner, M.J. (2004). Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. *Mol Microbiol* 52, 1107-1121.

Hopwood, D.A. (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 University Press Inc).

Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual (Norwich, UK: John Innes Foundation).

Hopwood, D.A., and Sherman, D.H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 24, 37-66.

Horinouchi, S. (2007). Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 283-299.

Horinouchi, S., Ohnishi, Y., and Kang, D.K. (2001). The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27, 177-182.

Hsu, C.C., and Dorrestein, P.C. (2015). Visualizing life with ambient mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 31, 24-34.

Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K. (2002). Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 184, 3984-3991.

Huang, H., Zheng, G., Jiang, W., Hu, H., and Lu, Y. (2015). One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 231-243.

Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M.J., Karoonuthaisiri, N., Lih, C.J., Kao, C.M., Buttner, M.J., *et al.* (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 58, 1276-1287.

Hur, Y.A., Choi, S.S., Sherman, D.H., and Kim, E.S. (2008). Identification of TmcN as a pathway-specific positive regulator of tautomycetin biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412. *Microbiology* 154, 2912-2919.

Hutchings, M.I., Hoskisson, P.A., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 150, 2795-2806.

Ian, E., Malko, D.B., Sekurova, O.N., Bredholt, H., Ruckert, C., Borisova, M.E., Albersmeier, A., Kalinowski, J., Gelfand, M.S., and Zotchev, S.B. (2014). Genomics of sponge-associated *Streptomyces* spp. closely related to *Streptomyces albus* J1074: insights into marine adaptation and secondary metabolite biosynthesis potential. *PLoS One* 9, e96719.

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

Inouye, M. (2006). Signaling by transmembrane proteins shifts gears. *Cell* 126, 829-831.

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

Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Beppu, T. (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* 174, 7585-7594.

Jenal, U., and Galperin, M.Y. (2009). Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol* 12, 152-160.

Jiang, S., Piao, C., Yu, Y., Cao, P., Li, C., Yang, F., Li, M., Xiang, W., and Liu, C. (2018). *Streptomyces capitiformicae* sp. nov., a novel actinomycete producing angucyclinone antibiotics isolated from the head of *Camponotus japonicus* Mayr. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 118-124.

Jung, K., Fried, L., Behr, S., and Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current opinion in microbiology* 15, 118-124.

Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol* 17, 529-535.

Kallifidas, D., Jiang, G., Ding, Y., and Luesch, H. (2018). Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Cell Fact* 17, 25.

Kallifidas, D., Pascoe, B., Owen, G.A., Strain-Damerell, C.M., Hong, H.J., and Paget, M.S. (2010). The zinc-responsive regulator Zur controls expression of the coelibactin gene cluster in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 192, 608-611.

BIBLIOGRAFÍA

Kämpfer, P. (2015). *Streptomyces*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

Kang, S.H., Huang, J., Lee, H.N., Hur, Y.A., Cohen, S.N., and 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.

Katz, L., and Donadio, S. (1993). Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 47, 875-912.

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

Khan, S.T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozono, I., Mukai, A., Takagi, M., and Shinya, K. (2011). *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol* 13, 391-403.

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

Kim, D.J., Huh, J.H., Yang, Y.Y., Kang, C.M., Lee, I.H., Hyun, C.G., Hong, S.K., and 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, D.W., Chater, K.F., Lee, K.J., and Hesketh, A. (2005). Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* 151, 2707-2720.

Kim, J.N., Kim, Y., Jeong, Y., Roe, J.H., Kim, B.G., and Cho, B.K. (2015). Comparative Genomics Reveals the Core and Accessory Genomes of *Streptomyces* Species. *J Microbiol Biotechnol* 25, 1599-1605.

Kim, J.S., Lee, H.N., Kim, P., Lee, H.S., and Kim, E.S. (2012). Negative role of *wblA* in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of microbiology and biotechnology* 22, 736-741.

Kim, S., Hirakawa, H., Muta, S., and Kuhara, S. (2010). Identification and classification of a two-component system based on domain structures in bacteria and differences in domain structure between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 716-720.

Kirby, R., and Hopwood, D.A. (1977). Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* 98, 239-252.

Kirby, R., Wright, L.F., and Hopwood, D.A. (1975). Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* 254, 265-267.

Kitani, S., Ikeda, H., Sakamoto, T., Noguchi, S., and Nihira, T. (2009). Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 1089-1096.

Kitani, S., Miyamoto, K.T., Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H., *et al.* (2011). Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16410-16415.

Kotowska, M., Ciekot, J., and Pawlik, K. (2014). Type II thioesterase ScoT is required for coelimycin production by the modular polyketide synthase Cpk of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Acta biochimica Polonica* 61, 141-147.

Kumbhar, C., Mudliar, P., Bhatia, L., Kshirsagar, A., and Watve, M. (2014). Widespread predatory abilities in the genus *Streptomyces*. *Arch Microbiol* 196, 235-248.

Kuscer, E., Coates, N., Challis, I., Gregory, M., Wilkinson, B., Sheridan, R., and Petkovic, H. (2007). Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Bacteriol* 189, 4756-4763.

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

Lee, E.J., Cho, Y.H., Kim, H.S., Ahn, B.E., and Roe, J.H. (2004). Regulation of sigmaB by an anti- and an anti-anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress. *J Bacteriol* 186, 8490-8498.

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

Lehning, C.E., Heidelberger, J.B., Reinhard, J., Norholm, M.H.H., and Draheim, R.R. (2017). A Modular High-Throughput In Vivo Screening Platform Based on Chimeric Bacterial Receptors. *ACS Synth Biol* 6, 1315-1326.

Lehr, N.A., Adomas, A., Asiegbu, F.O., Hampp, R., and Tarkka, M.T. (2009). WS-5995 B, an antifungal agent inducing differential gene expression in the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* but not in *Heterobasidion abietinum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 347-358.

Li, L., Jiang, W., and Lu, Y. (2017). A Novel Two-Component System, GluR-GluK, Involved in Glutamate Sensing and Uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 199.

Li, X., Wang, J., Li, S., Ji, J., Wang, W., and Yang, K. (2015). ScbR- and ScbR2-mediated signal transduction networks coordinate complex physiological responses in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep* 5, 14831.

Li, Y.Q., Chen, P.L., Chen, S.F., Wu, D., and Zheng, J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci* 5, 173-179.

Lin, J., Nishino, K., Roberts, M.C., Tolmasky, M., Aminov, R.I., and Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 6, 34.

BIBLIOGRAFÍA

Lin, Y.R., Hahn, M.Y., Roe, J.H., Huang, T.W., Tsai, H.H., Lin, Y.F., Su, T.S., Chan, Y.J., and Chen, C.W. (2009). *Streptomyces* telomeres contain a promoter. *J Bacteriol* *191*, 773-781.

Linares-Otoya, L., Linares-Otoya, V., Armas-Mantilla, L., Blanco-Olano, C., Crusemann, M., Ganoza-Yupanqui, M.L., Campos-Florian, J., König, G.M., and Schaberle, T.F. (2017). Identification and heterologous expression of the kocurin biosynthetic gene cluster. *Microbiology*.

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schaberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., *et al.* (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* *517*, 455-459.

Liu, G., Chater, K.F., Chandra, G., Niu, G., and Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *77*, 112-143.

Liu, J., Li, J., Dong, H., Chen, Y., Wang, Y., Wu, H., Li, C., Weaver, D.T., Zhang, L., and Zhang, B. (2017). Characterization of an Lrp/AsnC family regulator *SCO3361*, controlling actinorhodin production and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* *101*, 5773-5783.

Liu, R., Deng, Z., and Liu, T. (2018a). *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng*.

Liu, R., Zhi, X., Zhou, Z., Zhang, H., Yang, R., Zou, T., and Chen, C. (2018b). Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Kruppel-like factor 5 transcription by Sp1. *Sci Rep* *8*, 1138.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.

Lobo, D., and Levin, M. (2015). Inferring regulatory networks from experimental morphological phenotypes: a computational method reverse-engineers planarian regeneration. *PLoS Comput Biol* *11*, e1004295.

Lobo, D., Lobikin, M., and Levin, M. (2017). Discovering novel phenotypes with automatically inferred dynamic models: a partial melanocyte conversion in *Xenopus*. *Sci Rep* *7*, 41339.

Lombó, F., Abdelfattah, M.S., Braña, A.F., Salas, J.A., Rohr, J., and Méndez, C. (2009). Elucidation of oxygenation steps during oviedomycin biosynthesis and generation of derivatives with increased antitumor activity. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* *10*, 296-303.

Lombó, F., Braña, A.F., Méndez, C., and Salas, J.A. (1999). The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol* *181*, 642-647.

Lombó, F., Braña, A.F., Salas, J.A., and Méndez, C. (2004). Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 5, 1181-1187.

López-Redondo, M.L., Moronta, F., Salinas, P., Espinosa, J., Cantos, R., Dixon, R., Marina, A., and Contreras, A. (2010). Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system. *Mol Microbiol* 78, 475-489.

Loria, R., Bignell, D.R., Moll, S., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Johnson, E.G., Seipke, R.F., and Gibson, D.M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 3-10.

Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu Rev Phytopathol* 44, 469-487.

Lu, Y., He, J., Zhu, H., Yu, Z., Wang, R., Chen, Y., Dang, F., Zhang, W., Yang, S., and Jiang, W. (2011). An orphan histidine kinase, OhkA, regulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 193, 3020-3032.

Lu, Y., Wang, W., Shu, D., Zhang, W., Chen, L., Qin, Z., Yang, S., and Jiang, W. (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 625-635.

Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., and Stock, J.B. (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 718-722.

MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., and MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61-68.

Mak, S., and Nodwell, J.R. (2017). Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Mol Microbiol* 106, 597-613.

Mak, S., Xu, Y., and Nodwell, J.R. (2014). The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Molecular microbiology* 93, 391-402.

Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C., and Sánchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett* 274, 118-125.

Manteca, A., and Sánchez, J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol* 75, 2920-2924.

BIBLIOGRAFÍA

Manteca, A., Ye, J., Sánchez, J., and Jensen, O.N. (2011). Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *J Proteome Res* 10, 5481-5492.

Mao, X.M., Zhou, Z., Hou, X.P., Guan, W.J., and Li, Y.Q. (2009). Reciprocal regulation between SigK and differentiation programs in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 191, 6473-6481.

Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W.A., and Waldburger, C.D. (2001). Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem* 276, 41182-41190.

Martín, J.F., and Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 3, 263-273.

Martín, J.F., Rodríguez-García, A., and Liras, P. (2017). The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism, respiration, cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot (Tokyo)* 70, 534-541.

Martín, J.F., Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Smith, M.C., Ellingsen, T.E., Nieselt, K., Burroughs, N.J., and Wellington, E.M. (2012). Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* 95, 61-75.

Martínez-Antonio, A., and Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 482-489.

Masand, M., Sivakala, K.K., Menghani, E., Thinesh, T., Anandham, R., Sharma, G., Sivakumar, N., Jebakumar, S.R.D., and Jose, P.A. (2018). Biosynthetic Potential of Bioactive Streptomycetes Isolated From Arid Region of the Thar Desert, Rajasthan (India). *Front Microbiol* 9, 687.

Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 910-938.

Matejka, J., and Fitzmaurice, G. (2017). Same Stats, Different Graphs: Generating Datasets with Varied Appearance and Identical Statistics through Simulated Annealing. In *Proceedings of the 2017 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems (Denver, Colorado, USA: ACM)*, pp. 1290-1294.

Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 146, 47-56.

McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., *et al.* (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 3348-3357.

McKenzie, N.L., and Nodwell, J.R. (2007). Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol* 189, 5284-5292.

Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Muller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M.T., Ronning, C.M., Nierman, W.C., *et al.* (2010). The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* 2, 212-224.

Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B., and Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol* 31, 446-450.

Méndez, C., Kunzel, E., Lipata, F., Lombó, F., Cotham, W., Walla, M., Bearden, D.W., Braña, A.F., Salas, J.A., and Rohr, J. (2002). Ovidomycin, an unusual angucyclinone encoded by genes of the oleandomycin-producer *Streptomyces antibioticus* ATCC11891. *Journal of natural products* 65, 779-782.

Merk, D., Friedrich, L., Grisoni, F., and Schneider, G. (2018). De Novo Design of Bioactive Small Molecules by Artificial Intelligence. *Molecular informatics*.

Meschke, H., Walter, S., and Schrempf, H. (2012). Characterization and localization of prodiginines from *Streptomyces lividans* suppressing *Verticillium dahliae* in the absence or presence of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental microbiology* 14, 940-952.

Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 413-451.

Miguélez, E.M., Hardisson, C., and Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol* 145, 515-525.

Minatelli, S. (2015). Deleción de los sistemas de dos componentes AbrA y AbrB en *Streptomyces coelicolor*: su efecto sobre la producción de antibióticos y diferenciación. (Universidad de Salamanca).

Mo, S., Sydor, P.K., Corre, C., Alhamadsheh, M.M., Stanley, A.E., Haynes, S.W., Song, L., Reynolds, K.A., and Challis, G.L. (2008). Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chem Biol* 15, 137-148.

Moglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2010). Addition at the molecular level: signal integration in designed Per-ARNT-Sim receptor proteins. *J Mol Biol* 400, 477-486.

Montes Estellés, R.M., Regidor Ros, J.L., Cuesta Amat, G., Moreno Trigós, Y., and Hernández Giménez, E. (2004). Actinomicetos en las pinturas murales de la Capilla de la Comunión de la Basílica de los Desamparados de Valencia. In XV Congreso de Conservación y Restauración de bienes culturales (Murcia), pp. 499-504.

BIBLIOGRAFÍA

Morota, G., Ventura, R.V., Silva, F.F., Koyama, M., and Fernando, S.C. (2018). Machine learning and data mining advance predictive big data analysis in precision animal agriculture. *J Anim Sci*.

Musialowski, M.S., Flett, F., Scott, G.B., Hobbs, G., Smith, C.P., and Oliver, S.G. (1994). Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J Bacteriol* *176*, 5123-5125.

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

Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* *26*, 1362-1384.

Nettleton, D.E., Doyle, T.W., Krishnan, B., Matsumoto, G.K., and Clardy, J. (1985). Isolation and structure of rebeccamycin - a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes*. *Tetrahedron Letters* *26*, 4011-4014.

Nishiyama, T., Hashimoto, Y., Kusakabe, H., Kumano, T., and Kobayashi, M. (2014). Natural low-molecular mass organic compounds with oxidase activity as organocatalysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 17152-17157.

Niu, G., Li, L., Wei, J., and Tan, H. (2013). Cloning, heterologous expression, and characterization of the gene cluster required for gougerotin biosynthesis. *Chem Biol* *20*, 34-44.

Noens, E.E., Mersinias, V., Traag, B.A., Smith, C.P., Koerten, H.K., and van Wezel, G.P. (2005). SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* *58*, 929-944.

Novakova, R., Núñez, L.E., Homerova, D., Knirschova, R., Feckova, L., Rezuchova, B., Sevcikova, B., Menéndez, N., Morís, F., Cortes, J., *et al.* (2018). Increased heterologous production of the antitumoral polyketide mithramycin A by engineered *Streptomyces lividans* TK24 strains. *Appl Microbiol Biotechnol* *102*, 857-869.

Okamoto-Hosoya, Y., Sato, T.A., and Ochi, K. (2000). Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot (Tokyo)* *53*, 1424-1427.

Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003). Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* *185*, 601-609.

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

Omura, S. (1992). The expanded horizon for microbial metabolites - a review. *Gene* *115*, 141-149.

- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., and Furumai, T. (2011). Mycolic-acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol* 77, 400-406.
- Ortseifen, V., Kalinowski, J., Puhler, A., and Ruckert, C. (2017). The complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) carrying gene clusters for the biosynthesis of tetracenomycin C, 5'-hydroxy streptomycin, and acarbose. *J Biotechnol* 262, 84-88.
- Paget, M.S., Leibovitz, E., and Buttner, M.J. (1999). A putative two-component signal transduction system regulates *sigmaE*, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 33, 97-107.
- Park, S.S., Yang, Y.H., Song, E., Kim, E.J., Kim, W.S., Sohng, J.K., Lee, H.C., Liou, K.K., and 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.
- Pawlik, K., Kotowska, M., and Kolesinski, P. (2010). *Streptomyces coelicolor* A3(2) Produces a New Yellow Pigment Associated with the Polyketide Synthase Cpk. *J Mol Microbiol Biotechnol* 19, 147-151.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A.F., Shimkets, L.J., Sevillano, L., and Santamaría, R.I. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* 4, 175-183.
- Podgornaia, A.I., and Laub, M.T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current opinion in microbiology* 16, 156-162.
- Prudhomme, M. (2000). Recent developments of rebeccamycin analogues as topoisomerase I inhibitors and antitumor agents. *Curr Med Chem* 7, 1189-1212.
- Quintana, E.T., Wierzbicka, K., Mackiewicz, P., Osman, A., Fahal, A.H., Hamid, M.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Maldonado, L.A., and Goodfellow, M. (2008). *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 305-313.
- Rafiee, M.R., Girardot, C., Sigismondo, G., and Krijgsveld, J. (2016). Expanding the Circuitry of Pluripotency by Selective Isolation of Chromatin-Associated Proteins. *Mol Cell* 64, 624-635.
- Ramos, A., Lombó, F., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., and Salas, J.A. (2008). Biosynthesis of elloramycin in *Streptomyces olivaceus* requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster. *Microbiology* 154, 781-788.
- Raveh, A., Delekta, P.C., Dobry, C.J., Peng, W., Schultz, P.J., Blakely, P.K., Tai, A.W., Matainaho, T., Irani, D.N., Sherman, D.H., *et al.* (2013). Discovery of potent broad spectrum antivirals derived from marine actinobacteria. *PLoS One* 8, e82318.

BIBLIOGRAFÍA

Rico, S. (2014). Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta positivo de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* (Universidad de Salamanca).

Rico, S., Santamaría, R.I., Yepes, A., Rodríguez, H., Laing, E., Bucca, G., Smith, C.P., and Díaz, M. (2014a). Deciphering the Regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a Positive Response Regulator of Antibiotic Production. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 2417-2428.

Rico, S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S., Krause, E.M., Díaz, M., and Santamaría, R.I. (2014b). Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production. *PLoS one* 9, e109844.

Richardson, M.A., Kuhstoss, S., Solenberg, P., Schaus, N.A., and Rao, R.N. (1987). A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* 61, 231-241.

Rigali, S., Anderssen, S., Naome, A., and van Wezel, G.P. (2018). Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery. *Biochemical pharmacology* 153, 24-34.

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

Robertsen, H.L., Weber, T., Kim, H.U., and Lee, S.Y. (2018). Toward Systems Metabolic Engineering of *Streptomyces* for Secondary Metabolites Production. *Biotechnol J* 13.

Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., and Martín, J.F. (2007). Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant. *Proteomics* 7, 2410-2429.

Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Santamaría, R.I. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial cell factories* 12, 127.

Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Santamaría, R.I., and Díaz, M. (2015). The two kinases, AbrC1 and AbrC2, of the atypical two-component system AbrC are needed to regulate antibiotic production and differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Front Microbiol* 6, 450.

Rodríguez, L., Oelkers, C., Aguirrezabalaga, I., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., and Salas, J.A. (2000). Generation of hybrid elloramycin analogs by combinatorial biosynthesis using genes from anthracycline-type and macrolide biosynthetic pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 271-276.

Rohr, J., and Zeeck, A. (1990). Structure-activity relationships of elloramycin and tetracenomycin C. *J Antibiot (Tokyo)* *43*, 1169-1178.

Romero, D., Traxler, M.F., López, D., and Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chem Rev* *111*, 5492-5505.

Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.).

Rozas, D., Gullón, S., and Mellado, R.P. (2012). A Novel Two-Component System Involved in the Transition to Secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS one* *7*, e31760.

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

Salas, A.P., Zhu, L., Sánchez, C., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., and Salas, J.A. (2005). Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase. *Mol Microbiol* *58*, 17-27.

Salerno, P., Larsson, J., Bucca, G., Laing, E., Smith, C.P., and Flardh, K. (2009). One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation. *J Bacteriol* *191*, 6489-6500.

San Paolo, S., Huang, J., Cohen, S.N., and Thompson, C.J. (2006). *rag* genes: novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* *61*, 1167-1186.

Sánchez, C., Butovich, I.A., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., and Salas, J.A. (2002). The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol* *9*, 519-531.

Sánchez, C., Zhu, L., Braña, A.F., Salas, A.P., Rohr, J., Méndez, C., and Salas, J.A. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 461-466.

Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Ávalos, M., Guzmán-Trampe, S., *et al.* (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo)*.

Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Payero, T.D., Martín-Sánchez, L., Canibano, C., Martín, J.F., and Aparicio, J.F. (2012). Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimarin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM. *PLoS One* *7*, e38536.

BIBLIOGRAFÍA

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., and Martín, J.F. (2012). Identification of different promoters in the *absA1-absA2* two-component system, a negative regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular genetics and genomics : MGG*.

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., and Martín, J.F. (2013). Identification of different promoters in the *absA1-absA2* two-component system, a negative regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Genet Genomics* 288, 39-48.

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., and Martín, J.F. (2009). Crosstalk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol* 72, 53-68.

Sanz, D. (2014). Implicación del sistema de dos componentes AbrB en la regulación de la producción de antibióticos y diferenciación en *Streptomyces coelicolor*. (Universidad de Salamanca).

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G.E., and Merli, S. (1992). Isolation of endophytic streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Appl Environ Microbiol* 58, 2691-2693.

Sarmiento-Vizcaíno, A., Espadas, J., Martín, J., Braña, A.F., Reyes, F., García, L.A., and Blanco, G. (2018). Atmospheric Precipitations, Hailstone and Rainwater, as a Novel Source of *Streptomyces* Producing Bioactive Natural Products. *Front Microbiol* 9.

Scaramozzino, F., White, A., Perego, M., and Hoch, J.A. (2009). A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 191, 687-692.

Schniete, J.K., Cruz-Morales, P., Selem-Mojica, N., Fernández-Martínez, L.T., Hunter, I.S., Barona-Gómez, F., and Hoskisson, P.A. (2018). Expanding Primary Metabolism Helps Generate the Metabolic Robustness To Facilitate Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *MBio* 9.

Schrey, S.D., and Tarkka, M.T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 11-19.

Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., and Hutchings, M.I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS microbiology reviews* 36, 862-876.

Sekurova, O.N., Brautaset, T., Sletta, H., Borgos, S.E., Jakobsen, M.O., Ellingsen, T.E., Strom, A.R., Valla, S., and Zotchev, S.B. (2004). In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* 186, 1345-1354.

Selvin, J., Shanmugha Priya, S., Seghal Kiran, G., Thangavelu, T., and Sapna Bai, N. (2009). Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiol Res* 164, 352-363.

Sevillano, L., Díaz, M., and Santamaría, R.I. (2017). Development of an antibiotic marker-free platform for heterologous protein production in *Streptomyces*. *Microb Cell Fact* 16, 164.

Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., and Ochi, K. (1996). Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178, 7276-7284.

Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., and 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, 1149-1160.

Skerker, J.M., Perchuk, B.S., Siryaporn, A., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Goulian, M., and Laub, M.T. (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133, 1043-1054.

Slonczewski, J.L., and Foster, J.W. (2009). *Microbiology: An Evolving Science* (W. W. Norton & Company).

Som, N.F., Heine, D., Holmes, N., Knowles, F., Chandra, G., Seipke, R.F., Hoskisson, P.A., Wilkinson, B., and Hutchings, M.I. (2017). The MtrAB two-component system controls antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 163, 1415-1419.

Sprusansky, O., Stirrett, K., Skinner, D., Denoya, C., and Westpheling, J. (2005). The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *J Bacteriol* 187, 664-671.

Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., and Nikodinovic-Runic, J. (2012). *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1217-1231.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.

Strzelczyk, A.B. (2004). Observations on aesthetic and structural changes induced in Polish historic objects by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 151-156.

Suihko, M.L., Alakomi, H.L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., and Saarela, M. (2007). Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Syst Appl Microbiol* 30, 494-508.

BIBLIOGRAFÍA

Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 30, 33-46.

Swiatek, M.A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y.H., Laing, E., Kim, B.G., Smith, C.P., and 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.

Taechowisan, T., Peberdy, J.F., and Lumyong, S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 381-385.

Takano, E., Kinoshita, H., Mersinias, V., Bucca, G., Hotchkiss, G., Nihira, T., Smith, C.P., Bibb, M., Wohlleben, W., and Chater, K. (2005a). A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 56, 465-479.

Takano, H., Hagiwara, K., and Ueda, K. (2015). Fundamental role of cobalamin biosynthesis in the developmental growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 2329-2337.

Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., and Ueda, K. (2005b). Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol* 187, 1825-1832.

Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135, 397-402.

Tan, G.Y., Bai, L., and Zhong, J.J. (2013). Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnology and bioengineering* 110, 2984-2893.

Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2007). AfsR Recruits RNA Polymerase to the *afsS* Promoter: A Model for Transcriptional Activation by SARPs. *J Mol Biol* 369, 322-333.

Tejada, M. (2015). Estudio del regulador Aor1 de *Streptomyces coelicolor*. (Universidad de Salamanca).

Tenconi, E., Traxler, M., Hoebreck, C., van Wezel, G.P., and Rigali, S. (2018). Prodiginine Production in *Streptomyces coelicolor* Correlates Temporally and Spatially to Programmed Cell Death. *bioRxiv*.

Thompson, C.J., Fink, D., and Nguyen, L.D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* 3, REVIEWS1020.

Tiwari, S., Jamal, S.B., Hassan, S.S., Carvalho, P., Almeida, S., Barh, D., Ghosh, P., Silva, A., Castro, T.L.P., and Azevedo, V. (2017). Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front Microbiol* 8, 1878.

Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., *et al.* (1999). Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* 6, 729-734.

Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., and Lee, S.Y. (2015). CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol*.

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

Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J.J., and Martin, J.F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *Febs J* 274, 1110-1122.

Turner, W.B. (1973). Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Society for Applied Bacteriology symposium series* 2, 209-217.

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

Urem, M., van Rossum, T., Bucca, G., Moolenaar, G.F., Laing, E., Swiatek-Polatynska, M.A., Willemsse, J., Tenconi, E., Rigali, S., Goosen, N., *et al.* (2016). OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the Dormancy Regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* Control Overlapping Regulons. *mSystems* 1.

van der Heul, H.U., Bilyk, B.L., McDowall, K.J., Seipke, R.F., and van Wezel, G.P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Nat Prod Rep* 35, 575-604.

van Keulen, G., Hopwood, D.A., Dijkhuizen, L., and Sawers, R.G. (2005). Gas vesicles in actinomycetes: old buoys in novel habitats? *Trends Microbiol* 13, 350-354.

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

Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y.G., Donadio, S., and Hutchinson, C.R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J Bacteriol* 171, 5872-5881.

BIBLIOGRAFÍA

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., and van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71, 495-548.

Viollier, P.H., Kelemen, G.H., Dale, G.E., Nguyen, K.T., Buttner, M.J., and Thompson, C.J. (2003). Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 47, 699-714.

Volff, J.N., and Altenbuchner, J. (2000). A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* 186, 143-150.

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

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

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

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

Weber, W., Zahner, H., Siebers, J., Schroder, K., and Zeeck, A. (1979). [Metabolic products of microorganisms. 175. Tetracenomycin C (author's transl)]. *Arch Microbiol* 121, 111-116.

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

Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* 60, 43-50.

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

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

Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., and Rahman, S.K. (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* 52, 1189-1208.

Williams, R.H., and Whitworth, D.E. (2010). The genetic organisation of prokaryotic two-component system signalling pathways. *BMC Genomics* *11*, 720.

Wohlert, S.E., Blanco, G., Lombó, F., Fernández, E., Braña, A.F., Reich, S., Udvarnoki, G., Méndez, C., Decker, H., Frevert, J., *et al.* (1998). Novel Hybrid Tetracenomycins through Combinatorial Biosynthesis Using a Glycosyltransferase Encoded by the *elm* Genes in Cosmid 16F4 and Which Shows a Broad Sugar Substrate Specificity. *Journal of the American Chemical Society* *120*, 10596-10601.

Wolanin, P.M., Thomason, P.A., and Stock, J.B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* *3*, REVIEWS3013.

Wolfe, A.J. (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* *69*, 12-50.

Wu, C., Ichinose, K., Choi, Y.H., and van Wezel, G.P. (2017). Aromatic Polyketide GTRI-02 is a Previously Unidentified Product of the *act* Gene Cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Chembiochem* *18*, 1428-1434.

Wuichet, K., Cantwell, B.J., and Zhulin, I.B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current opinion in microbiology* *13*, 219-225.

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

Yang, H., Tian, Y., Jia, J., Tan, H., and Chater, K.F. (2000). The function of a regulatory gene, *scrX* related to differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Science in China Series C, Life sciences* *43*, 157-168.

Yepes, A. (2006). Estudio de sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*. (Universidad de Salamanca).

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

Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R.I., and Díaz, M. (2011). Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *PLOS ONE* *6*, e19980.

Yim, G., Wang, H.H., and Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *362*, 1195-1200.

Yu, L., Gao, W., Li, S., Pan, Y., and Liu, G. (2016). GntR family regulator *SCO6256* is involved in antibiotic production and conditionally regulates the transcription of myo-inositol catabolic genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* *162*, 537-551.

BIBLIOGRAFÍA

Yu, Y., Tang, B., Dai, R., Zhang, B., Chen, L., Yang, H., Zhao, G., and Ding, X. (2018). Identification of the streptothricin and tunicamycin biosynthetic gene clusters by genome mining in *Streptomyces sp.* strain fd1-xmd. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 2621-2633.

Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S., Tan, H., Lu, Y., and Jiang, W. (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* 85, 535-556.

Yu, Z., Zhu, H., Zheng, G., Jiang, W., and Lu, Y. (2014). A genome-wide transcriptomic analysis reveals diverse roles of the two-component system DraR-K in the physiological and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 9351-9363.

Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J.A., and Varughese, K.I. (2000). A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* 8, 851-862.

Zeng, H., Wen, S., Xu, W., He, Z., Zhai, G., Liu, Y., Deng, Z., and Sun, Y. (2015). Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 10575-10585.

Zhou, Y.J., Zhao, D.D., Liu, H., Chen, H.T., Li, J.J., Mu, X.Q., Liu, Z., Li, X., Tang, L., Zhao, Z.Y., *et al.* (2017). Cancer killers in the human gut microbiota: diverse phylogeny and broad spectra. *Oncotarget* 8, 49574-49591.

Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T., and Inouye, M. (2000). Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7808-7813.

Zong, C., Cheung-Lee, W.L., Elashal, H.E., Raj, M., and Link, A.J. (2018). Albusnodin: an acetylated lasso peptide from *Streptomyces albus*. *Chem Commun (Camb)* 54, 1339-1342.



The Orphan Response Regulator Aor1 Is a New Relevant Piece in the Complex Puzzle of *Streptomyces coelicolor* Antibiotic Regulatory Network

Sergio Antoraz¹, Sergio Rico¹, Héctor Rodríguez^{1,2}, Laura Sevillano¹, Juan F. Alzate³, Ramón I. Santamaría^{1*} and Margarita Díaz^{1*}

¹ Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Biología Funcional y Genómica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, ² Cic bioGUNE, Derio, Spain, ³ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

OPEN ACCESS

Edited by:

Bart Devreese,
Ghent University, Belgium

Reviewed by:

Yinhua Lu,
Shanghai Institutes for Biological
Sciences (CAS), China
Sébastien Rigali,
University of Liège, Belgium

*Correspondence:

Margarita Díaz
mardi@usal.es
Ramón I. Santamaría
santa@usal.es

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 05 September 2017

Accepted: 24 November 2017

Published: 12 December 2017

Citation:

Antoraz S, Rico S, Rodríguez H, Sevillano L, Alzate JF, Santamaría RI and Díaz M (2017) The Orphan Response Regulator Aor1 Is a New Relevant Piece in the Complex Puzzle of *Streptomyces coelicolor* Antibiotic Regulatory Network. *Front. Microbiol.* 8:2444. doi: 10.3389/fmicb.2017.02444

Streptomyces coelicolor, the best-known biological antibiotic producer, encodes 29 predicted orphan response regulators (RR) with a putative role in the response to environmental stimuli. However, their implication in relation to secondary metabolite production is mostly unexplored. Here, we show how the deletion of the orphan RR Aor1 (SCO2281) provoked a drastic decrease in the production of the three main antibiotics produced by *S. coelicolor* and a delay in morphological differentiation. With the aim to better understand the transcriptional events underpinning these phenotypes, and the global role of Aor1 in *Streptomyces*, a transcriptional fingerprint of the $\Delta aor1$ mutant was compared to a wild-type strain. RNA-Seq analysis revealed that the deletion of this orphan regulator affects a strikingly high number of genes, such as the genes involved in secondary metabolism, which matches the antibiotic production profiles observed. Of particular note, the sigma factor SigB and all of the genes comprising its regulon were up regulated in the mutant. Our results show that this event links osmotic stress to secondary metabolite production in *S. coelicolor* and indicates that the RR encoded by *aor1* could be a key regulator in both of these processes.

Keywords: *Streptomyces*, two-component systems, antibiotic production, orphan response regulator, crosstalk, stress response

INTRODUCTION

The ubiquity of the genus *Streptomyces*, comprised of Gram-positive filamentous bacteria, has greatly facilitated its presence as a normal inhabitant of soil, marine niches, and also as a symbiotic partner of sponges, plants, and a plethora of other types of organisms (Chankhamhaengdecha et al., 2013; Braña et al., 2015). All species of this genus harbor the genetic information to produce around 20–30 different secondary metabolites, such as antibiotics (Chaudhary et al., 2013), which in nature may be used as signals in the intra- and interspecies communication that establishes relationships among the organisms within a community (symbiotic, antagonistic, etc.) (Vetsigian et al., 2011; Diminic et al., 2014). The production of secondary metabolites takes place as a response to the different physical (pH, temperature, pressure, etc.) and chemical (nutrients, elicitors, etc.) signals present in the environment through complex regulatory networks (Liu et al., 2013). The wide range

of environmental and physiological responses to stimuli generated by bacteria can be appreciated within the database of the Prokaryotic 2-Component Systems (P2CS¹). Two-component systems (TCSs) are able to recognize change, and integrate this information to elaborate a proper response, which includes the production of antibiotics.

A model of a typical TCS consists of a membrane-bound Histidine Kinase (HK) that acts as a sensor and is auto-phosphorylated at a specific histidine residue upon receiving a stimulus. Later on, the phosphoryl group is transferred to an aspartic acid of the cytoplasmic Response Regulator (RR), which triggers its activation through a conformational change. Finally, this protein completes the response by mainly regulating the expression of target genes. Both HK and RR genes usually lie in close proximity to one another on a chromosome and form an operon. However, there are also a considerable number of orphans, genes that lack a counterpart in the genome, which ultimately broadens the response capacity of cells (Schaller et al., 2011).

Three main mechanisms ensure partner specificity in bacteria: molecular recognition, phosphatase activity, and substrate competition (Podgornaia and Laub, 2013). A small number of residues are responsible for maintaining the specific molecular recognition in protein-protein interaction interfaces between HKs and RRs (Capra et al., 2010). Furthermore, the HK may act as both a kinase and a phosphatase in these systems. The phosphatase reaction serves, in part, to modulate the level of pathway output and to inhibit the pathway after an activating signal has subsided (Podgornaia and Laub, 2013). Crosstalk between different pathways, leading to the activation of a RR by a non-cognate HK or by promiscuous phosphodonors, such as acetyl-phosphate, can also be avoided by the phosphatase activity of the cognate HK (Salazar and Laub, 2015). Nevertheless, the existence of different inner checkpoints for maintaining fidelity does not imply that such TCSs systems cannot play a role in the activity of more than one interacting partner. However, although adding crosstalk in TCSs may have disastrous consequences for cell fitness, it is important for the evolution of new TCS pathways after the duplication of an existing pathway being immediately unavoidable the crosstalk (Capra et al., 2012; Rowland and Deeds, 2014).

The number of TCSs present in an organism is directly correlated to its habitat (Schaller et al., 2011) and can be variable: zero in *Mycoplasma genitalium*; 30 HKs and 32 RRs in *Escherichia coli*; 36 HKs and 34 RRs in *Bacillus subtilis*; up to 131 HKs and 80 RRs in *Anabaena* sp.; and 132 HKs and 119 RRs in *Myxococcus xanthus* (Jung et al., 2012). This evolutionary advantage may allow an organism to respond quickly to all possible situations.

Many *Streptomyces* genomes have been sequenced to date, and more than 50 TCSs and approximately 20 orphan HKs and 20 orphan RRs (P2CS database) have been identified in all of them. This fact reinforces the idea that *Streptomyces* requires a high number of these TCSs for surviving in a changeable and hostile environment and to cope with a complex lifestyle. The present study has been carried out using *Streptomyces coelicolor*, whose

genome contains 100 HKs, 87 RRs, 20 orphan HKs and 29 RRs (P2CS database) (Bentley et al., 2002). However, only 17 TCSs have so far been studied, and most of these systems are, at least partially, involved in antibiotic biosynthesis (Rodríguez et al., 2013).

One of the TCS previously described by our group, AbrC (SCO4596/97/98) (Yepes et al., 2011; Rico et al., 2014a; Rodríguez et al., 2015), positively regulates the production of antibiotics. Wang et al. reported that AbrC3 (SCO4596) has a high amino acid sequence identity (59%) with the orphan RR SCO2281, where the conserved identity among most RRs is around 30% (Wang et al., 2009). These authors propose that such highly conserved RRs could be regulated by the same HK, which may suggest possible crosstalk between HK AbrC2 (SCO4597) and the RR SCO2281 (Wang et al., 2009). Moreover, the pleiotropic phenotypes of the triple mutant of the AbrC system and the single Δ abrC3 mutant also suggest crosstalk between AbrC HKs and other RRs (Rico et al., 2014a).

In this work we describe for the first time, the involvement of the orphan RR SCO2281 in the regulation of antibiotic production. This gene has been named *aor1* from antibiotic orphan regulator, which we will use from now on. Here, we show how the deletion of this gene is characterized by a drastic decrease in the production of the three main antibiotics produced by *S. coelicolor* (actinorhodin – ACT, undecylprodiginine – RED, and calcium dependent antibiotic – CDA), and also by a delay in morphological differentiation, suggesting that Aor1, like AbrC3, acts as a positive regulator of both processes. Our RNA-Seq results show that Aor1 plays a crucial role in a gene regulation cascade of *S. coelicolor* probably integrating a response to different signals, and establishing a connection between secondary metabolism (through several regulators) and the response to osmotic stress (mediated partially by SigB) within a high level of the regulatory network.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Media and Growth Conditions

Escherichia coli strain BW25113 (pIJ790) (containing the λ Red system) (Datsenko and Wanner, 2000) and non-methylating ET12567 (pUZ8002) (harboring the *tra* genes in the non-transmissible RP4-derivative plasmid pUZ8002) (MacNeil et al., 1992) were used for PCR-targeted mutagenesis of *S. coelicolor* M145. *E. coli* DH5 α and ET12567 (a *dam*⁻ strain) were used to obtain the DNA to transform *S. coelicolor*. For CDA bioassays, a parent strain of *Bacillus subtilis* (CECT 4522) was grown as an overlay on NA medium (Hopwood et al., 1985). *S. coelicolor* M145 (prototroph; SCP1⁻, SCP2⁻) and the Δ aor1 mutant strain were grown on R2YE, MSA, YEPD, NMMP, PGA, R5 and LB solid media for transformation, sporulation, spore quantification, and phenotypic assays (Fernández et al., 1998; Kieser et al., 2000). LB medium (Sambrook et al., 1989) was used for RNA-Seq experiment. When necessary, the medium was supplemented with antibiotics: *E. coli* media - ampicillin (100 μ g mL⁻¹), apramycin (50 μ g mL⁻¹), kanamycin (50 μ g mL⁻¹), chloramphenicol (25 μ g mL⁻¹), or nalidixic acid (25 μ g mL⁻¹)

¹<http://www.p2cs.org/>

and *S. coelicolor* media – neomycin ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) or thiostrepton ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

DNA Manipulation

Plasmid isolation, restriction enzyme digestion, ligation, and transformation of *E. coli* and *S. coelicolor* were carried out using the methods of Green and Sambrook (2012), and Kieser et al. (2000), respectively. The plasmids and cosmids used are listed in Supplementary Table S1.

Mutant Construction

REDIRECT PCR-targeting technology was used to replace the coding region of the *SCO2281* gene with an apramycin resistance cassette [*aac(3)IV* gene] in cosmid SCC30 (Gust et al., 2003). The primers used to amplify the mutagenesis cassette (SRG-28 and SRG-30) with pIJ773 as the template are listed in Supplementary Table S2. The mutated cosmid SCC30 $\Delta\text{SCO2281}::\text{aac}(3)\text{IV}$ ($\Delta\text{SCC30-1}$) obtained in *E. coli* BW25113(pIJ790) were demethylated in the ET12567(pUZ8002) strain and transferred by conjugation to *S. coelicolor* M145. The desired double recombinants carrying apramycin resistance and sensitive to kanamycin (the selection marker for the vector sequences) were selected. Southern blotting and PCR assays confirmed the deletion of the *SCO2281* gene in *S. coelicolor* M145.

Antibiotic Production Analysis

ACT and RED antibiotic production was assayed on solid LB medium plates inoculated with 10^5 spores added in a $5 \mu\text{L}$ drop at 30°C . RED production was detected after 2 days as the red color of colonies. ACT production was observed after 3 days of growth as a blue halo around the colonies. For CDA, after 2 days of growth on NA, the plates were overlaid with 5 mL of soft agar plus $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (70 mM) inoculated with *B. subtilis* as the test microorganism (0.2 mL, 0.25 DO) and incubated at 30°C for 24 h. A replica plate without calcium was used as a negative control. These experiments were all performed in triplicate.

Antibiotic production was assayed from cultures in liquid LB medium inoculated with 10^6 spores mL^{-1} at 30°C . ACT and RED antibiotic production were quantified using the spectrophotometric method described in Yepes et al. (2011). For CDA, plates of NA with and without $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (70 mM) were inoculated on the surface with $200 \mu\text{L}$ of *B. subtilis* (DO₆₀₀ 0.25) using sterile glass balls. Afterward, a sterile cork borer was used on these plates to make wells with a diameter 0.8 cm. $150 \mu\text{L}$ of the supernatant of a 48 h *Streptomyces* culture were added into the wells and incubated at 30°C for 24 h.

Plasmid Construction

The integrative plasmid pSETaor1 (Supplementary Table S1) was constructed by cloning the *aor1* gene and its promoter region in the shuttle *Streptomyces* integrative plasmid pSET152t. First, the *aor1* sequence was cloned in the bifunctional *E. coli*–*Streptomyces* plasmid pXH1s in the NdeI and XhoI sites, remaining under the control of the *xysA* promoter and yielding the intermediate plasmid pXHisaor1. Second, the PCR-amplified *aor1* promoter, cloned with the oligonucleotides SRG-37 and SRG-38 and the

NdeI and EcoRI sites, replaced the *xysA* promoter, obtaining the pHisaor1 vector. This promoter corresponds to the 545 bp upstream region of *SCO2282* that forms an operon with *aor1* gene. Finally, the BglII–BglII fragment of pHisaor1, containing the *aor1* gene plus its promoter, was cloned into the previously de-phosphorylated BamHI site in pSET152t, obtaining the integrative plasmid pSETaor1.

The multicopy plasmid pNXaor1 was obtained by cloning the NdeI/HindIII fragment from the plasmid pXHisaor1 into the same sites of pNX24 (pN702GEM3 derivative). To construct the multicopy plasmid pNaor1, its own promoter (upstream region of *SCO2282*) previously amplified by PCR was cloned as an EcoRI/NdeI fragment into the same sites of pNXaor1 (Supplementary Table S1).

qRT-PCR

Specific primers for the genes tested were designed using the Primer3 web-based tool² (Supplementary Table S2). Five microgram of the RNA samples were treated with RNAase-free DNaseI (Promega) according to the manufacturer's instructions. One microgram of the resulting RNA was used as template for cDNA synthesis using iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) in $20 \mu\text{L}$ reaction volumes. The samples were diluted 1:1 with distilled water and $2 \mu\text{L}$ was used in the quantitative PCR reaction with 10 pmol of forward and reverse primer and $5 \mu\text{L}$ of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-rad).

Each assay was performed in duplicate using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Control PCRs were included to check that there was neither DNA (without RT, enzyme negative control) nor environmental contamination. Absolute quantification was performed using decimal serial dilutions of *S. coelicolor* genomic DNA with a known number of copies as standard.

Comparative Transcriptome Analysis

Streptomyces coelicolor M145 and *S. coelicolor* Δaor1 were grown in LB medium inoculated with 10^6 sp mL^{-1} for 36 h at 28°C . The cells from three biological replicates were collected and treated with RNA protect, and afterward, RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the company instructions. RNA samples quantity and quality were performed by Nanodrop and Bioanalyzer (Agilent). All samples passed the quality threshold of RIN > 7.

Macrogen Inc. (South Korea) provided the RNA-Seq data. The rRNA was removed with Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) and one library per sample was made using the Illumina TruSeq Stranded Total RNA kits. An independent library was constructed and sequenced for each triplicate. Sequencing was carried out in a HiSeq 2500 (Illumina) instrument with 100 bases PE reads. Reads were quality trimmed at Q35 with the script prinseq-lite, and only those that exceeded 50 bases in length were kept. Singletons were also excluded from the clean read set. For each library, the number of reads pairs obtained ranged between 21.2 and 24.4 millions, and around 99% passed the quality filter.

²<https://sourceforge.net/projects/primer3/>

Mapping was carried out with the program Bowtie2 using default settings and the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) reference genome (GenBank NC_003888). SAM file was converted to BAM format using samtools, then sorted and indexed. Between 95 and 98% of the cleaned-read set was successfully mapped to the reference genome.

Reads for rRNA origin were detected counting those that mapped to the genome coordinates of the genes 16S, 23S and 5S. In all libraries the proportion of ribosomal reads was below 8%.

For the differential expression analysis, strand specific reads were counted for each CDS feature annotated in the genome reference using HTSEQ v0.6.1p1. A table containing the raw read counts for each CDS feature was generated and used for the subsequent comparative analysis using the BIOCONDUCTOR package EDGER v3. The analysis was performed using the protocol described for RNA-Seq experiments in the user's guide revised in April 20th 2016.

The RNA-Seq data analyzed here has been deposited in the Sequence Read Archives (SRA, Accession code: PRJNA380047).

RESULTS

Aor1 Acts as a Positive Regulator of Antibiotic Production and Differentiation

The gene *aor1* (SCO2281) from *S. coelicolor* has 687 nucleotides and 73.36% GC content and encodes a putative NarL orphan RR containing two domains: a REC domain (position 9–128) containing the phosphoacceptor Asp from the HK (CheY-homologous receiver) and an HTH-LuxR DNA binding domain (position 156–218) (SMART database³). The encoded protein contains 228 amino acids, with an isoelectric point of 5.47 and a molecular weight of 24.68 kDa. It is highly conserved in all of the *Streptomyces* spp. sequenced to date, with identities ranging from 99 to 75%. Since Aor1 is an orphan RR, there is no HK codifying gene within its genomic context (Figure 1A). The phylogenetic circular dendrogram of *S. coelicolor* RRs (P2CS database) shows that *aor1* (SCO2281) and *abrC3* (SCO4596) are closely related and share 59% protein sequence identity (Figure 1B). This fact points to the possibility of crosstalk between the HKs AbrC1 and/or AbrC2 of the AbrC system and Aor1. In addition, the other closely related RR gene SCO2358 shares 55.7% protein sequence identity with Aor1, and forms part of an operon with the HK SCO2359. Remarkably, the P2CS database also considered the three genes comprising the AbrC TCS as orphans because the intergenic space between the genes is large enough to contain a promoter region. Moreover, the Prediction of Interaction Specificity in Two-Component Systems website of Biozentrum⁴ showed that there were 20 orphan kinases and 29 orphan regulators in *S. coelicolor*, including the AbrC genes. The existence of a common RNA has been shown for the two HKs AbrC1 and AbrC2, however, no common RNA has been obtained for the HK AbrC2 and the RR AbrC3 (Rodríguez et al., 2015).

³<http://smart.embl-heidelberg.de/>

⁴<http://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>

Using this prediction tool, the HKs AbrC1 (SCO4598) and AbrC2 (SCO4597) were in fourth and fifth place as being probable partners with Aor1 (after SCO3750, SCO6424, and SCO0211).

The functional role of Aor1 was analyzed replacing the gene by an apramycin resistance cassette, using the REDIRECT technology (Material and Methods). This mutant strain exhibited a phenotype of an hypo-production of the antibiotics ACT, RED, and CDA, and a delayed morphological development in different media (Supplementary Figure S1), with more extreme phenotypes than those reported for the Δ *abrC* mutant strain (Rico et al., 2014a). Due to the drastic phenotype (Figure 2A), and highly reproducibility found in LB medium, complementation assays and RNA-seq analysis (see below) were performed in that medium. These results suggest that Aor1, as previously shown for AbrC3, acts as a positive RR of antibiotic production and differentiation. The Δ *aor1* mutant phenotypes were complemented by the single copy integrated plasmid pSETaor1 (Supplementary Table S1), which discarded the possibility of polarity effects caused by the mutation as the origin of the phenotypes (Figure 2B).

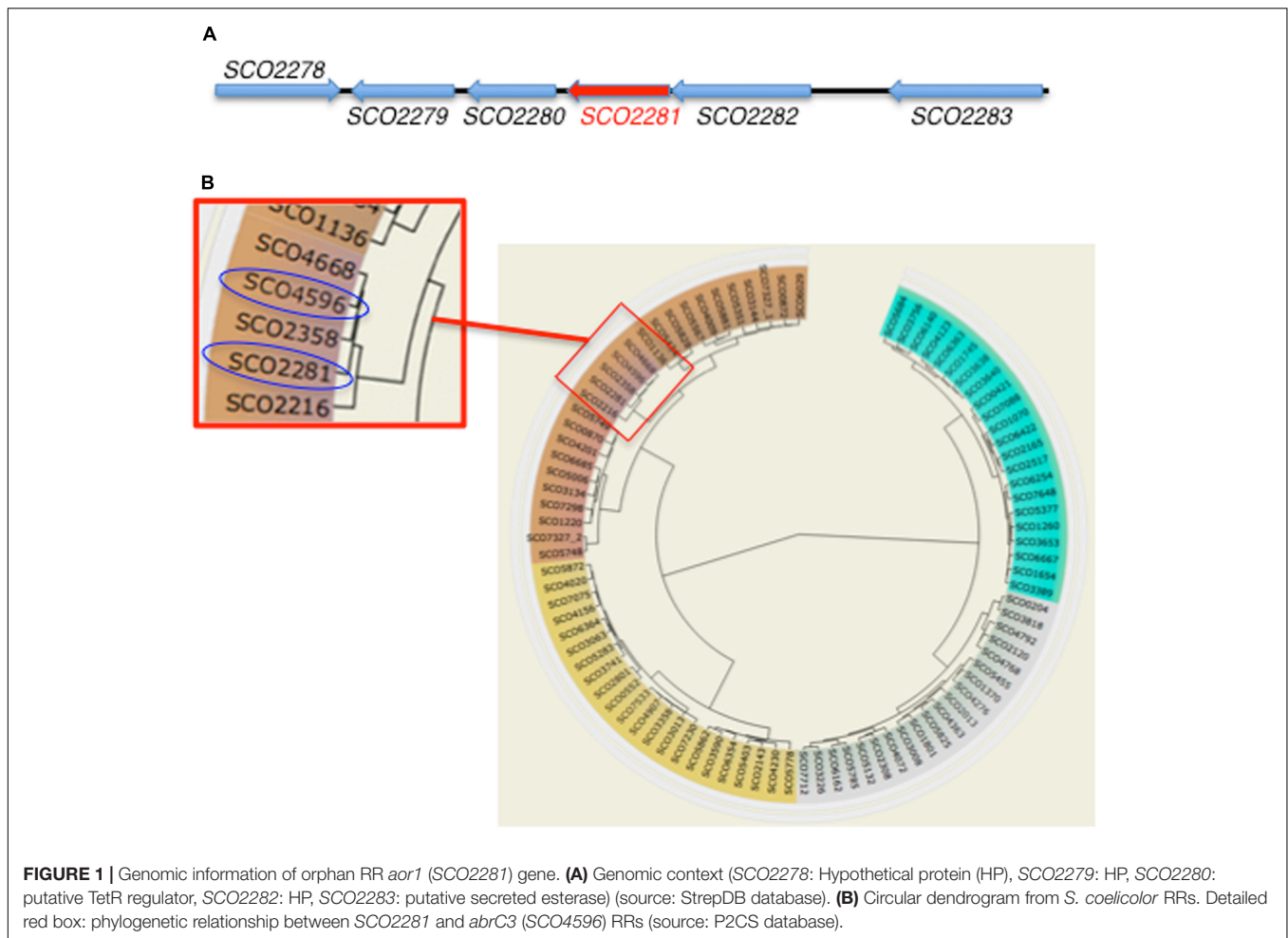
The Gene *aor1* Is Part of a Four-Gene Operon

As shown in Figure 1A, *aor1* is located in the vicinity of three genes; two of them (SCO2279 and SCO2282) have been annotated as hypothetical proteins, while SCO2280 has been annotated as a TetR family transcriptional regulator.

In order to determine if all four genes were co-transcribed and participants of a common regulation, qRT-PCR experiments were carried out to detect transcripts within the intergenic regions between the genes. It was found that the intergenic regions were not large enough to contain promoter regions, except for the region between SCO2279 and SCO2280 and SCO2280 and SCO2281. qRT-PCR experiments using primers designed to these intergenic regions (Supplementary Table S2) were positive and showed the amplification of a transcript in all cases (Figure 3), revealing the existence of a transcript that included all of the genomic region from SCO2279 to SCO2282. This result suggested the existence of an operon with the promoter region located upstream of SCO2282.

Overexpression of *aor1* Does Not Provoke Increased Antibiotic Production

Overexpression of the *aor1* gene was performed under the control of the SCO2282 upstream region, which corresponded to the promoter region of the *aor1* operon. The plasmid pNaor1 was obtained (Material and Methods) and introduced into the M145 wild-type strain. Antibiotic production was compared to the strain transformed with the empty plasmid used as control on LB agar plates and in liquid LB medium. The high copy number plasmid used to overexpress of the *aor1* gene did not provoke an increase in the production of the antibiotic ACT, as would be expected if it were a positive regulator. This result suggests that Aor1 could possibly be exerting negative control over other negative regulator/s, a situation that will be addressed



in the “Discussion” section of this paper (Supplementary Figure S2).

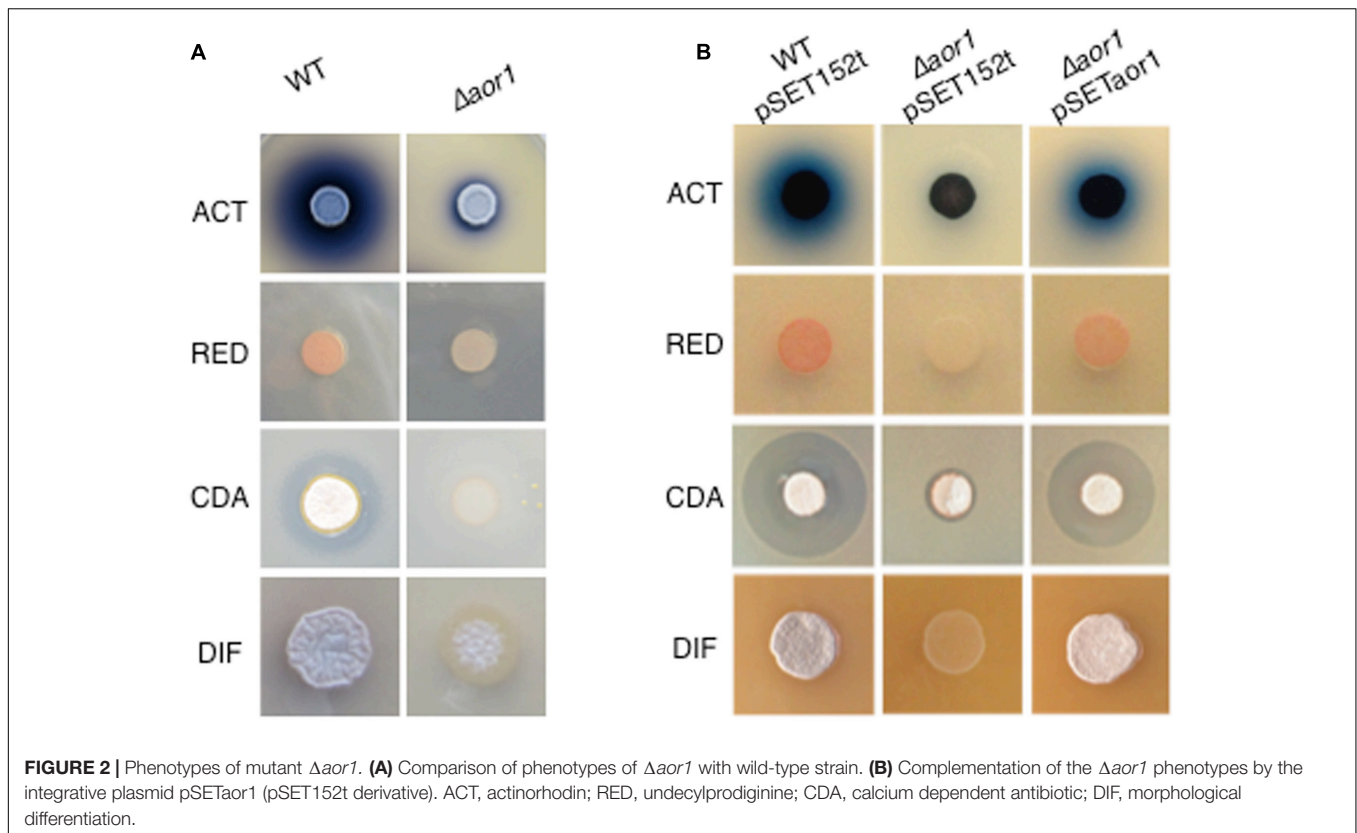
The $\Delta aor1$ Mutant Transcriptomic Profile Compared to Wild Type

To study the role of the Aor1 RR in a gene regulatory cascade in *S. coelicolor*, we compared the transcriptome of *S. coelicolor* M145 with *S. coelicolor* $\Delta aor1$. Stranded RNA-Seq was performed using RNA from samples of each strain, in triplicate, at 36 h (Material and Methods). The principal component analysis (PCA) and the sample distance matrix showed a distinct gene expression signature between M145 and the $\Delta aor1$ mutant strains (Supplementary Figures S3, S4). According to the PCA, the first principal component accounted for 82.5% of the variance, and clearly separated both groups. Moreover, the global analysis of the data showed that the absence of the *aor1* gene provoked a huge impact on the transcriptome (Figure 4 and Supplementary Figures S3, S4).

To facilitate the analysis of the RNA-Seq data, an additional analysis was performed but only on those transcripts whose levels changed at least three-fold in the $\Delta aor1$ mutant compared with the levels in M145. Five hundred and four genes showed

high differential expression (287 down-regulated and 217 up-regulated) between both strains in the conditions studied, with a significant p -value ≤ 0.002 and FDR ≤ 0.01 . A complete list of the genes corresponding to these transcripts can be found in Supplementary Tables S3, S4. These selected differentially expressed genes were categorized into seven general clusters of functional categories, using David Gene Ontology analysis terms as the reference (Huang da et al., 2009a,b), and are listed in Table 1. The relevance of the differentially expressed genes and their correlation with the phenotypic changes observed in the $\Delta aor1$ mutant were analyzed (see below). Several genes were chosen to perform q-RT-PCR and validate the RNA-Seq results (Supplementary Table S5).

In addition, samples were collected in parallel at 36, 48, 62, and 134 hours (h) to quantify antibiotic production in the tested growth conditions. ACT production was significantly detected at 48 h in the wild-type strain M145, and this production increased exponentially at 62 and 134 h. However, the $\Delta aor1$ mutant strain presented very small production even at 62 h, and had a delayed trigger in ACT production at 134 h, yielding slightly lower levels than that of the M145 strain at this time (Figure 5A). Regarding RED production, a high level of this



antibiotic was produced by M145 at the first time point of 36 h, with a maximum of production at 48 h. RED production in the mutant strain was reduced in all of the times analyzed (Figure 5B). Bioassays against *Bacillus subtilis* were used to test the CDA production using the supernatants of 48 h cultures (Material and Methods). There was a small inhibition halo in the M145 strain without calcium that could be due to the production of the other antibiotics (RED and ACT). This halo was much more considerable with plates containing calcium, corresponding to CDA production. In the mutant strain, no inhibition halo was observed in the two conditions used (+Ca and -Ca), indicating that the mutant strain produced less of this antibiotic (Figure 5C).

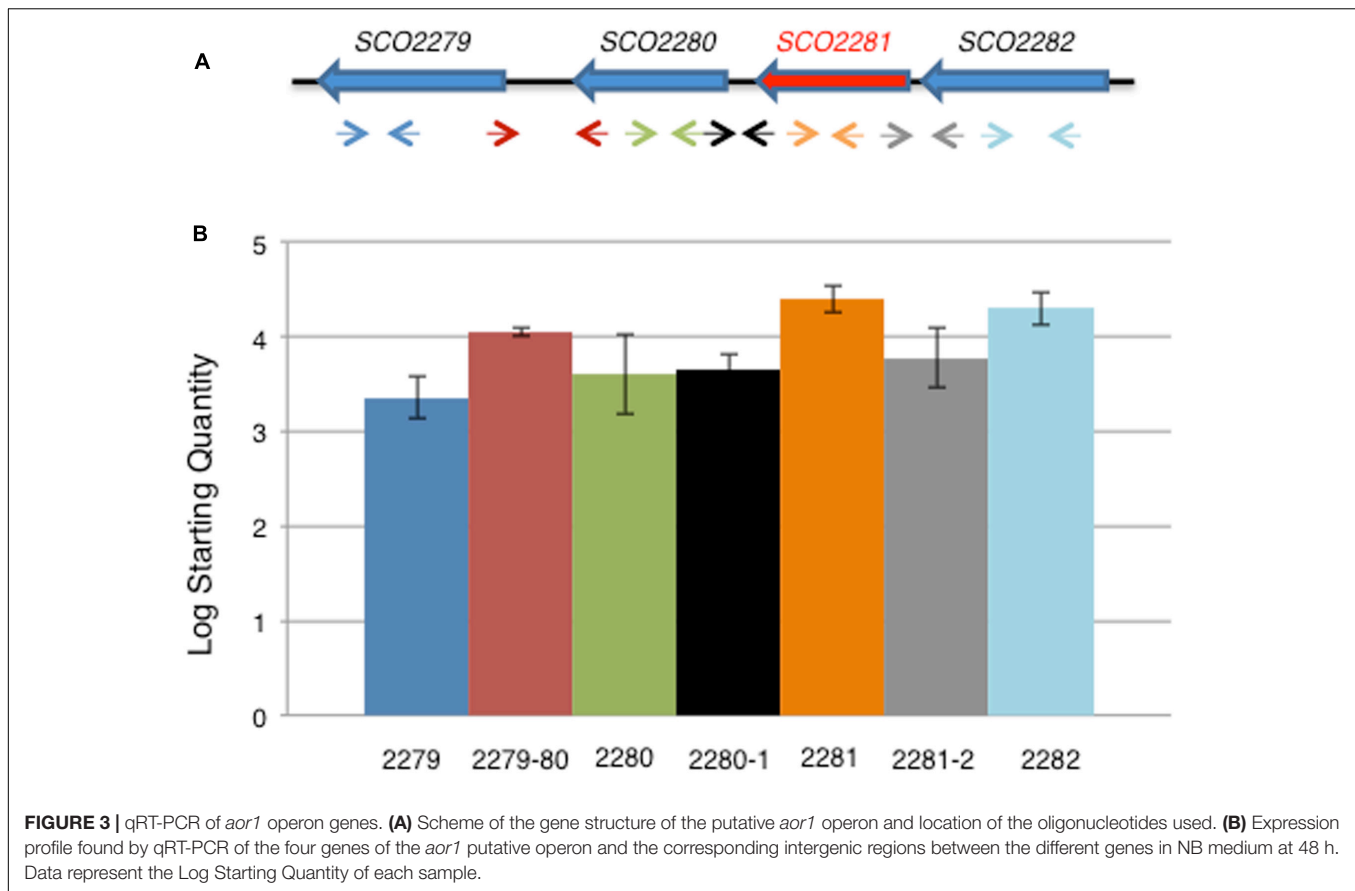
Genes Implied in Secondary Metabolism Affected

The expression of 93 out of the 287 down-regulated genes found in the *S. coelicolor* $\Delta aor1$ mutant strain corresponded to the genes of many clusters encoding secondary metabolites (SM) (32.4%) (Nett et al., 2009). Among these genes, most of the ACT genes clustered together (SCOs5071-5092; Figure 4, coordinates 5514323–5534546; Supplementary Figure S5) and CDA (SCOs3210-3249; Figure 4, coordinates 3519449–3602320; Supplementary Figure S5) were found; a result that is in agreement with the phenotype observed in $\Delta aor1$ strain, including the cluster situated regulators (CSR) genes *actII-ORF4* (SCO5085) and *caaR* (SCO3217), although this latter with a FC of 1,9 (Supplementary Table S3). Also, almost all of the genes within several clusters, whose products were not assayed in this

study, were found to be down-regulated such as a deoxysugar (SCOs0381-0401; Figure 4, coordinates 395939–423596), a CPK (SCOs6273-6288; Figure 4, coordinates 6900898–6907356) and its CSR *cpkO* (SCO6280), some genes within the lantibiotic cluster (SCOs0267-0270), two aromatic polyketides (SCO1266 and SCOs7669-7671) and the butirolactone (SCOs6265-66; Figure 4, coordinates 8493549–8496340). Nevertheless, only 3 genes out of 217 (1.4%) in this functional category of secondary metabolites were found to be up-regulated in the $\Delta aor1$ strain, which were a gene from a bacteriocine cluster (SCO0753) and two genes of the lantibiotic cluster containing the SapB gene (SCOs6682-85; Figure 4, coordinates 7422494–7427004).

Genes Encoding Regulatory Proteins Are Affected

Another group of genes with a high percentage of differential expression between the wild-type and the $\Delta aor1$ mutant strain corresponded to the genes encoding regulatory proteins. As mentioned above, CSRs (SARP proteins coding genes regulating antibiotic production) were down regulated, such as *actII-ORF4*, *caaR*, *cpkO*, and also two CPK regulatory proteins (SCO6285 and SCO6288). This was also the case of ScbR (SCO6265), AtrA (SCO4118), Aba-like (SCO4214), 2 sigma factors including SigU, (SCO2954) and 2 putative sigma factors, 6 genes from different regulatory families (LysR, LacI, GntR and TetR) and 11 TCS genes (including one orphan RR and, two orphan HKs) (Table 1). A total of 27 genes of regulatory proteins had a significantly reduced level of expression in the mutant



strain (more than 3-fold), corresponding to 19.4% of the down-regulated genes.

On the other hand, 22 genes of this functional category were up-regulated (10.1%), and of these 7 were sigma or anti-sigma factors. These up-regulated genes included the SigB encoding gene (*SCO0600*), its reported regulatory network that is triggered by osmotic or heat shock (SigL, SigM, SigH, SigK), and the anti-anti-SigB RsbV (*SCO7325*) (Supplementary Figure S5 and Supplementary Table S4) (Lee et al., 2004a; Facey et al., 2011), whose relevance in the $\Delta aor1$ mutant will be discussed below.

Genes Related to Osmotic/Heat Protection Differentially Expressed

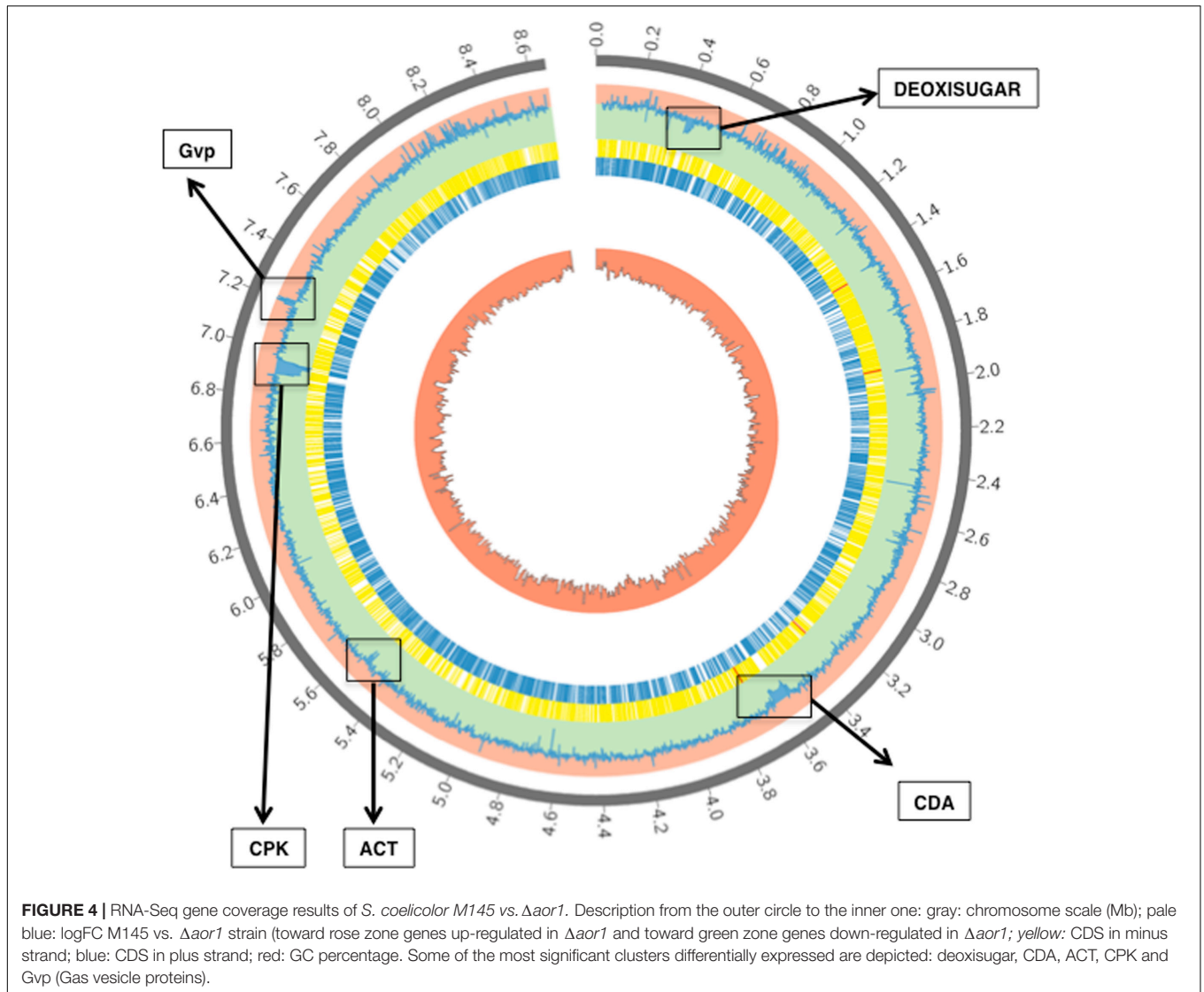
Moreover, in addition to the regulatory genes mentioned above, many other genes regulated by SigB (Lee et al., 2004b) were also over-expressed in the $\Delta aor1$ mutant compared to the wild-type. These included: *catB* (*SCO0666*) (Cho et al., 2000), coding for a catalase that was 11.4-fold up-regulated; *trxC*, coding for a thioredoxin C (4.7-fold); *ssgC* (*SCO7289*) implied in differentiation (8.4-fold); 12 genes of an operon for gas vesicles proteins (GV) (*SCO6496-6508*; **Figure 4**, coordinates 7189075-7199188), whose promoter is regulated by SigB and were more than 5-fold up-regulated (Supplementary Table S4); and another 15 genes, some of them with an unknown function.

Other genes not dependent on SigB and related to osmotic protection were also up-regulated, such as a putative osmoprotectant transporter (*SCO1225*), the bacterioferritine gene (*SCO2113*), and *SCO2641* a putative resistance protein implied in detoxification⁵).

Membrane and Transport Proteins Differentially Expressed

Those genes that encoded membrane proteins among the differentially expressed genes (92 genes, 51 down- and 41 up-regulated, 17.8 and 18.9 % respectively) were also overrepresented. These genes included 33 members of different superfamilies of transporter proteins (20 down- and 13 up-regulated), such as the ABC (ATP-binding Cassette), MFS (Major Facilitator Superfamily), and RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) protein superfamilies, among others. Four of the down-regulated putative membrane proteins formed part of the regulon reported for SigU (also down-regulated as mentioned previously), as was the case for 3 putative secreted proteins found to be down-regulated (Gordon et al., 2008). In fact, 24 genes of the secreted proteins were also found to be differentially expressed; 18 genes were down-regulated and 8 up-regulated (6.3 and 3.7 %, respectively).

⁵http://dbkgroup.org/s_coeli/referencegel/proteinDetails.php?proteinId=SCO2641



DISCUSSION

Due to the increasing number of antibiotic resistant bacteria it is important to revitalize the discovery of new antibiotics (Demain, 2014). In addition, the study of the regulatory networks that control their biosynthesis is also a key goal. In this work, we report the importance of the orphan RR Aor1, which could be considered a positive regulator of antibiotic production and morphological differentiation based on the observed phenotypes of the null mutant (Figures 2, 5 and Supplementary Figure S1), although part of its action seems to be done through the inactivation of some inhibitors, as discussed below.

The RNA-Seq data have provided a revealing look at the differences between the transcriptomes of *S. coelicolor* M145 and $\Delta aor1$, showing that Aor1 is a global regulator that acts in a very high level of the complex regulatory network. In the *S. coelicolor* $\Delta aor1$ strain, deletion of the *aor1* gene led to significant changes in the global transcriptional landscape, with

a three-fold differential expression of 504 genes (287 down-regulated and 217 up-regulated) as compared to the wild-type strain.

In the RNA-Seq data analysis it was found that Aor1 was necessary for triggering the expression of many of the genes encoding the 30 putative secondary metabolites of *S. coelicolor* (Nett et al., 2009). In fact, in addition to the 93 genes down-regulated (32.4%) in $\Delta aor1$, as described in the Results section, many other genes in this functional category were down-regulated in the $\Delta aor1$ mutant, with a significant FDR and *p*-value. However, the differences with respect to the wild-type were less than three-fold (as in the case of *cdaR*). For example, 6 out of 22 genes of the RED cluster (*SCOs5877-5898*) and 4 genes of the eicosapentanoic acid cluster (*SCOs0124-0127*) were found with a FC > 1.7. In contrast, the genes included in the 5-hydroxiectoin cluster (*SCOs1864-1867*) were up-regulated (FC > 1.69) (Supplementary Tables S3, S4). As shown in Figure 5, RED production was triggered before 36 h, indicating that the

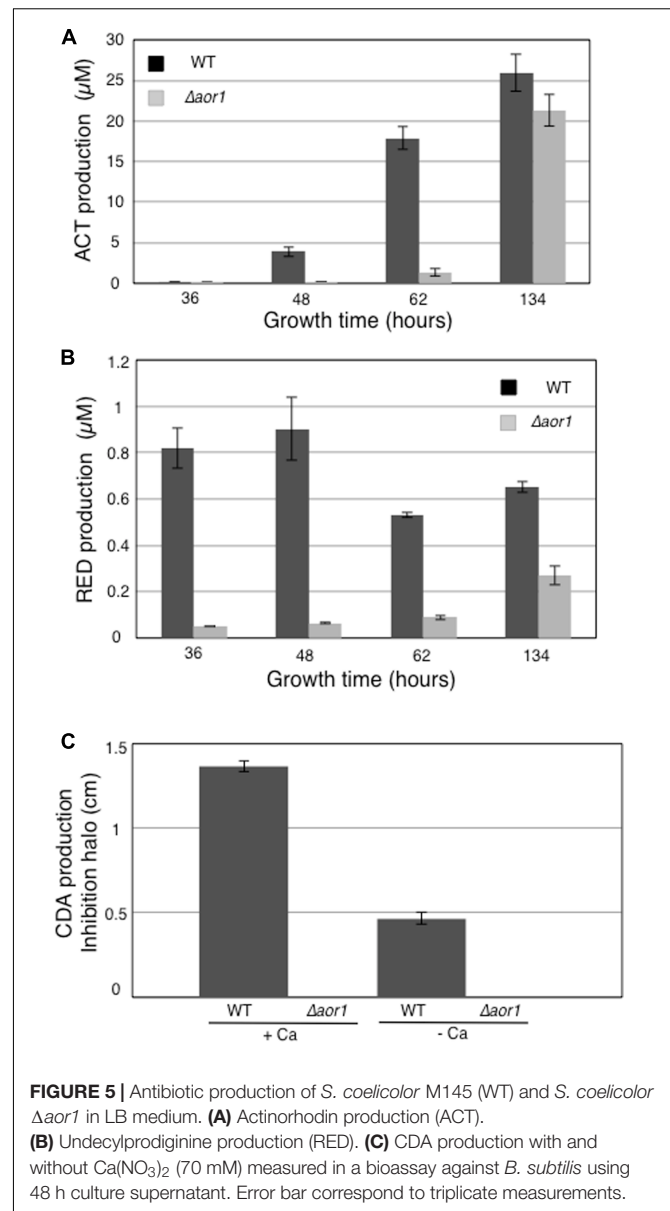
TABLE 1 | Differentially expressed genes (RNA-Seq): Functional categories of transcripts whose levels changed at least 3-fold in *S. coelicolor* $\Delta aor1$ compared with those of M145 (p -value ≤ 0.002 and FDR ≤ 0.01).

Functional category	Number of genes whose transcripts levels:	
	Decreased	Increased
<i>Secondary metabolites (SM)</i>	93 (32.4%)	3 (1.4%)
Lantibiotic cluster	2	–
Deoxysugar	21	–
Aromatic polyketide	1	–
CDA cluster	33	–
ACT cluster	17	–
Butirolacton	1	–
CPK cluster	16	–
Aromatic polyketide	2	–
Lantibiotic Sap B	–	2
Bacteriocin	–	1
<i>Regulatory proteins (RP)</i>	27 (9.4%)	22 (10.1%)
TCSs genes	11	3
Sigma and anti-sigma factors	4	7
Others	12	12
<i>Gas vesicle proteins (GV)</i>	1 (0.3%)	12 (5.5%)
<i>Membrane proteins (MB)</i>	51 (17.8%)	41 (18.9%)
ABC transporter family	10	6
Other transporter families	10	7
Putative	31	28
<i>Secreted proteins (S)</i>	18 (6.3%)	8 (3.7%)
<i>Others (O)</i>	30 (10.8%)	61 (28.1%)
<i>Hypothetical proteins (HP)</i>	67 (23.3%)	70 (32.7%)
Total	287	217

biosynthetic genes were produced before this time. Additionally, this result helps to explain why the differential expression of these genes observed at 36 h was not as significant as the one observed for ACT or CDA.

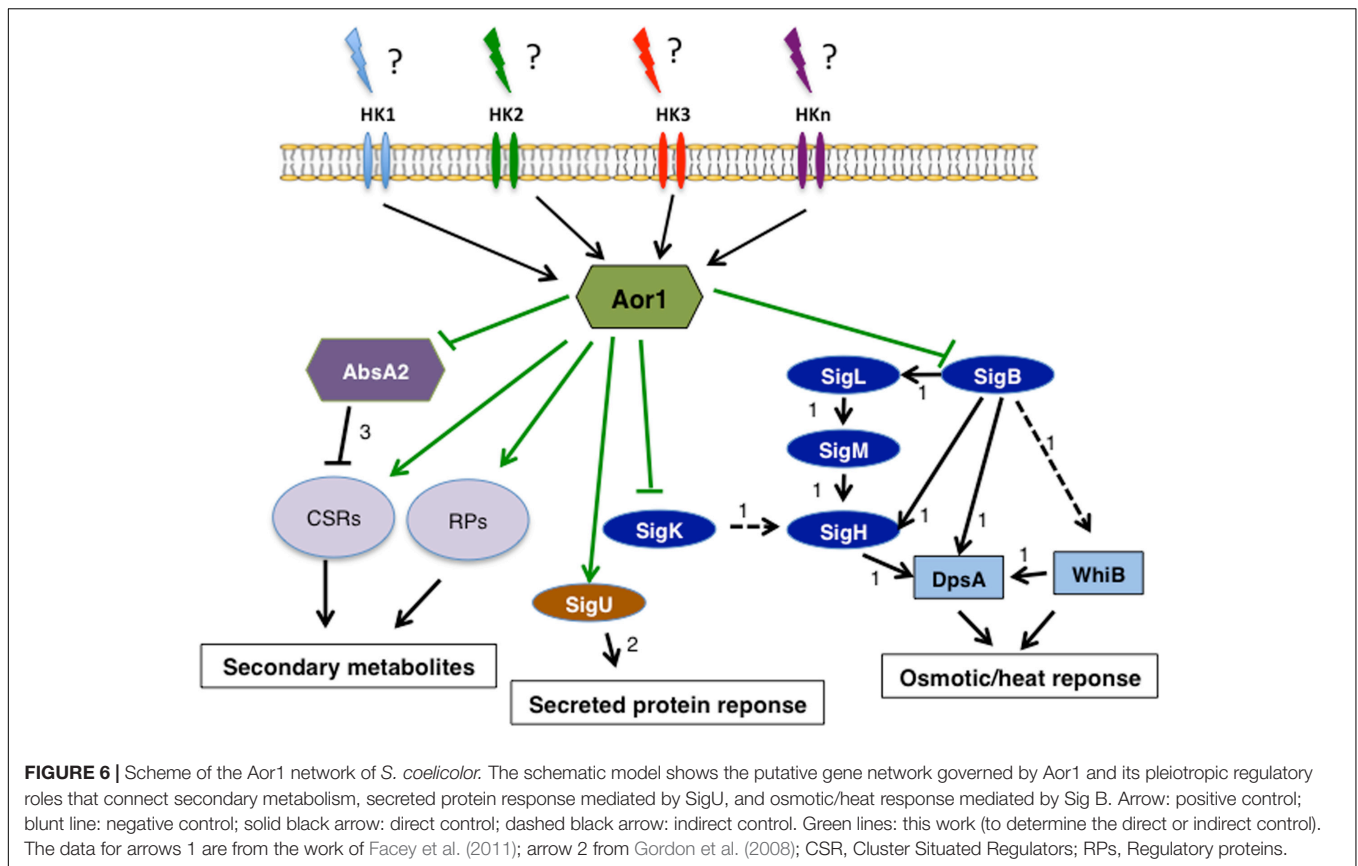
The onset of some of these secondary metabolites by Aor1 seems to be mediated by the activation of other regulatory proteins that have been previously reported to control antibiotic production (all of them down regulated in the $\Delta aor1$) such as the antibiotic CSRs, ActII-ORF4, CdaR and, CpkO, the γ -butirolactone (ScbA) and its regulator (ScbR), AbaA-like and, AtrA (Liu et al., 2013). Other regulatory genes were also down- or up-regulated, including global regulators like TCSs that have not been characterized yet. It is also worth mentioning that in the CDA cluster (SCO3210-3279), only the RR gene AbsA2 (SCO3226) was up-regulated (with a FC = 1.8) (Supplementary Table S4). Therefore, the regulation of some of the CSRs by Aor1 might be partly due to a negative regulation of AbsA2, which has been reported to be a negative global regulator (Sheeler et al., 2005). This could explain why deletion of the *aor1* gene had such strong phenotypic effects and that a drastic increment in antibiotic production was not observed with a high copy number plasmid expression harboring *aor1*.

On the other hand, the regulatory network and targets that respond to osmotic stress and heat shock mediated by the master sigma factor SigB, such as SigL, SigM, SigH, SigK, CatB, TrxC,



SsgC and a whole gas vesicle (GV) operon (Lee et al., 2004b, 2005; Facey et al., 2011), were found up-regulated in the *S. coelicolor* $\Delta aor1$ mutant strain. The genes encoding WhiB (SCO3034) (indirect target of SigB) and DpsA (SCO0596) (direct target of SigH and SigB) were also differentially expressed and were up-regulated by 2.68-fold and 2.6-fold, respectively.

One hypothesis, that needs to be addressed in the future, is if Aor1 may be modulating the osmotic stress response and antibiotic production of the cell, integrating different external signals through HKs (Figure 6). The *aor1* deletion triggered the cellular responses mediated by SigB regulon in order to protect the cell against osmotic stress as reported for the GV operon (van Keulen et al., 2005), *trx*C and *cat*B. Thus, Aor1 could be acting as a negative regulator of *sig*B. Several osmotic stress related responses, not yet



described as being dependent on SigB, have also been found to be up-regulated, such as the already mentioned putative osmoprotectant transporter of proline/betaine from the MFS (*SCO1225*)⁶ and 5-hydroxyectoin compatible solute⁷ overexpression (with a FC > 1.7) (Eilert et al., 2013; Sadeghi et al., 2014a,b). At the same time, a general decrease in secondary metabolite production in the $\Delta aor1$ mutant could take place, as explained above. These results are in accordance with the inverse correlation between osmotic stress response and antibiotic production reported previously in *Streptomyces avermitilis* (Godínez et al., 2015). A precocious overproduction of ACT has also been reported in several *S. coelicolor sigB* mutant strains, reinforcing this correlation (Cho et al., 2001; Fernández Martínez et al., 2009). Moreover, as part of the stress response provoked by the absence of Aor1, the transport functions of the mutant cells seemed to be altered, owing to the high number of transporter proteins that were found affected, as the mentioned above *SCO1225*. In addition, when mutant cells sense osmotic stress they need to control their secretion in order to maintain high intracellular osmolarity. Similarly, it has also been reported that the extracytoplasmic function sigma factor (ECF) SigU elicits secretion and increases protease activity. In the $\Delta aor1$ mutant, the secreted and membrane proteins whose expression is triggered by SigU are

down-regulated, and the protease inhibitor Sti1 (*SCO0762*) is 2.5-fold up-regulated. These results are in line with this working model (Supplementary Table S4) (Gordon et al., 2008).

Since Aor1 is an orphan RR, this opens up the possibility for it to be phosphorylated by different HKs (Whitworth and Cock, 2009) allowing Aor1 to respond to many environmental cues that might exert a strict control on the osmotic stress response mediated by SigB and correct secondary metabolite production. Clarifying the function of Aor1 and situating it in a concrete point of the *S. coelicolor* complex regulatory network is a difficult task, as is demonstrated by the few regulators with known stimuli found in *Streptomyces* (Rodríguez et al., 2013). This task acquires an additional difficulty level in the case of orphan regulators. Relation between an orphan regulator and an HK has rarely been demonstrated previously, but combination of BLASTP search and trans-phosphorylation may serve to elucidate the role of Aor1 in the future (Wang et al., 2009). Several HKs have been reported as probable partners of Aor1 such as the above-mentioned *AbrC1*, *AbrC2* (Rodríguez et al., 2015), *SCO3750*, *SCO6424*, and *SCO0211*. The phenotypes observed in $\Delta aor1$ were more drastic than those reported for $\Delta abrC$, reinforcing the idea that more than one HK might be controlling the activity of this orphan regulator. As mentioned before, *Streptomyces* has a high number of TCSs due to its complex lifestyle and genome size, and several TCSs have been found down-regulated in $\Delta aor1$, which also suggests a transcriptional

⁶http://www.membranetransport.org/other_type.php?fType=Secondary+Transporter&OID=scoe1

cross-regulation exerted by Aor1 on these signal transduction systems. As Zhou et al. stated, key features of *Streptomyces*, such as gene regulation, stress response, secondary metabolism, and morphological differentiation, are not stand-alone properties but are related to each other (Zhou et al., 2011). Aor1 may be establishing a connection that integrates some of these pathways in a high level of the regulatory network. Other TCSs as OsdK/R (SCO0203/0204), (Urem et al., 2016) and OsaA/B (SCOs5748/5749) have also been reported to respond to oxygen and osmotic stress responses, respectively (Godinez et al., 2015).

CONCLUSION

It has been demonstrated using transcriptome profiling that the *aor1* deletion results in a highly altered transcription pattern compared to that of the parental strain. Thus, these results highlight that Aor1 plays a role in the regulation of genes related to osmotic stress and secondary metabolite production in *S. coelicolor*. Nevertheless, these data include changes that are both direct and indirect results of the effects of the orphan RR Aor1 on gene expression. Further experiments, such as a ChIP-Seq, must be carried out in the future to determine the direct targets of this RR. Another challenge is finding the corresponding cognate HKs, which to date has proven to be a difficult task.

REFERENCES

- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147. doi: 10.1038/417141a
- Braña, A. F., Fiedler, H. P., Nava, H., González, V., Sarmiento-Vizcaíno, A., Molina, A., et al. (2015). Two streptomyces species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central cantabrian sea. *Microb. Ecol.* 69, 512–524. doi: 10.1007/s00248-014-0508-0
- Capra, E. J., Perchuk, B. S., Ashenberg, O., Seid, C. A., Snow, H. R., Skerker, J. M., et al. (2012). Spatial tethering of kinases to their substrates relaxes evolutionary constraints on specificity. *Mol. Microbiol.* 86, 1393–1403. doi: 10.1111/mmi.12064
- Capra, E. J., Perchuk, B. S., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Skerker, J. M., and Laub, M. T. (2010). Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet.* 6:e1001220. doi: 10.1371/journal.pgen.1001220
- Chankhamhaengdecha, S., Hongvijit, S., Srichaisupakit, A., Charnchai, P., and Panbangred, W. (2013). Endophytic actinomycetes: a novel source of potential acyl homoserine lactone degrading enzymes. *Biomed. Res. Int.* 2013:782847. doi: 10.1155/2013/782847
- Chaudhary, A. K., Dhakal, D., and Sohng, J. K. (2013). An insight into the “-omics” based engineering of Streptomycetes for secondary metabolite overproduction. *Biomed. Res. Int.* 2013:968518. doi: 10.1155/2013/968518
- Cho, Y. H., Lee, E. J., Ahn, B. E., and Roe, J. H. (2001). SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 42, 205–214. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02622.x
- Cho, Y. H., Lee, E. J., and Roe, J. H. (2000). A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 35, 150–160. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01685.x

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SA, SR, HR, LS, and RS conducted the experiment(s). SA, JA, and MD analyzed the results. SA, RS, and MD conceived the experiment(s) and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

Our laboratory is funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) [PCIN-2014-067 and BIO2015-66958-R]. SA has been supported by a Junta de Castilla y León fellowship (grant CSI099A12-1).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Ana María Martínez-Carrasco and Itziar Martín Ruíz for their technical skills and to Emma Keck for her help with the English language editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02444/full#supplementary-material>

- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 185–201. doi: 10.1007/s10295-013-1325-z
- Diminic, J., Starcevic, A., Lisfi, M., Baranasic, D., Gacesa, R., Hranueli, D., et al. (2014). Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 211–217. doi: 10.1007/s10295-013-1337-8
- Eilert, E., Kranz, A., Hollenberg, C. P., Piontek, M., and Suckow, M. (2013). Synthesis and release of the bacterial compatible solute 5-hydroxyectoine in *Hansenula polymorpha*. *J. Biotechnol.* 167, 85–93. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.02.005
- Facey, P. D., Sevcikova, B., Novakova, R., Hitchings, M. D., Crack, J. C., Kormanec, J., et al. (2011). The *dpsA* gene of *Streptomyces coelicolor*: induction of expression from a single promoter in response to environmental stress or during development. *PLoS ONE* 6:e25593. doi: 10.1371/journal.pone.0025593
- Fernández, E., Weissbach, U., Sánchez Reillo, C., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., et al. (1998). Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* 180, 4929–4937.
- Fernández Martínez, L., Bishop, A., Parkes, L., Del Sol, R., Salerno, P., Sevcikova, B., et al. (2009). Osmoregulation in *Streptomyces coelicolor*: modulation of SigB activity by OsaC. *Mol. Microbiol.* 71, 1250–1262. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06599.x
- Godinez, O., Dyson, P., del Sol, R., Barrios-Gonzalez, J., Millán-Pacheco, C., and Mejía, A. (2015). Targeting the osmotic stress response for strain improvement of an industrial producer of secondary metabolites. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1787–1795. doi: 10.4014/jmb.1503.03042
- Gordon, N. D., Ottaviano, G. L., Connell, S. E., Tobkin, G. V., Son, C. H., Shterental, S., et al. (2008). Secreted-protein response to sigmaU activity in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 190, 894–904. doi: 10.1128/JB.01759-07

- Green, M. R., and Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1541–1546. doi: 10.1073/pnas.0337542100
- Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., et al. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation.
- Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923
- Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., and Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 118–124. doi: 10.1016/j.mib.2011.11.009
- Kieser, T., Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., and Buttner, M. J. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Lee, E. J., Cho, Y. H., Kim, H. S., Ahn, B. E., and Roe, J. H. (2004a). Regulation of sigmaB by an anti- and an anti-anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress. *J. Bacteriol.* 186, 8490–8498. doi: 10.1128/JB.186.24.8490-8498.2004
- Lee, E. J., Cho, Y. H., Kim, H. S., and Roe, J. H. (2004b). Identification of sigmaB-dependent promoters using consensus-directed search of *Streptomyces coelicolor* genome. *J. Microbiol.* 42, 147–151.
- Lee, E. J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H. S., Park, J. H., Cha, C. J., Kao, C. M., et al. (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 57, 1252–1264. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04761.x
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., and Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 112–143. doi: 10.1128/MMBR.00054-12
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., and MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61–68. doi: 10.1016/0378-1119(92)90603-M
- Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1362–1384. doi: 10.1039/b817069j
- Podgornaia, A. I., and Laub, M. T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 156–162. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.004
- Rico, S., Santamaría, R. I., Yepes, A., Rodríguez, H., Laing, E., Bucca, G., et al. (2014a). Deciphering the regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2417–2428. doi: 10.1128/AEM.03378-13
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Santamaría, R. I. (2013). Two-component systems in Streptomyces: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb. Cell Fact.* 12:127. doi: 10.1186/1475-2859-12-127
- Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Santamaría, R. I., et al. (2015). The two kinases, AbrC1 and AbrC2, of the atypical two-component system AbrC are needed to regulate antibiotic production and differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Front. Microbiol.* 6:450. doi: 10.3389/fmicb.2015.00450
- Rowland, M. A., and Deeds, E. J. (2014). Crosstalk and the evolution of specificity in two-component signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 5550–5555. doi: 10.1073/pnas.1317178111
- Sadeghi, A., Soltani, B. M., Jouzani, G. S., Karimi, E., Nekouei, M. K., and Sadeghizadeh, M. (2014a). Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on Ion expression level. *Microbiol. Res.* 169, 232–238. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.010
- Sadeghi, A., Soltani, B. M., Nekouei, M. K., Jouzani, G. S., Mirzaei, H. H., and Sadeghizadeh, M. (2014b). Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. *Microbiol. Res.* 169, 699–708. doi: 10.1016/j.micres.2014.02.005
- Salazar, M. E., and Laub, M. T. (2015). Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 7–14. doi: 10.1016/j.mib.2014.12.003
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaller, G. E., Shiu, S. H., and Armitage, J. P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr. Biol.* 21, R320–R330. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.045
- Sheeler, N. L., MacMillan, S. V., and Nodwell, J. R. (2005). Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 187, 687–696. doi: 10.1128/JB.187.2.687-696.2005
- Urem, M., van Rossum, T., Bucca, G., Moolenaar, G. F., Laing, E., Swiatek-Polatynska, M. A., et al. (2016). OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons. *mSystems* 1:e00014–16. doi: 10.1128/mSystems.00014-16
- van Keulen, G., Hopwood, D. A., Dijkhuizen, L., and Sawers, R. G. (2005). Gas vesicles in actinomycetes: old buoys in novel habitats? *Trends Microbiol.* 13, 350–354. doi: 10.1016/j.tim.2005.06.006
- Vetsigian, K., Jajoo, R., and Kishony, R. (2011). Structure and evolution of Streptomyces interaction networks in soil and in silico. *PLOS Biol.* 9:e1001184. doi: 10.1371/journal.pbio.1001184
- Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W., and Lu, Y. (2009). Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 150–156. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01563.x
- Whitworth, D. E., and Cock, P. J. (2009). Evolution of prokaryotic two-component systems: insights from comparative genomics. *Amino Acids* 37, 459–466. doi: 10.1007/s00726-009-0259-2
- Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R. I., and Díaz, M. (2011). Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *PLOS ONE* 6:e19980. doi: 10.1371/journal.pone.0019980
- Zhou, Z., Gu, J., Du, Y. L., Li, Y. Q., and Wang, Y. (2011). The -omics Era- toward a systems-level understanding of *Streptomyces*. *Curr. Genomics* 12, 404–416. doi: 10.2174/138920211797248556

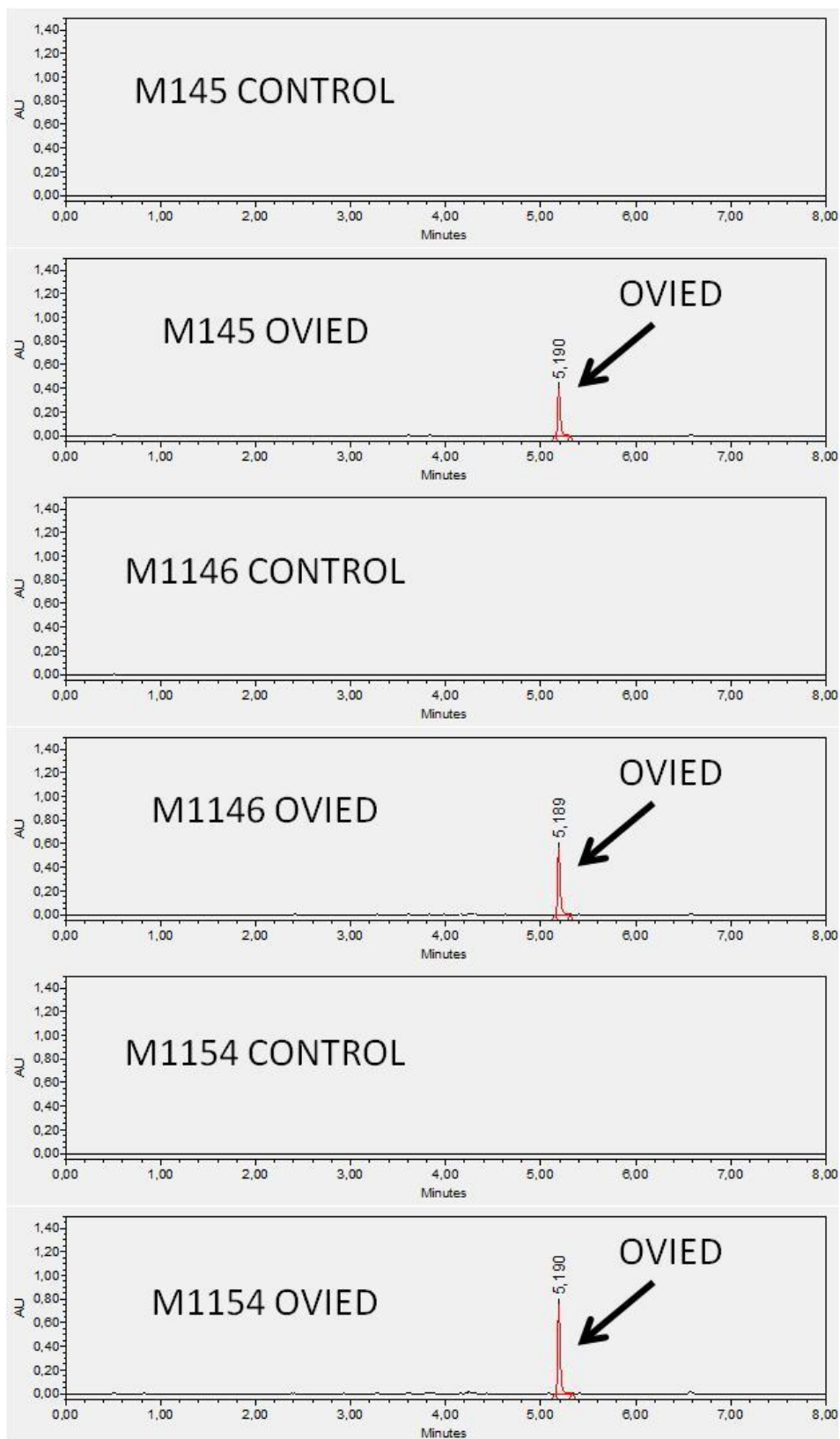
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Antoraz, Rico, Rodríguez, Sevillano, Alzate, Santamaría and Díaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

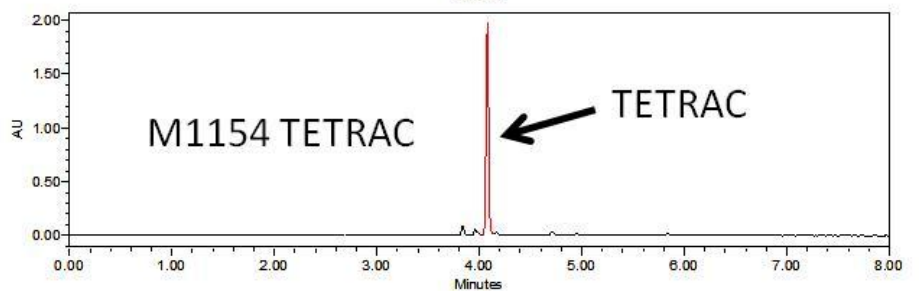
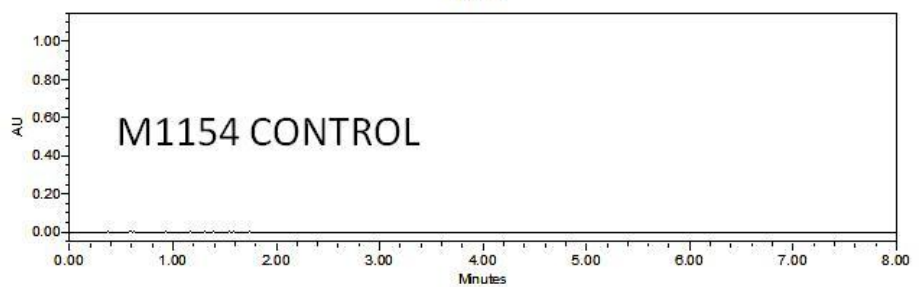
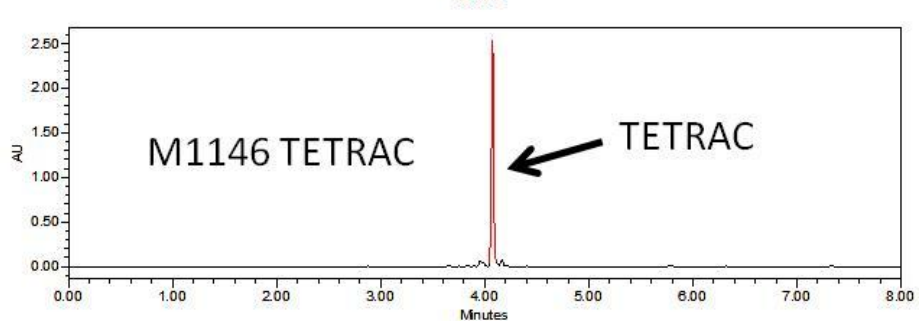
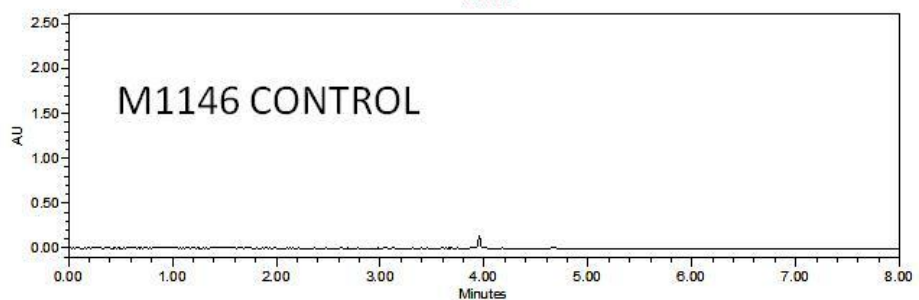
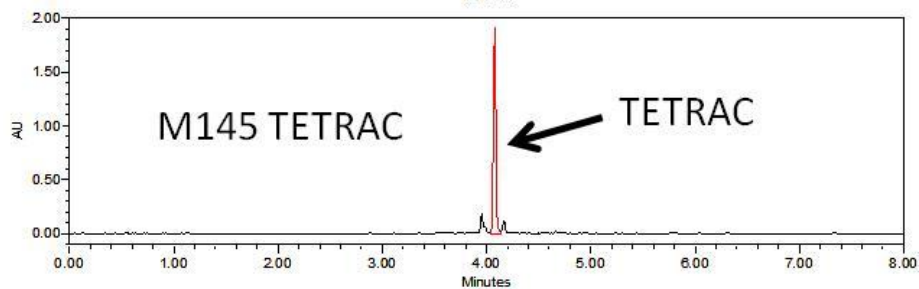
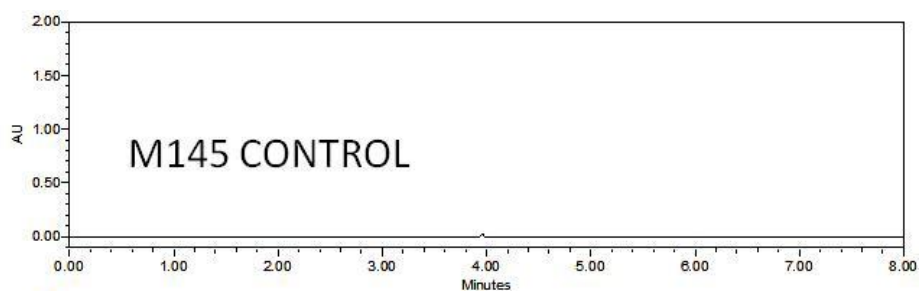
ANEXO I

Cromatogramas de UPLC

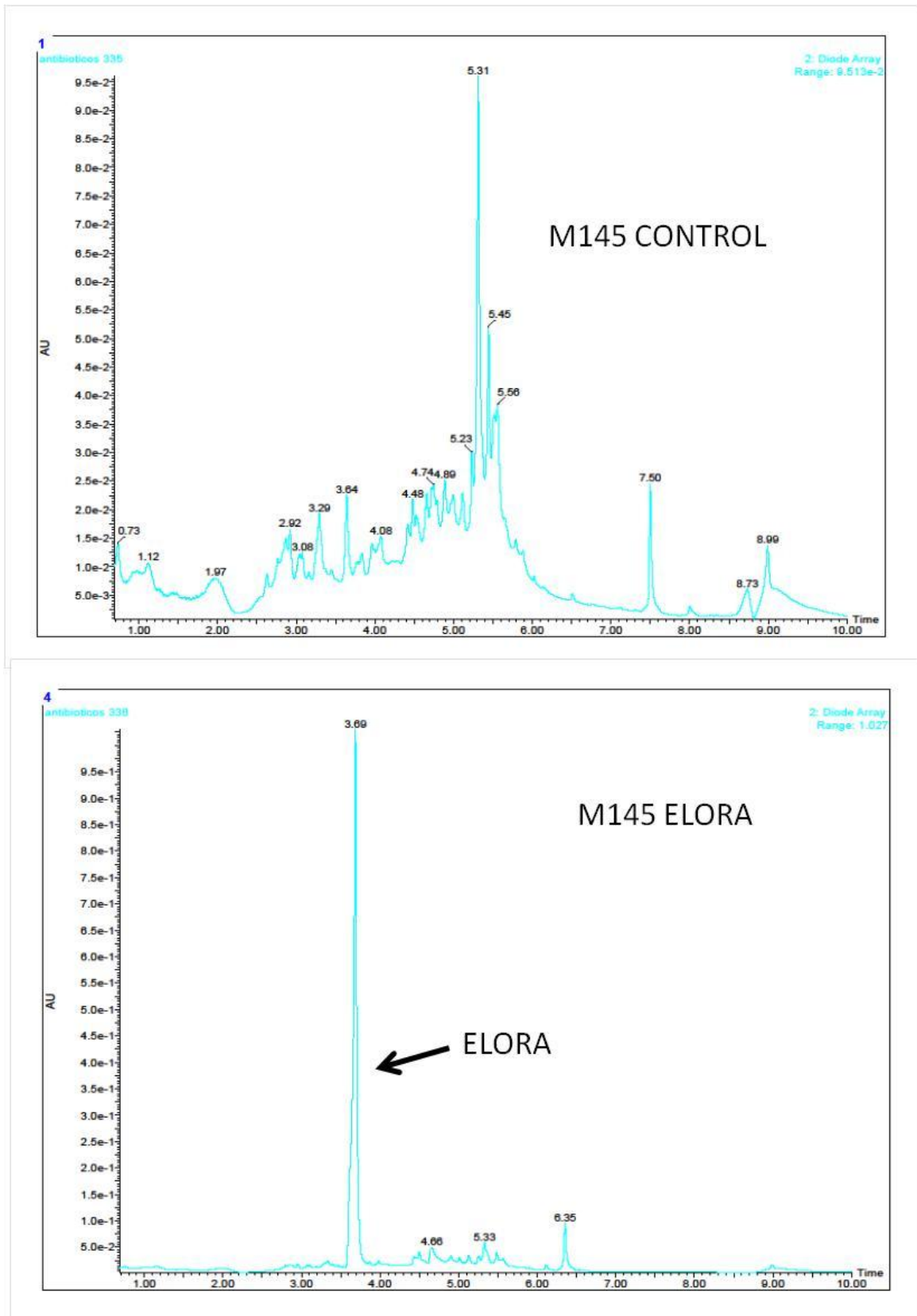
1. Ovidomicina: Medio NMMP, 4 días de crecimiento. Resultados 1.2, página 54.

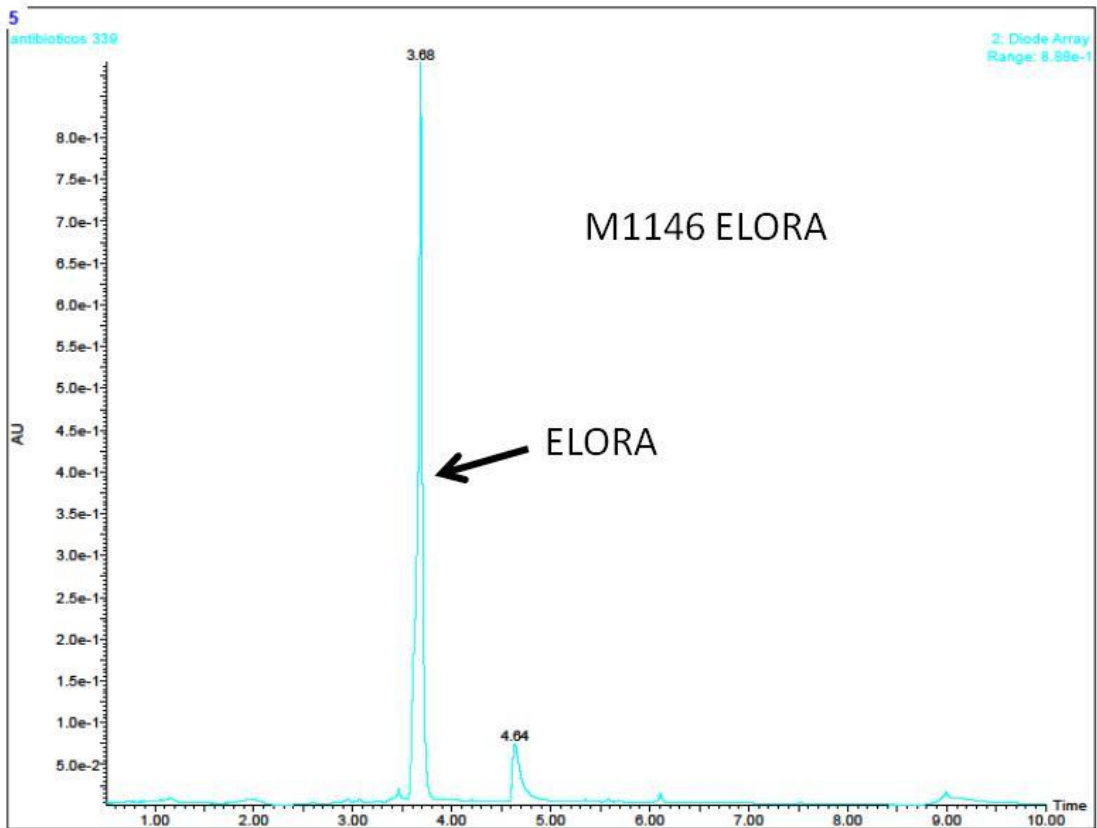
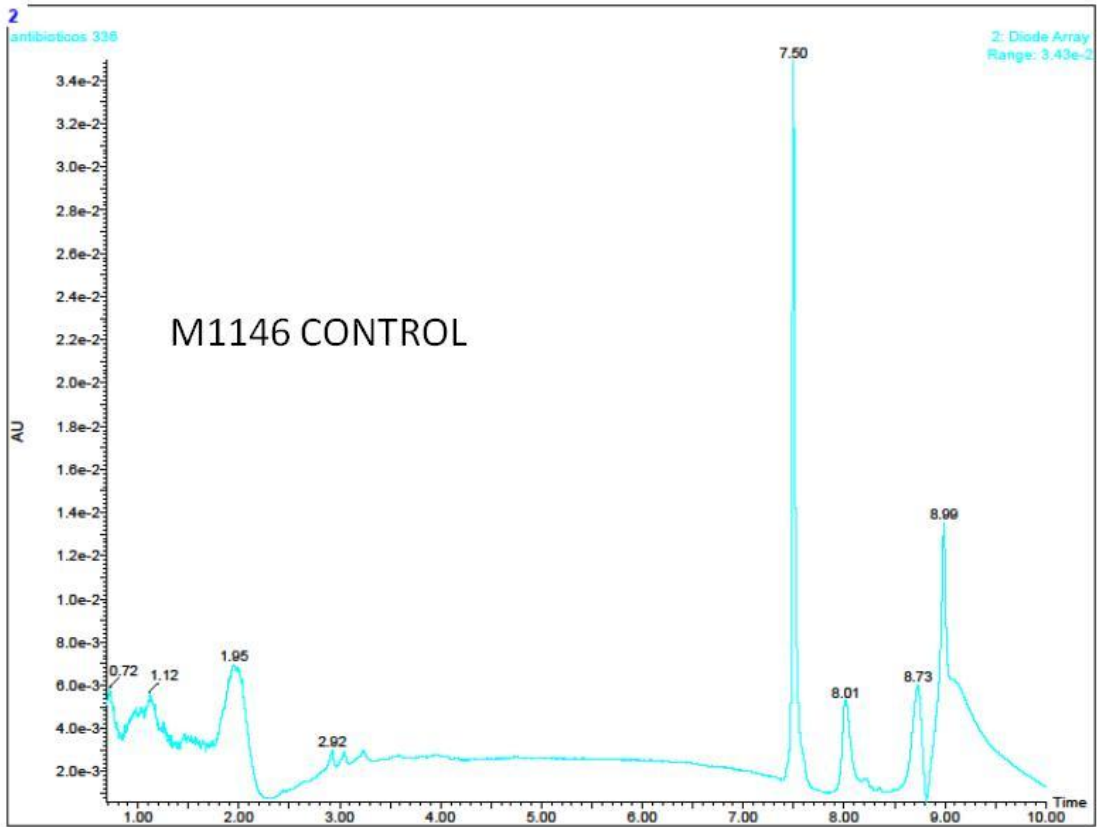


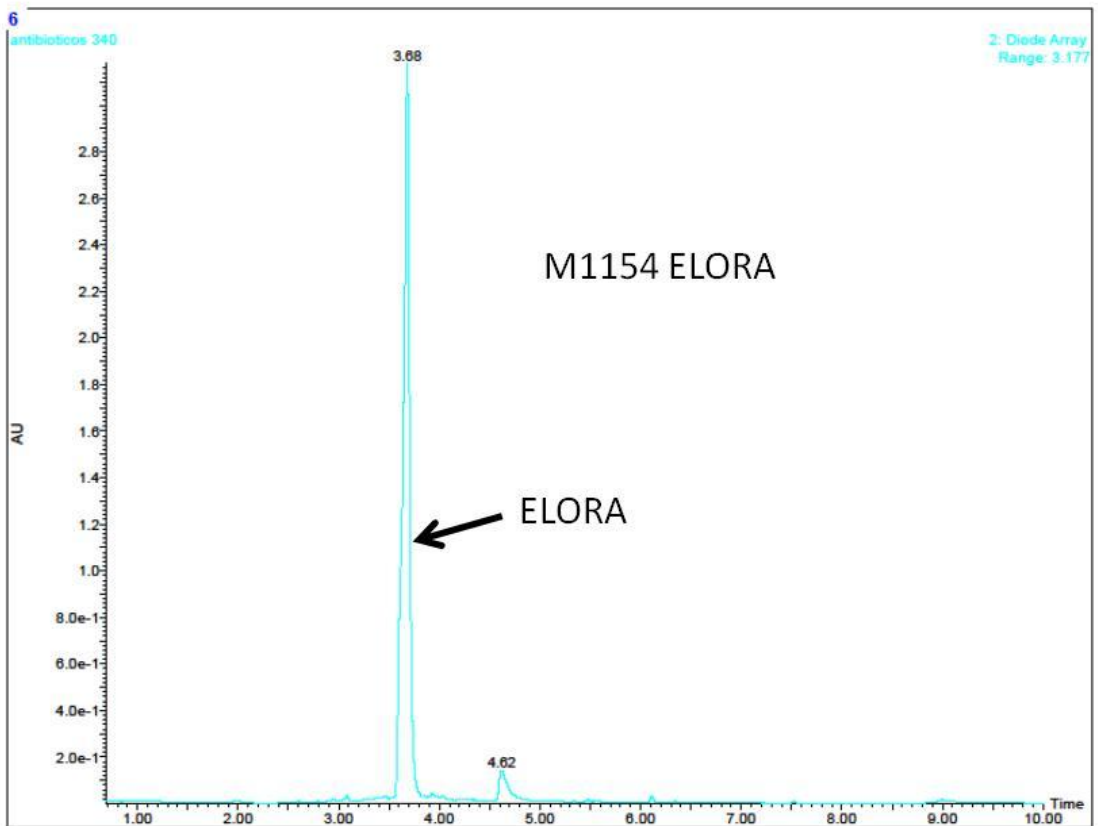
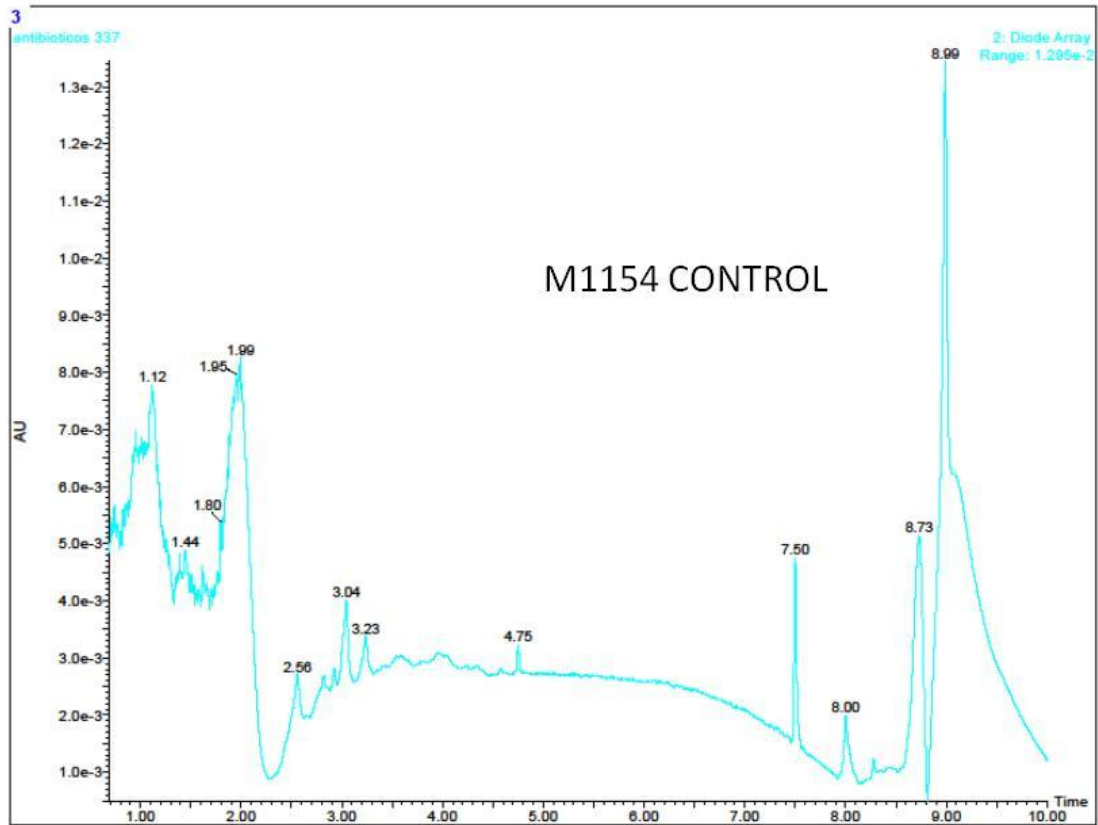
2. Tetracenomicina C: Medio YEPD, 4 días de crecimiento. Resultados 1.2, página 54.



3. Eloramycin: Medio R5A, 3 días de crecimiento. Resultados 1.2, página 55.

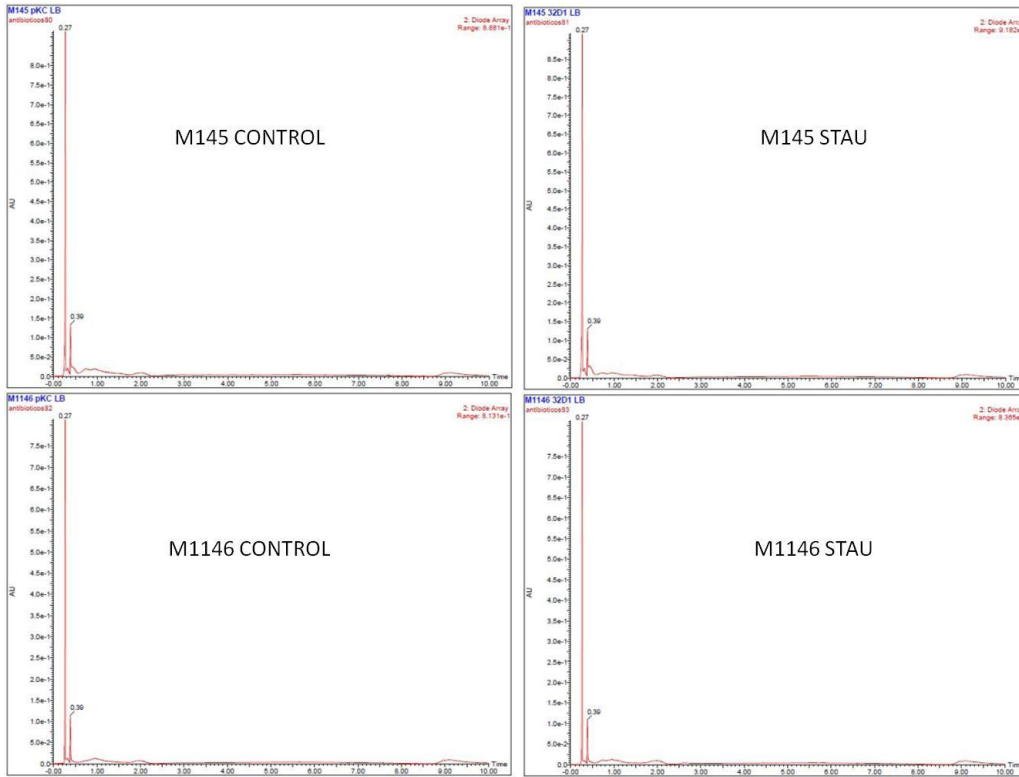




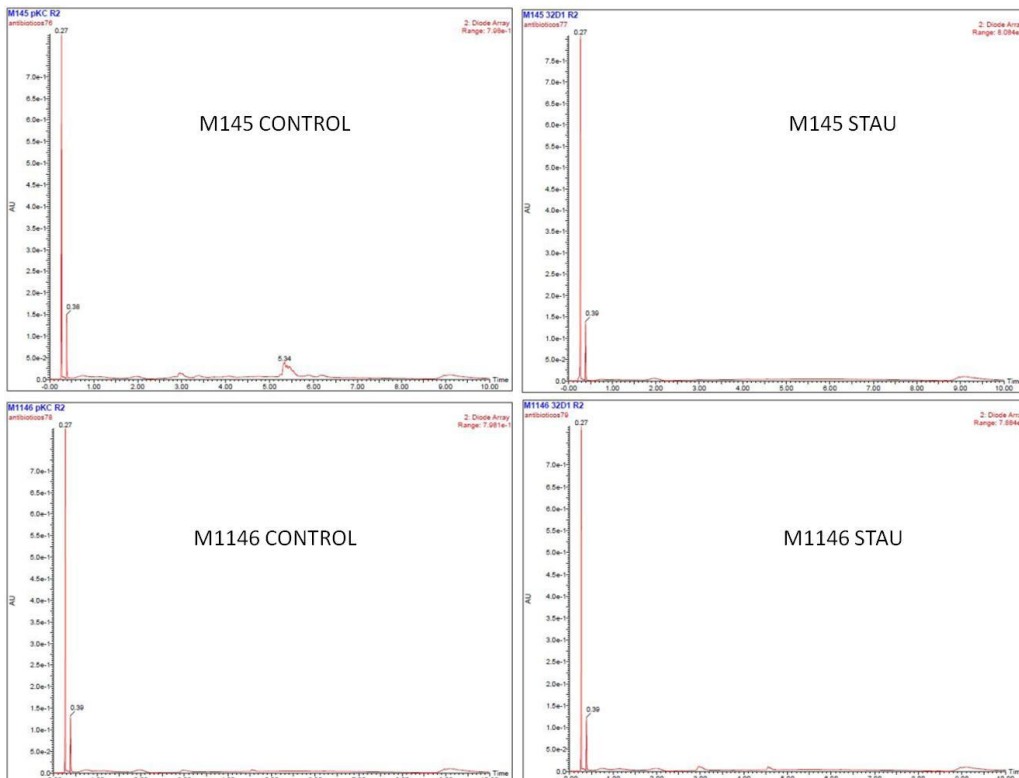


4. Estaurosporina: Diferentes medios, 4 días de crecimiento. Resultados 1.2, página 56.

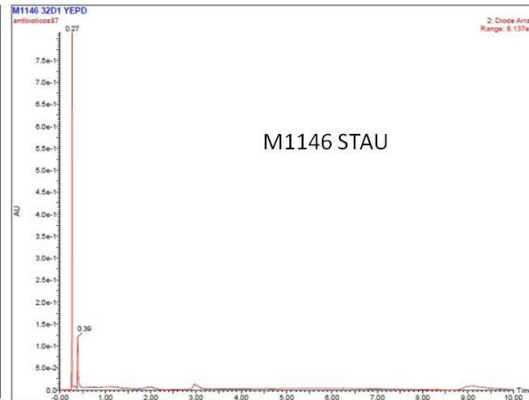
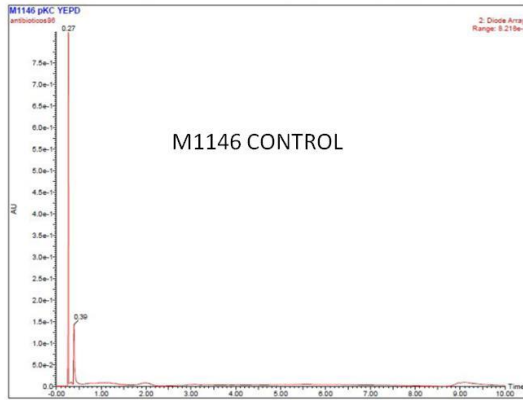
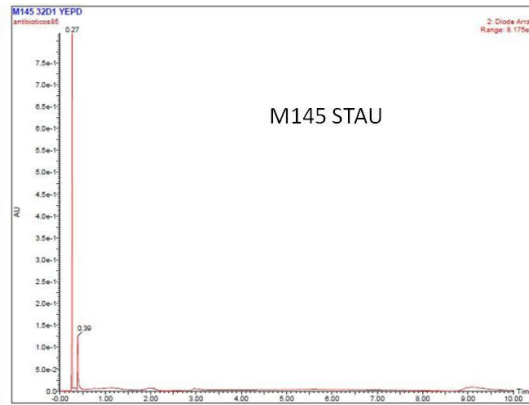
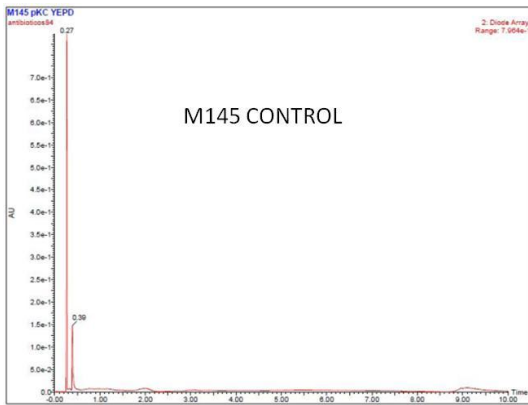
LB



R2

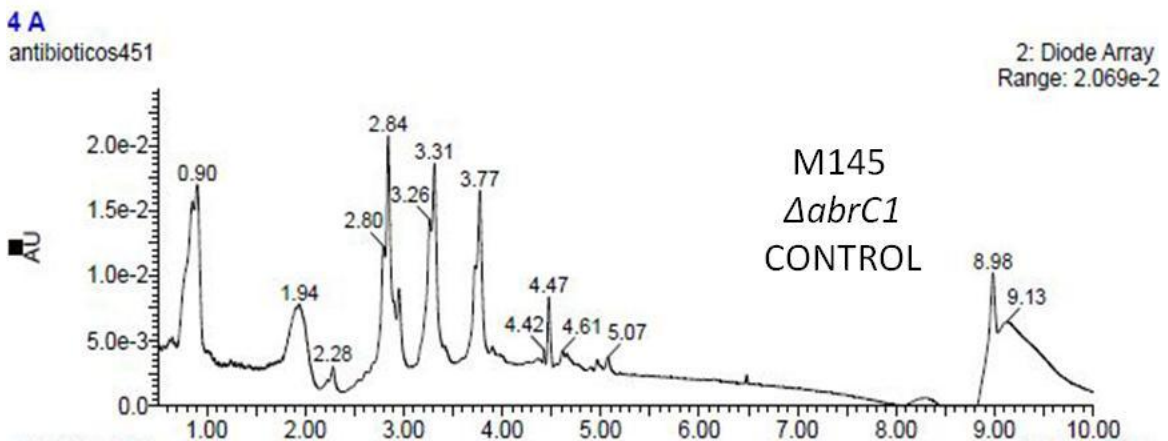
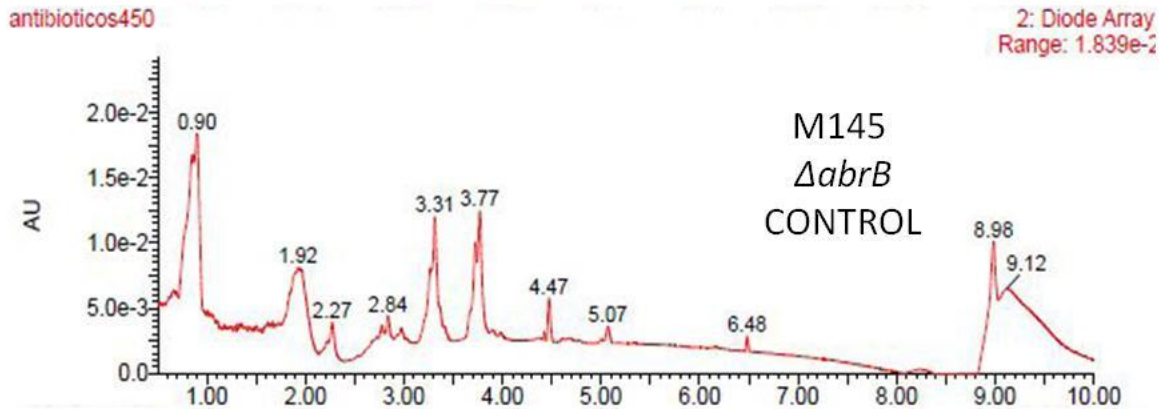
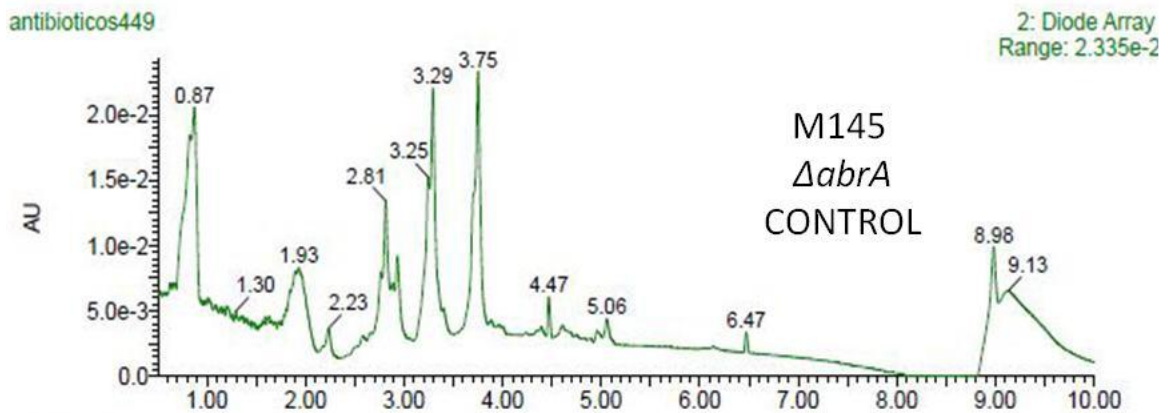
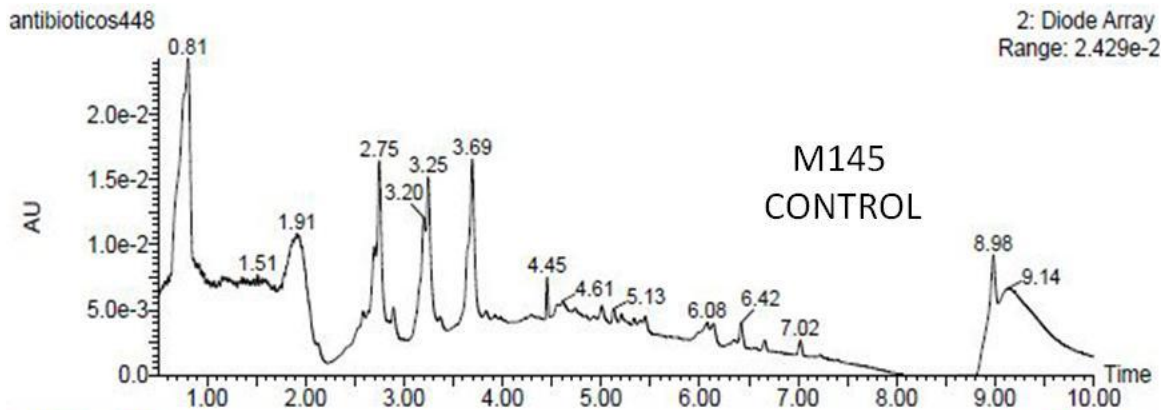


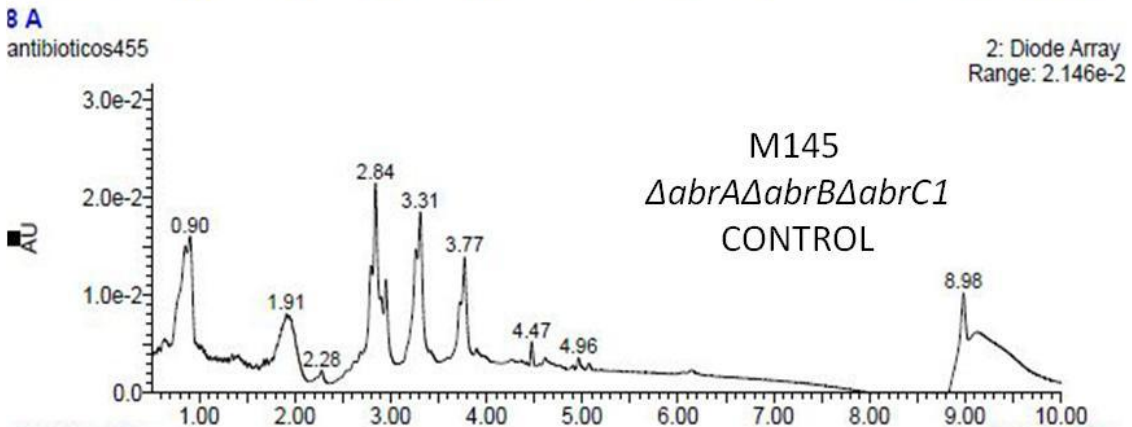
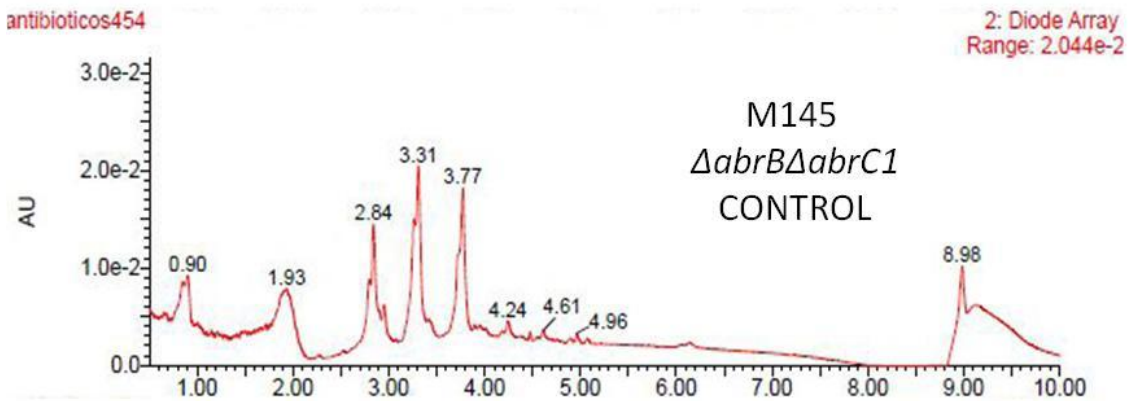
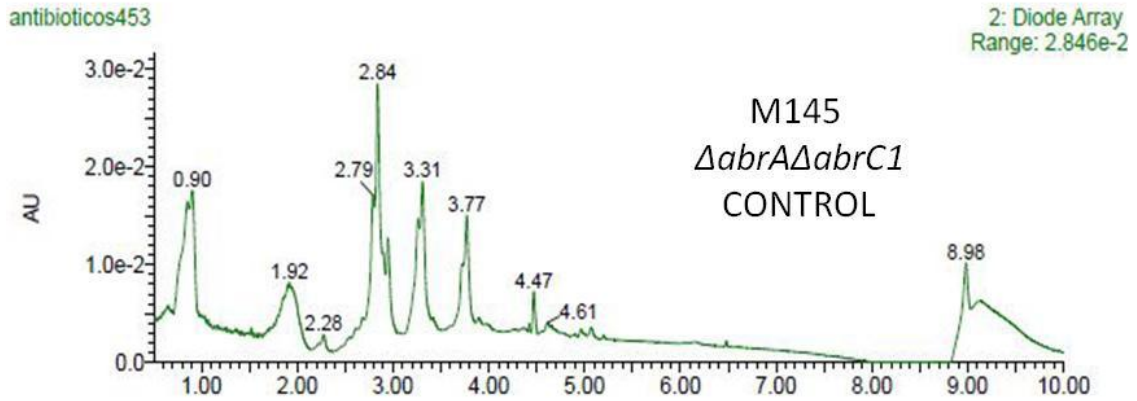
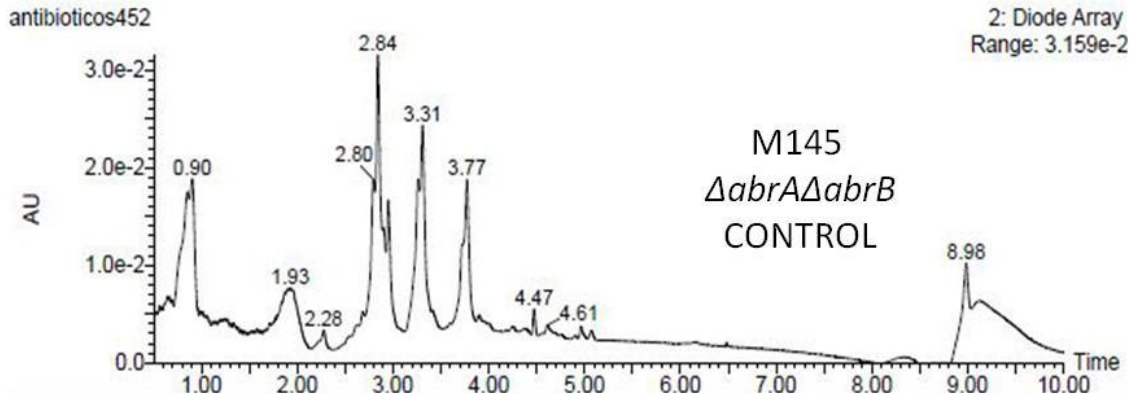
YEPD



5. Mitramicina: Medio SM17, 3 días de crecimiento. Resultados 1.4, página 69.

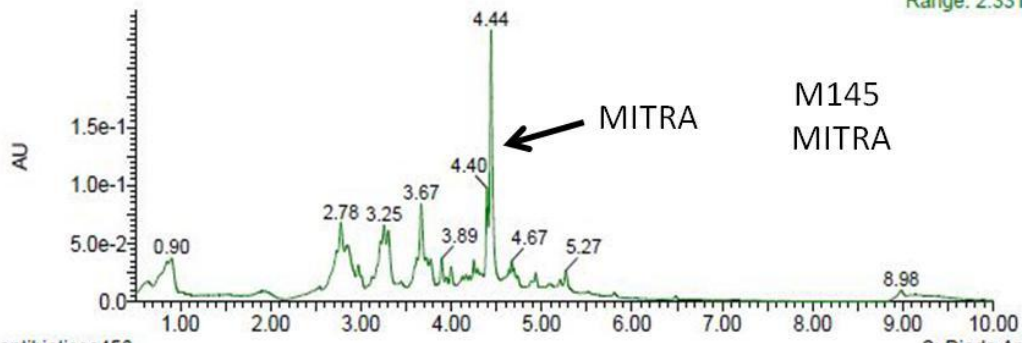
M145





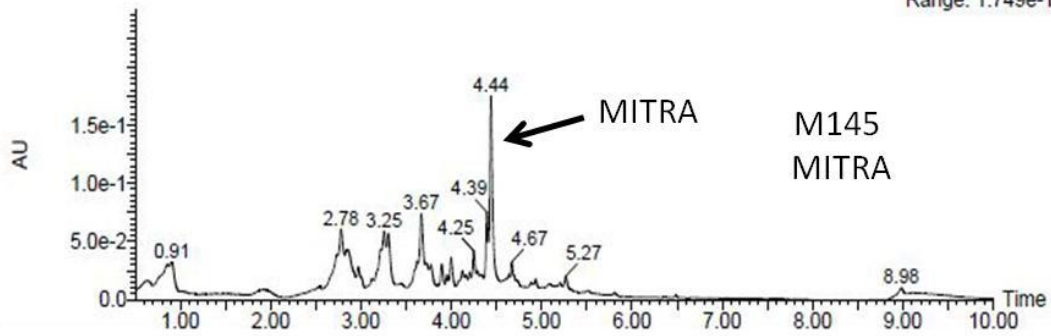
antibioticos457

2: Diode Array
Range: 2.331e-1



antibioticos456

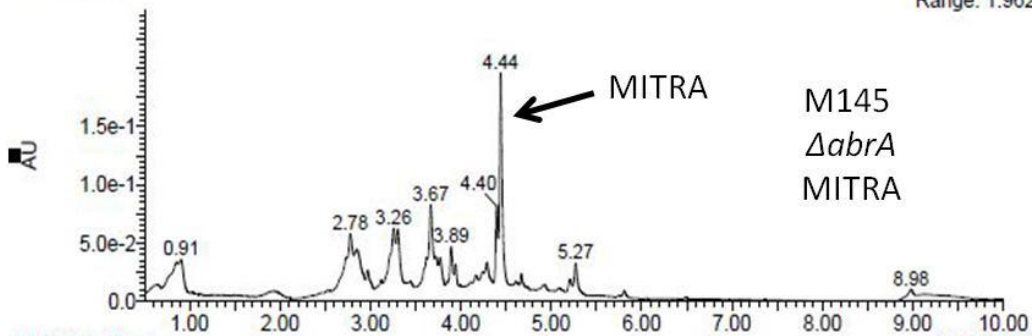
2: Diode Array
Range: 1.749e-1



12 A

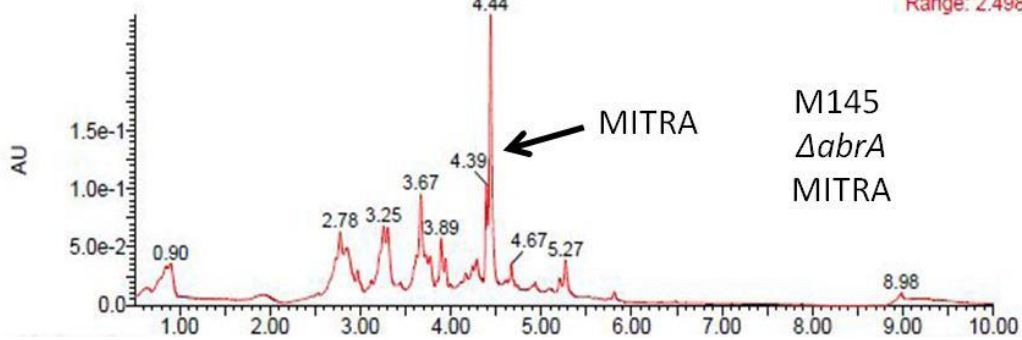
antibioticos459

2: Diode Array
Range: 1.962e-1



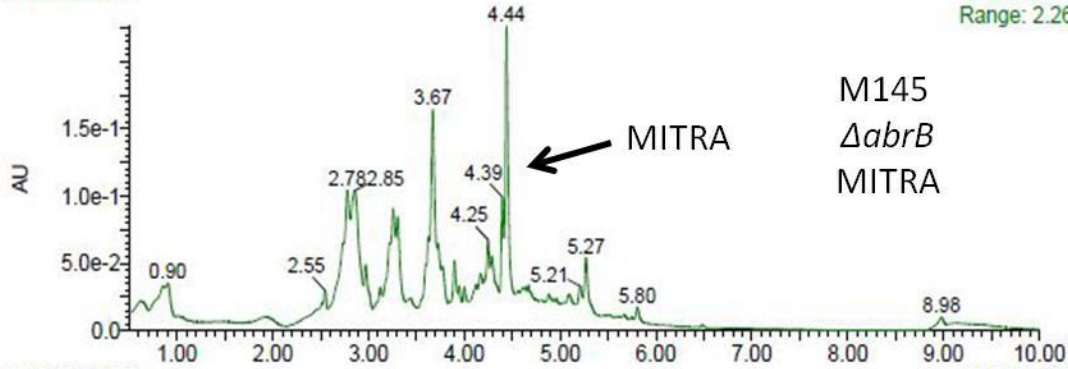
antibioticos458

2: Diode Array
Range: 2.498e-1



antibioticos461

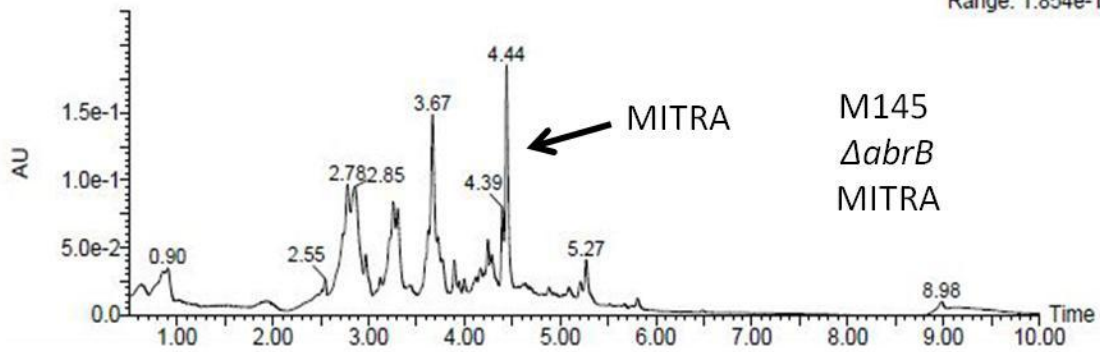
2: Diode Array
Range: 2.26e-1



M145
 \DeltaabrB
MITRA

antibioticos460

2: Diode Array
Range: 1.854e-1

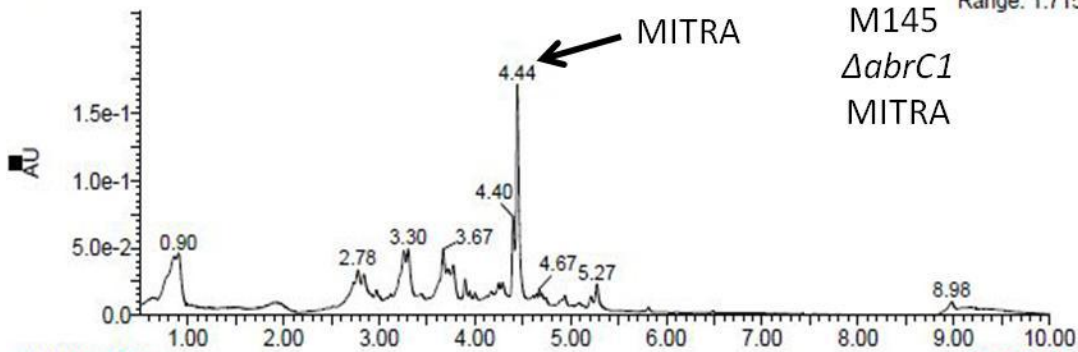


M145
 \DeltaabrB
MITRA

16 A

antibioticos463

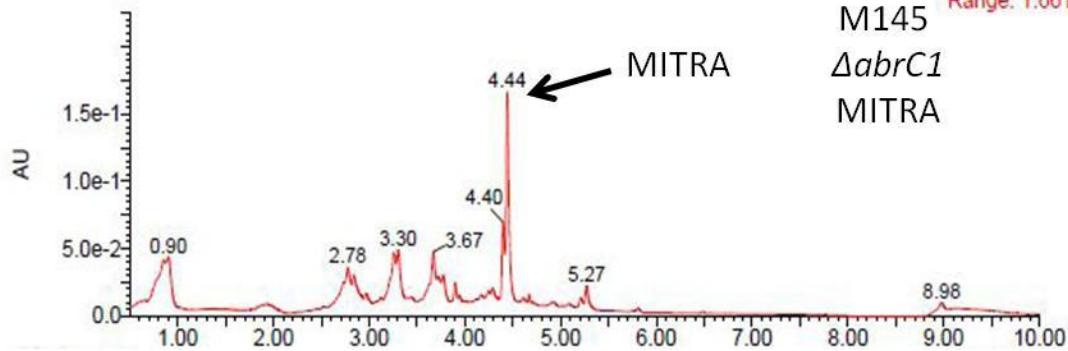
2: Diode Array
Range: 1.715e-1



M145
 $\DeltaabrC1$
MITRA

antibioticos462

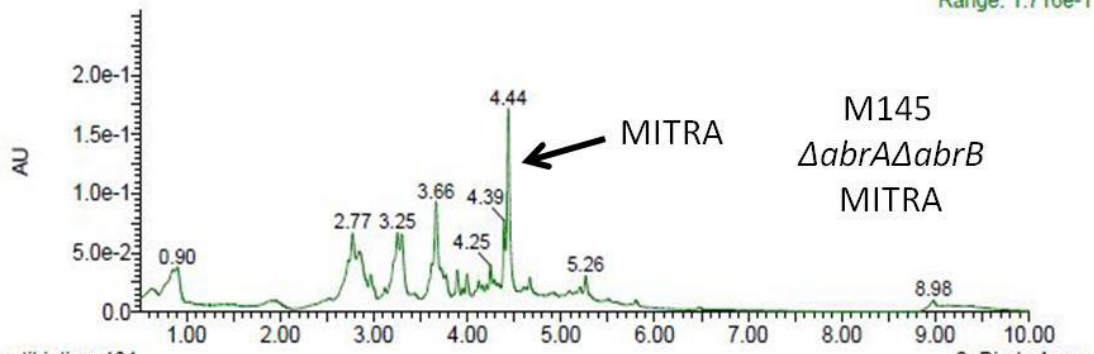
2: Diode Array
Range: 1.661e-1



M145
 $\DeltaabrC1$
MITRA

antibioticos465

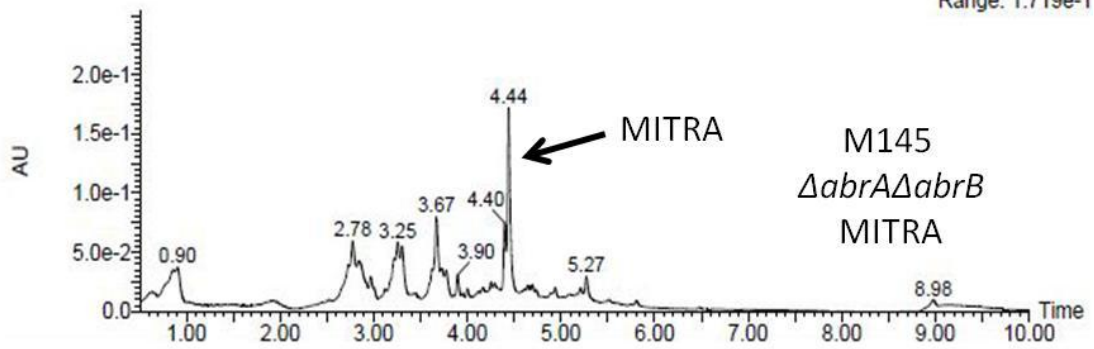
2: Diode Array
Range: 1.716e-1



M145
 $\Delta abrA\Delta abrB$
MITRA

antibioticos464

2: Diode Array
Range: 1.719e-1

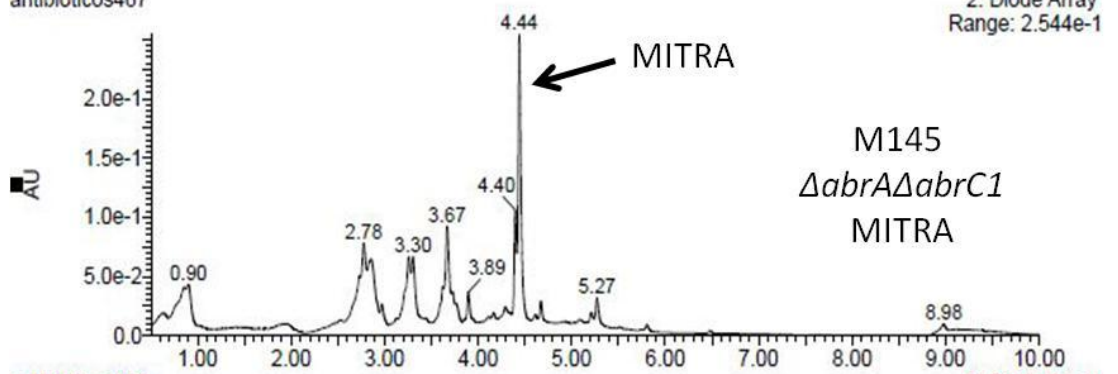


M145
 $\Delta abrA\Delta abrB$
MITRA

20 A

antibioticos467

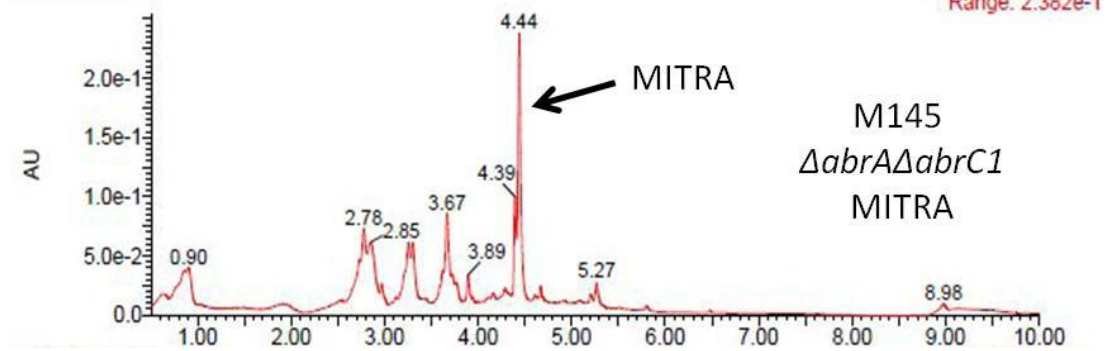
2: Diode Array
Range: 2.544e-1



M145
 $\Delta abrA\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos466

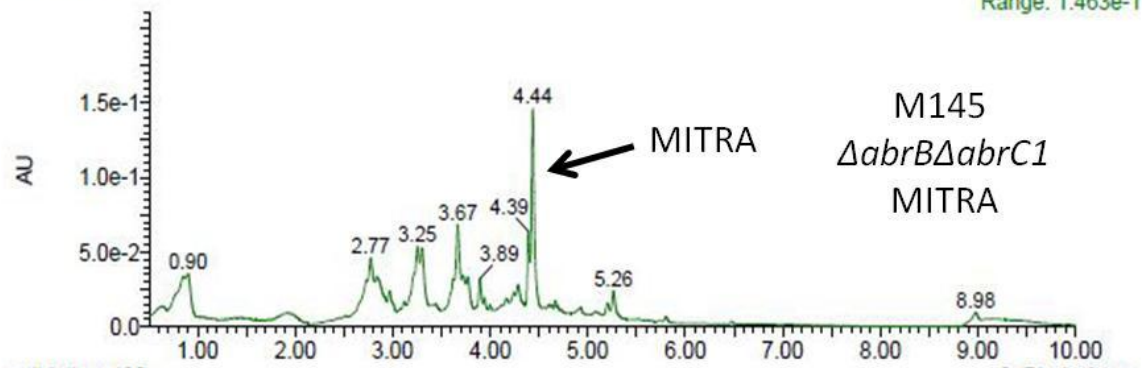
2: Diode Array
Range: 2.382e-1



M145
 $\Delta abrA\Delta abrC1$
MITRA

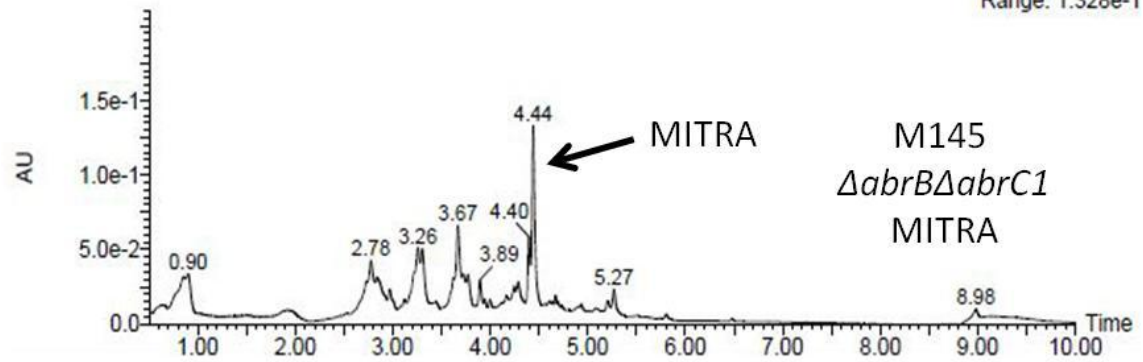
antibioticos469

2: Diode Array
Range: 1.463e-1



antibioticos468

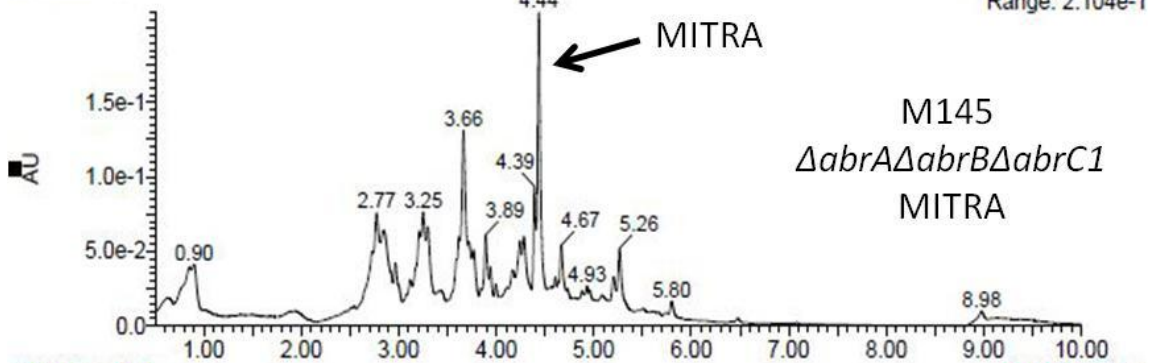
2: Diode Array
Range: 1.328e-1



24 A

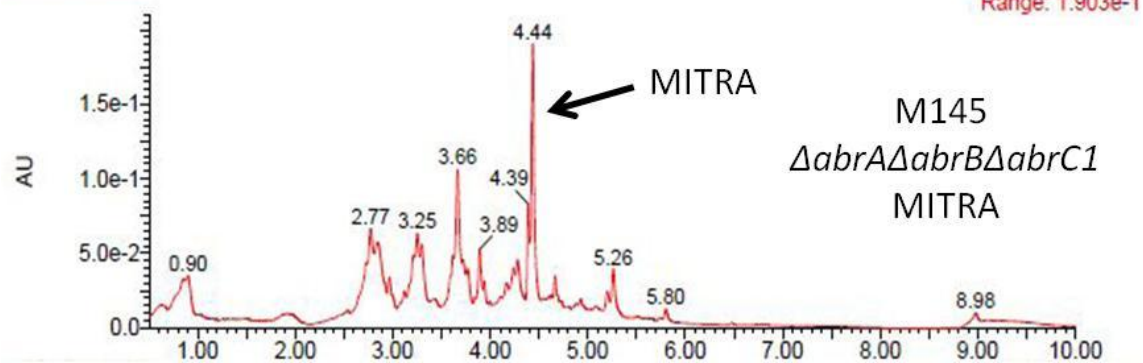
antibioticos471

2: Diode Array
Range: 2.104e-1



antibioticos470

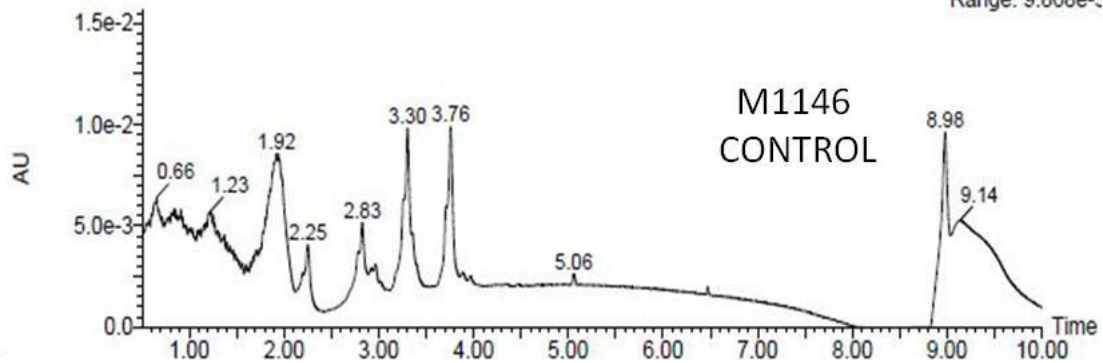
2: Diode Array
Range: 1.903e-1



M1146

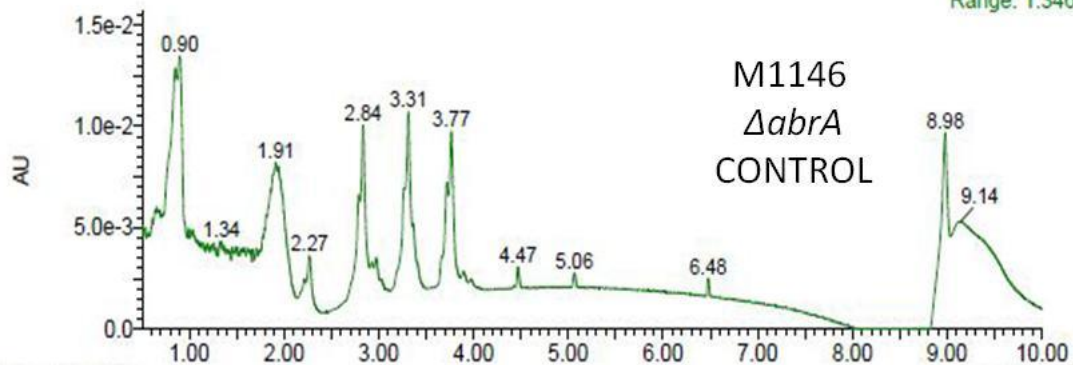
antibioticos472

2: Diode Array
Range: 9.868e-3



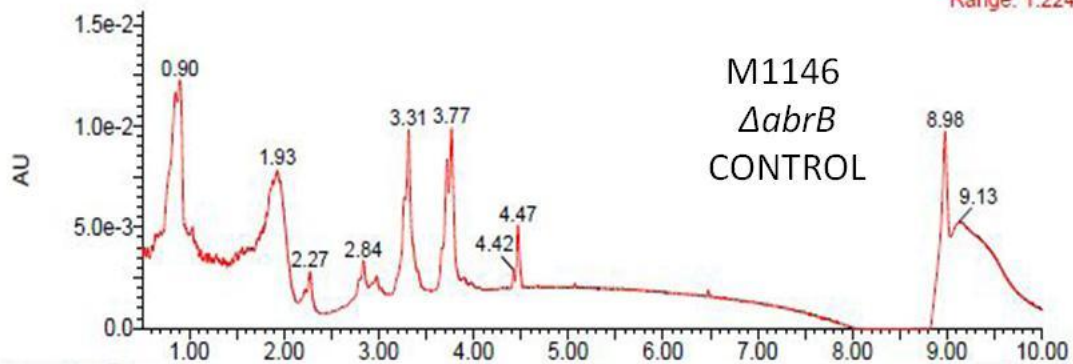
antibioticos473

2: Diode Array
Range: 1.346e-2



antibioticos474

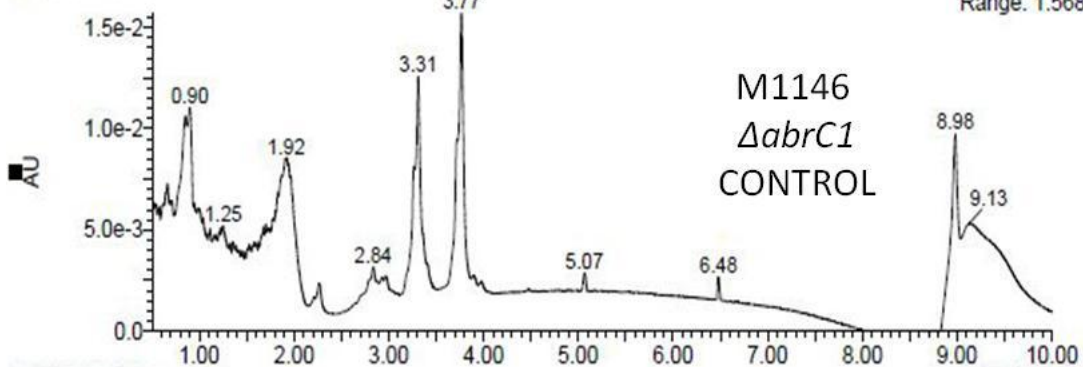
2: Diode Array
Range: 1.224e-2

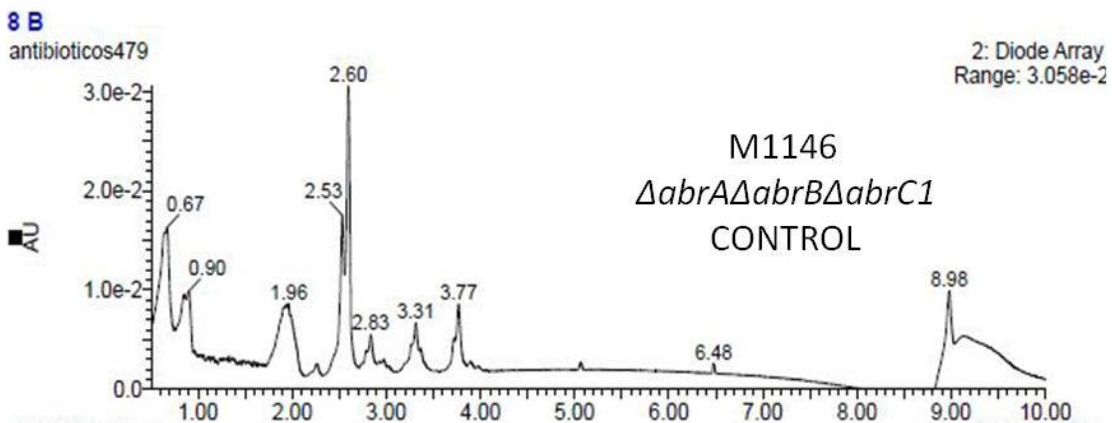
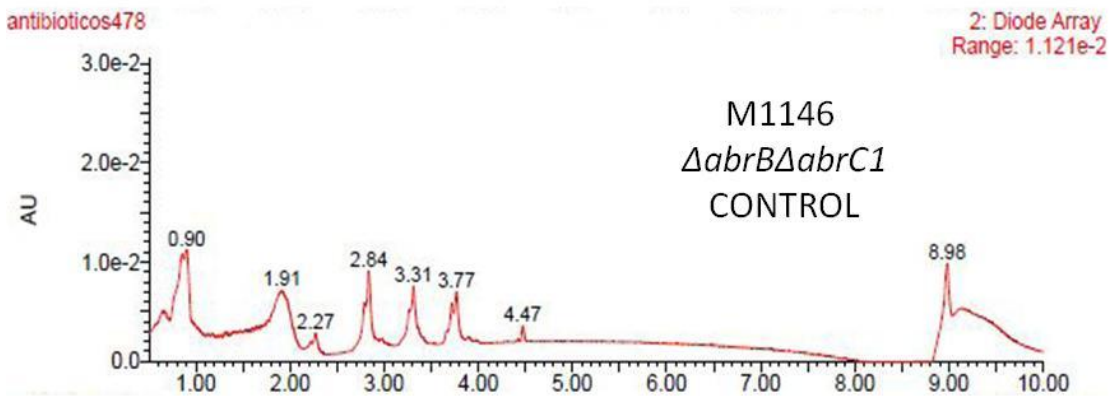
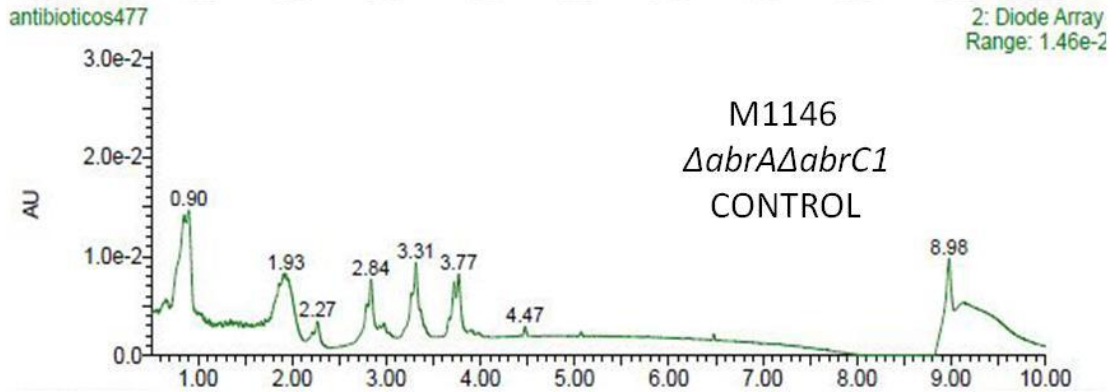
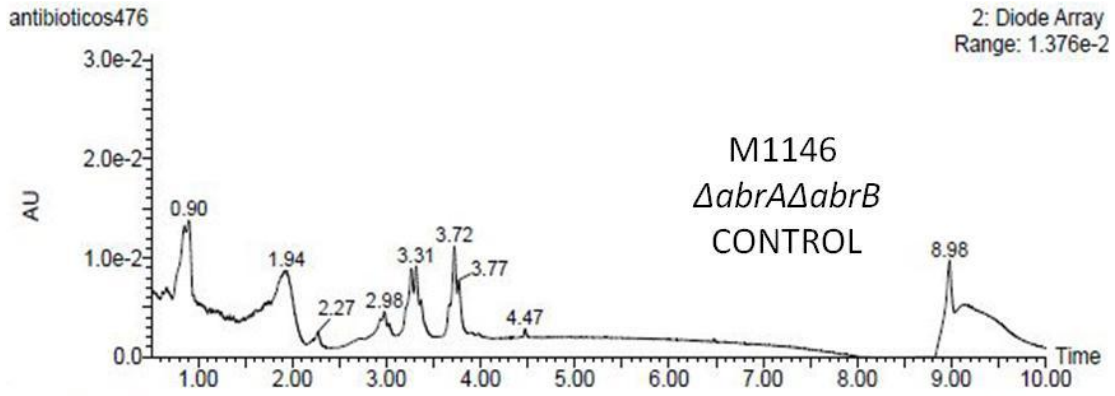


4 B

antibioticos475

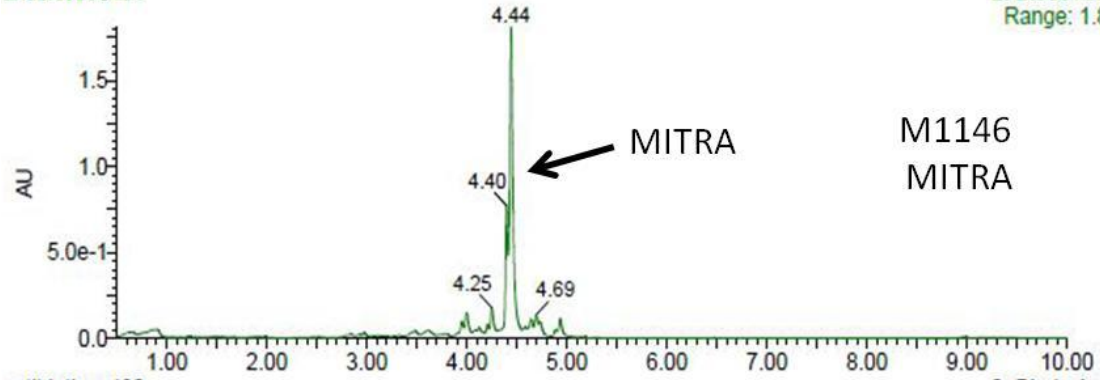
2: Diode Array
Range: 1.568e-2





antibioticos481

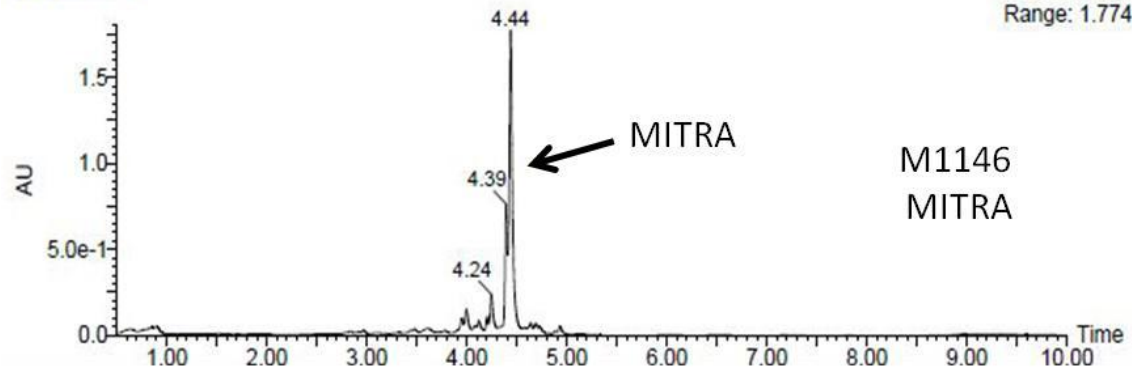
2: Diode Array
Range: 1.809



M1146
MITRA

antibioticos480

2: Diode Array
Range: 1.774

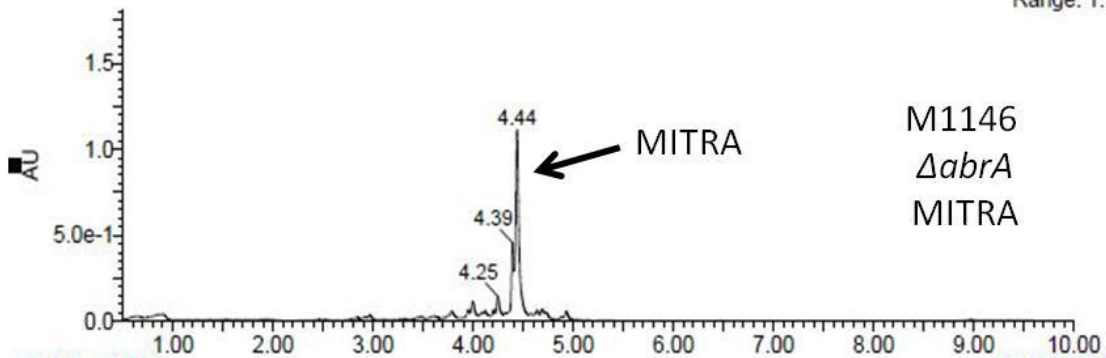


M1146
MITRA

12 B

antibioticos483

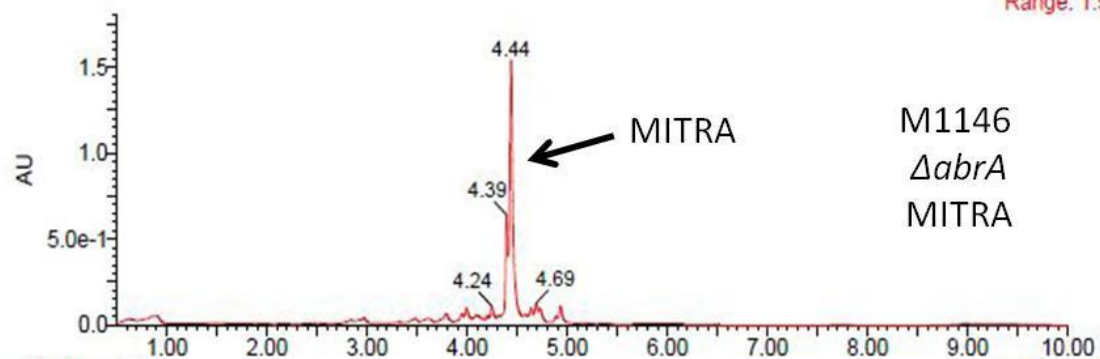
2: Diode Array
Range: 1.112



M1146
ΔabrA
MITRA

antibioticos482

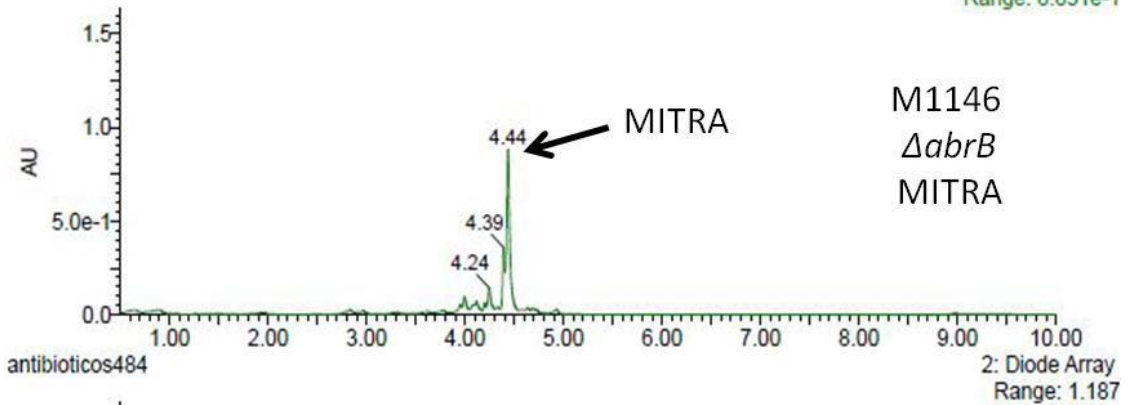
2: Diode Array
Range: 1.541



M1146
ΔabrA
MITRA

antibioticos485

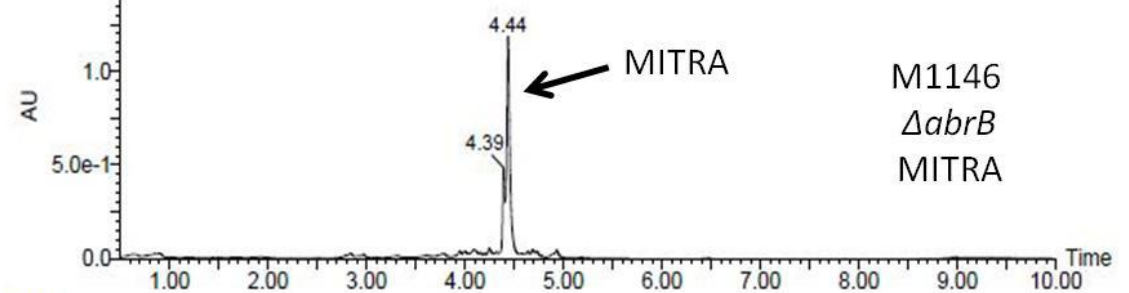
2: Diode Array
Range: 8.831e-1



M1146
 $\Delta abrB$
MITRA

antibioticos484

2: Diode Array
Range: 1.187

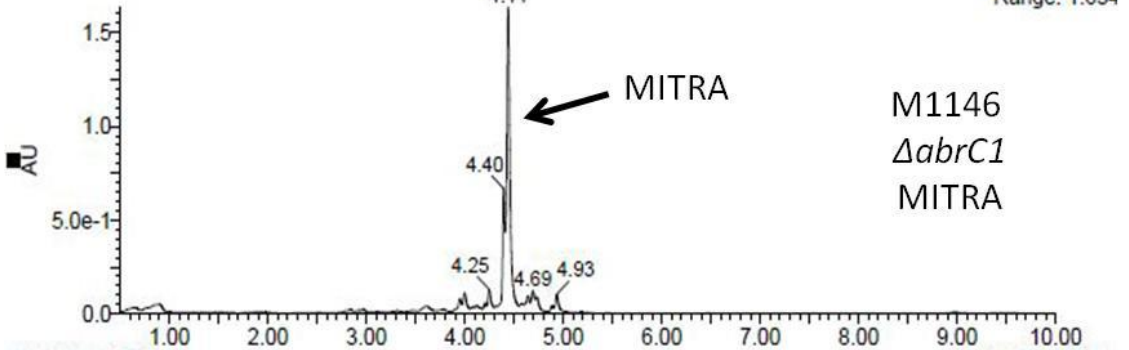


M1146
 $\Delta abrB$
MITRA

16 B

antibioticos487

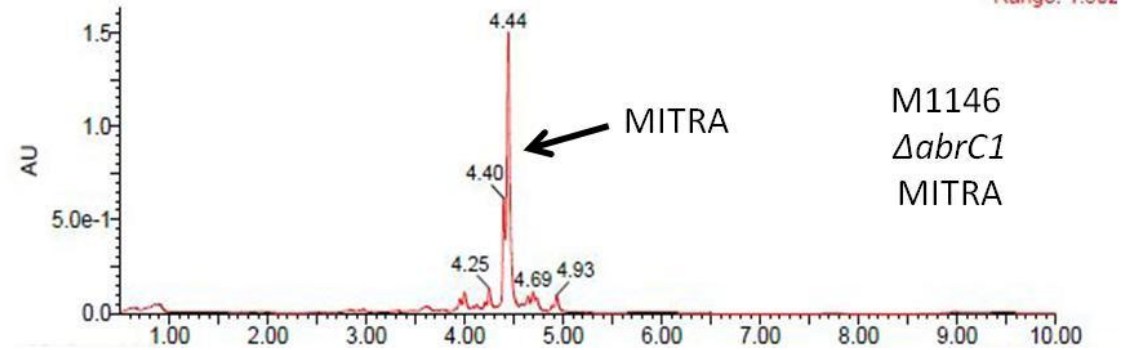
2: Diode Array
Range: 1.634



M1146
 $\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos486

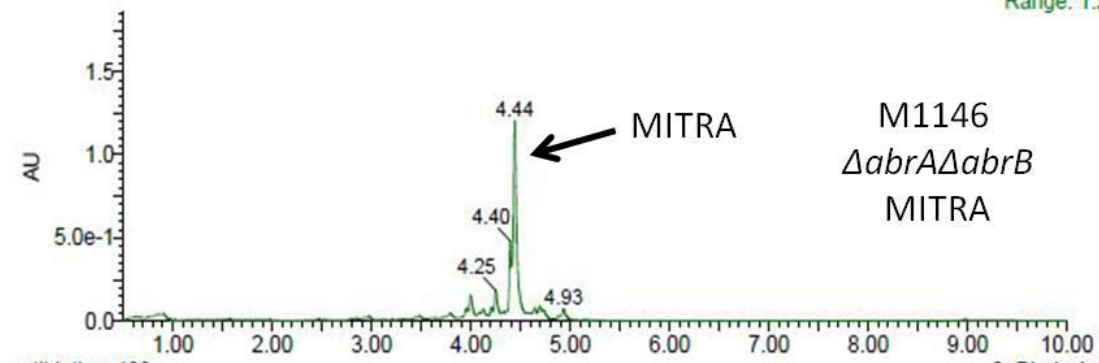
2: Diode Array
Range: 1.502



M1146
 $\Delta abrC1$
MITRA

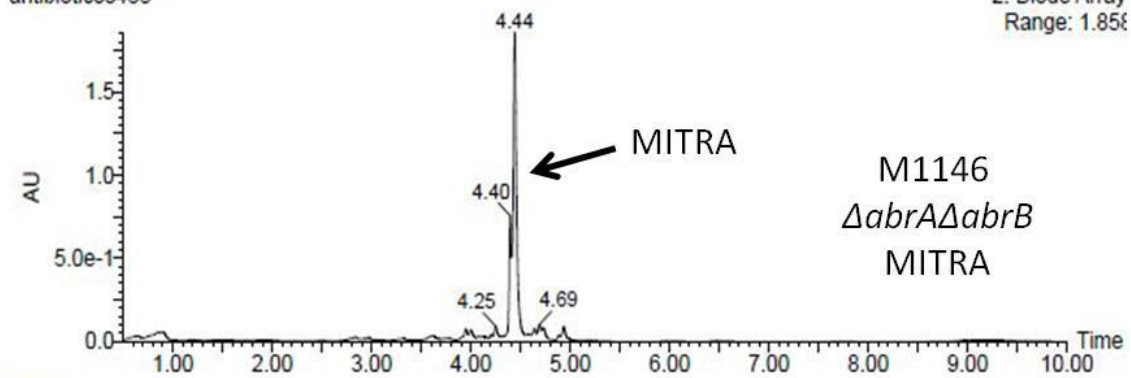
antibioticos489

2: Diode Array
Range: 1.206



antibioticos488

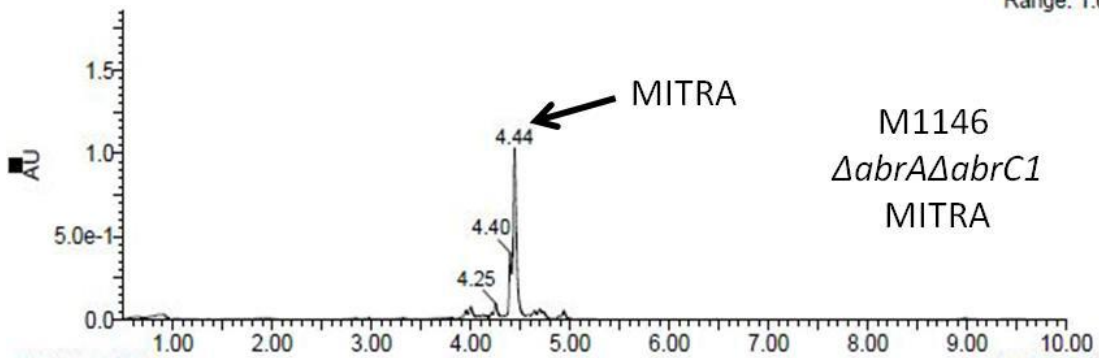
2: Diode Array
Range: 1.856



20 B

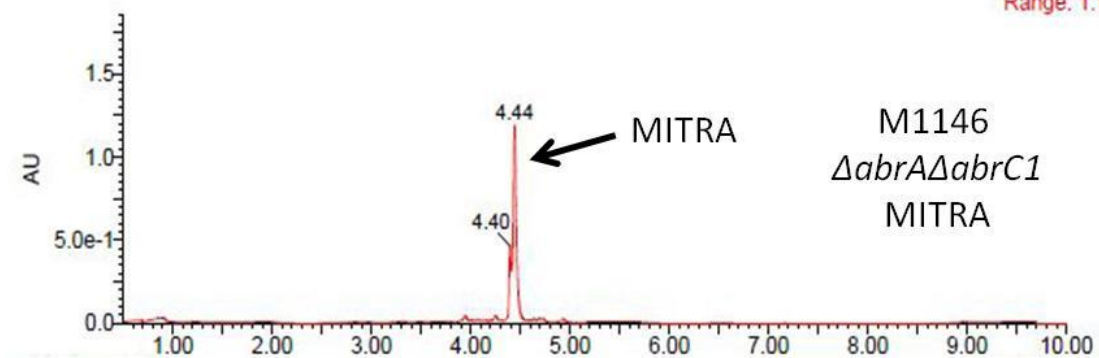
antibioticos491

2: Diode Array
Range: 1.033



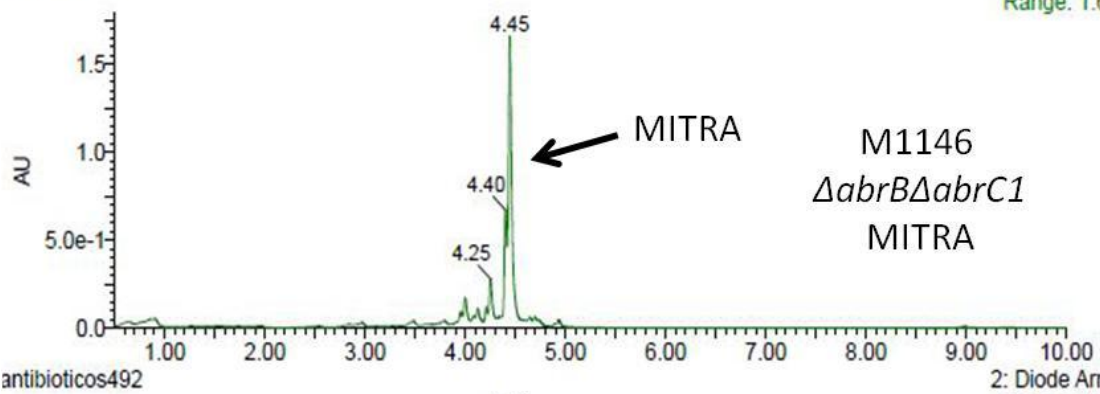
antibioticos490

2: Diode Array
Range: 1.192



antibioticos493

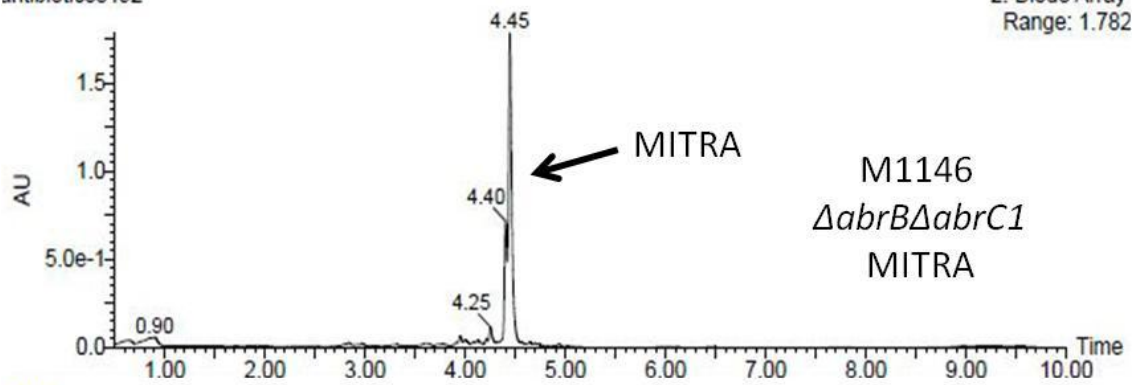
2: Diode Array
Range: 1.659



M1146
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos492

2: Diode Array
Range: 1.782

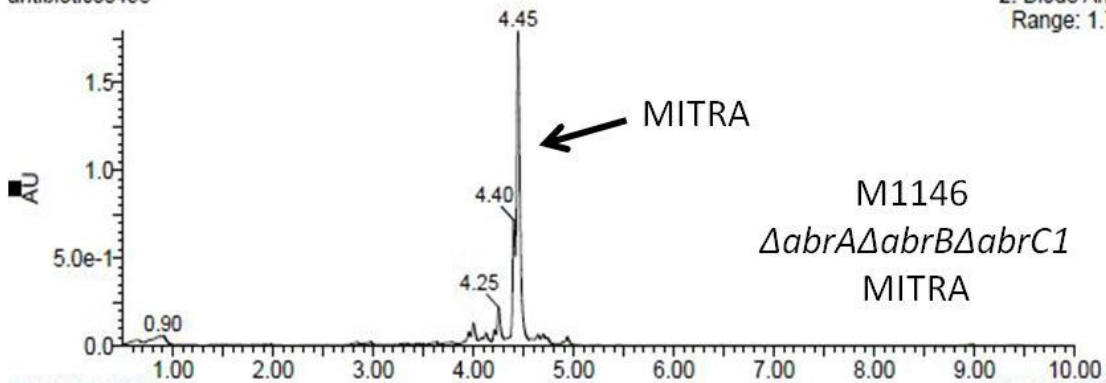


M1146
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

24 B

antibioticos495

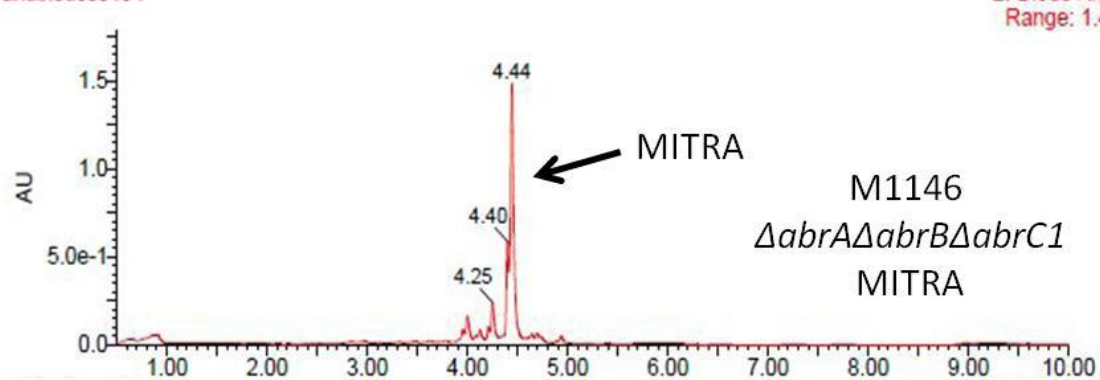
2: Diode Array
Range: 1.788



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

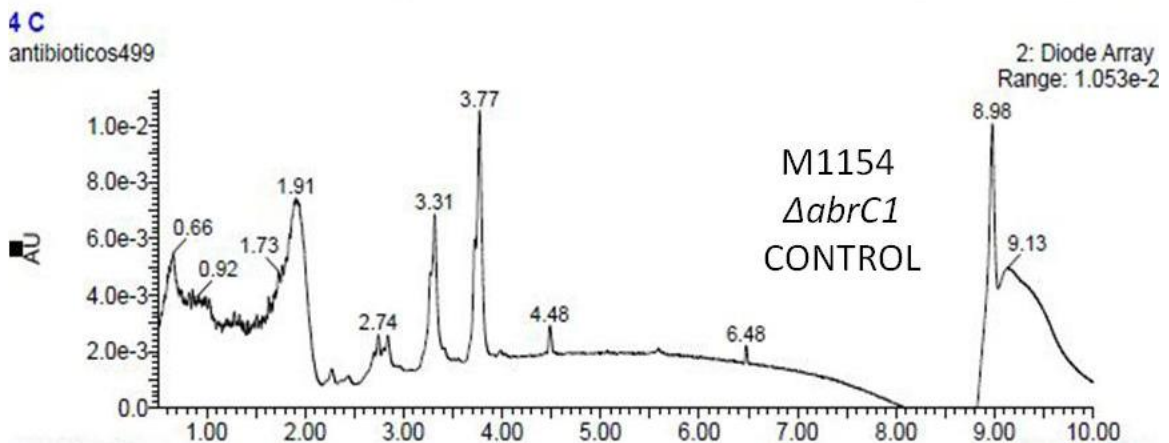
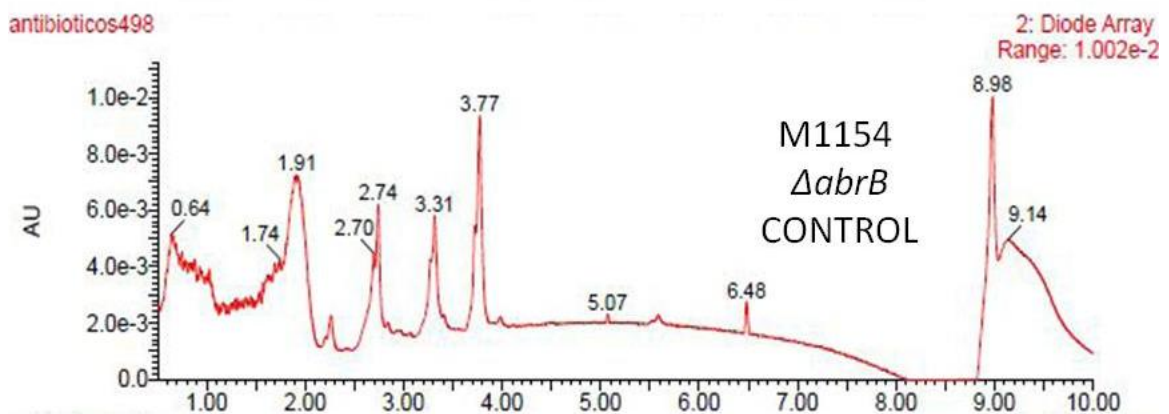
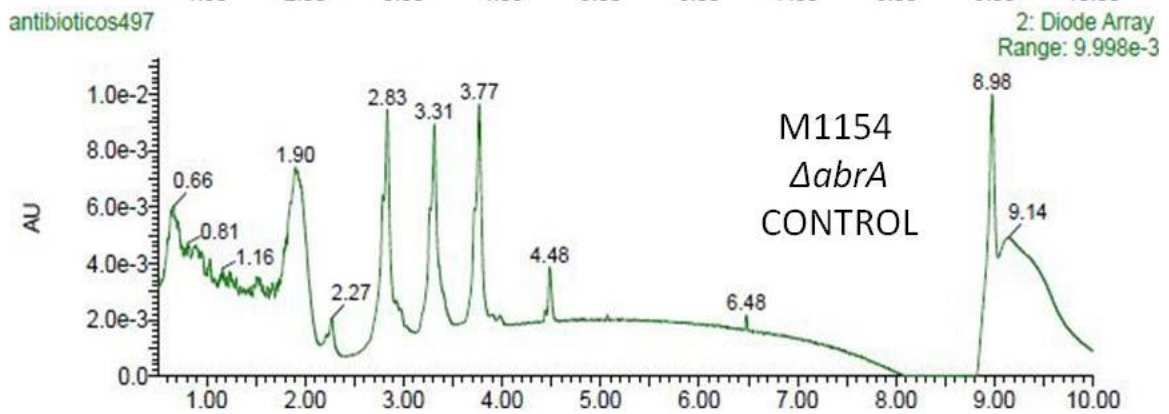
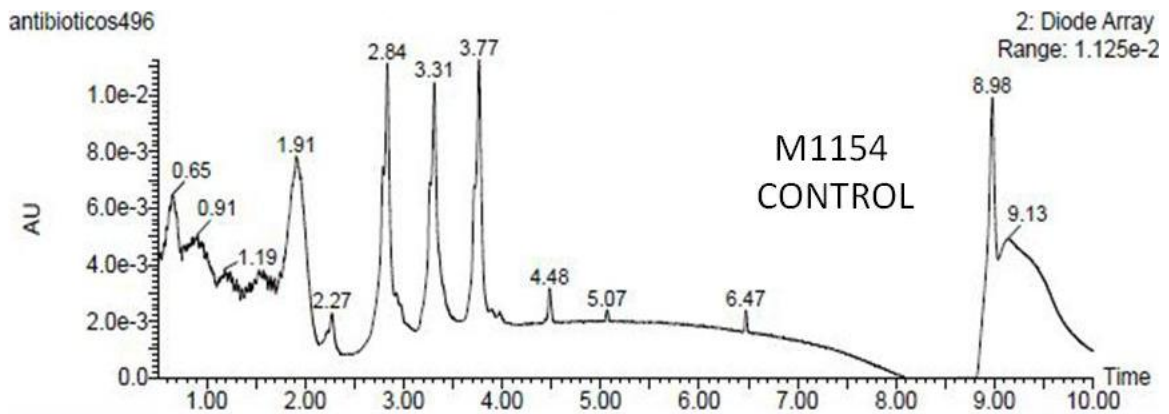
antibioticos494

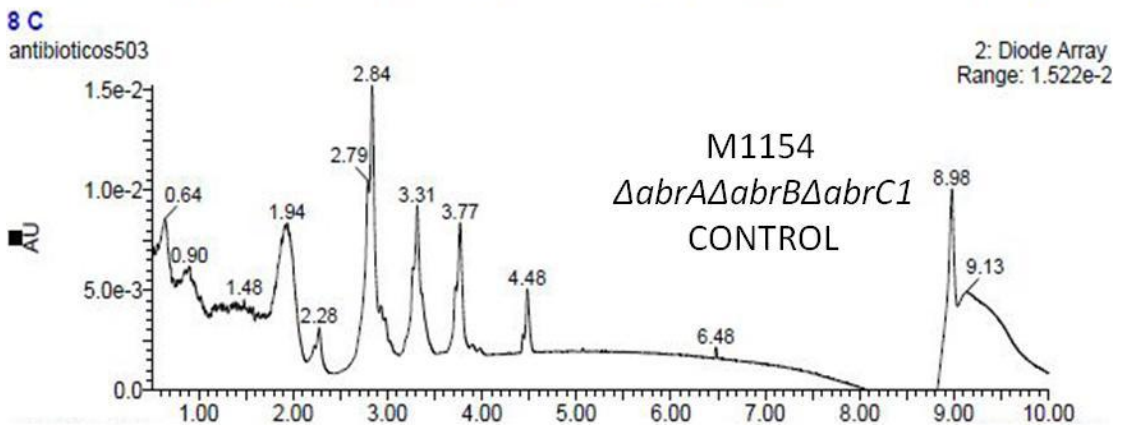
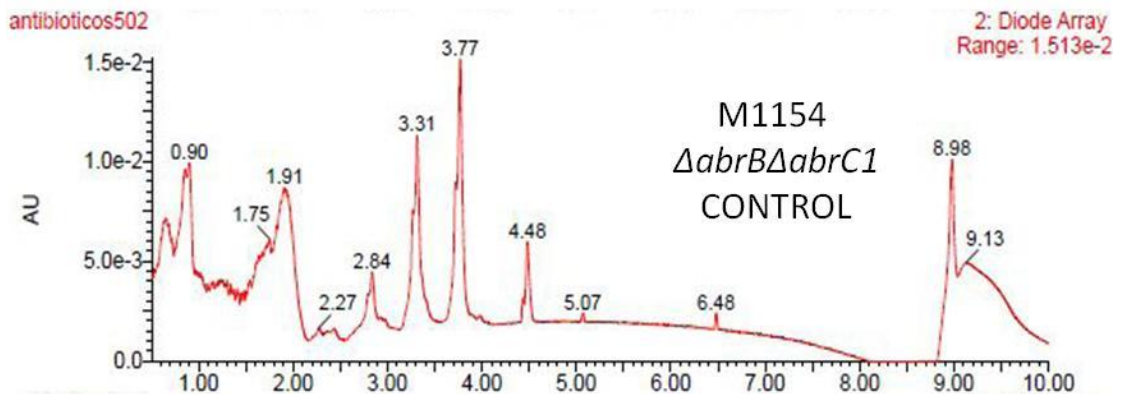
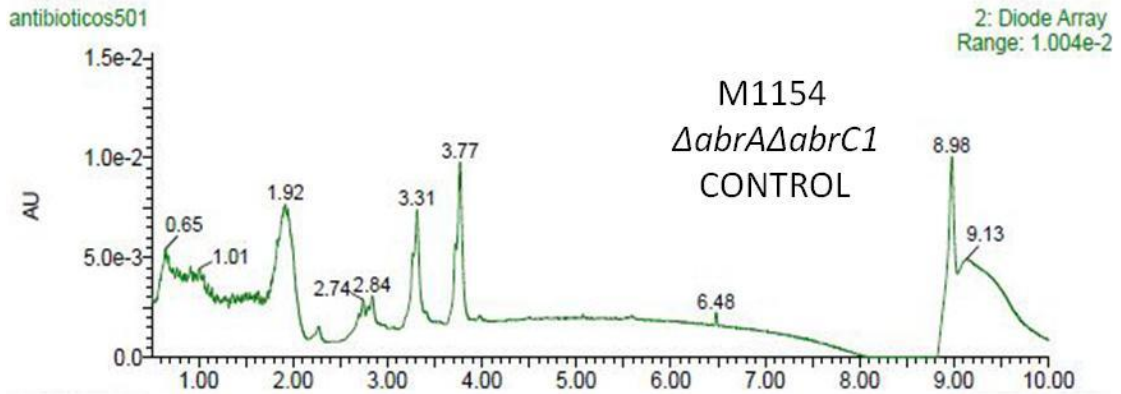
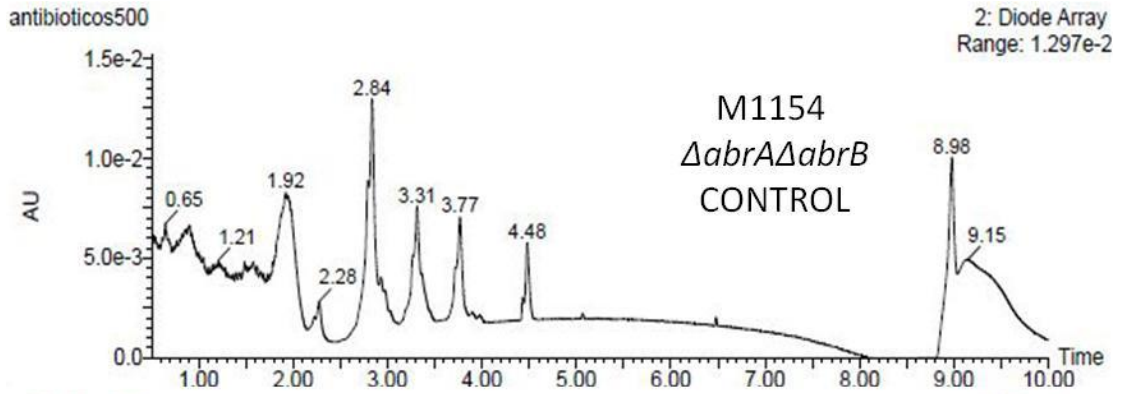
2: Diode Array
Range: 1.481



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

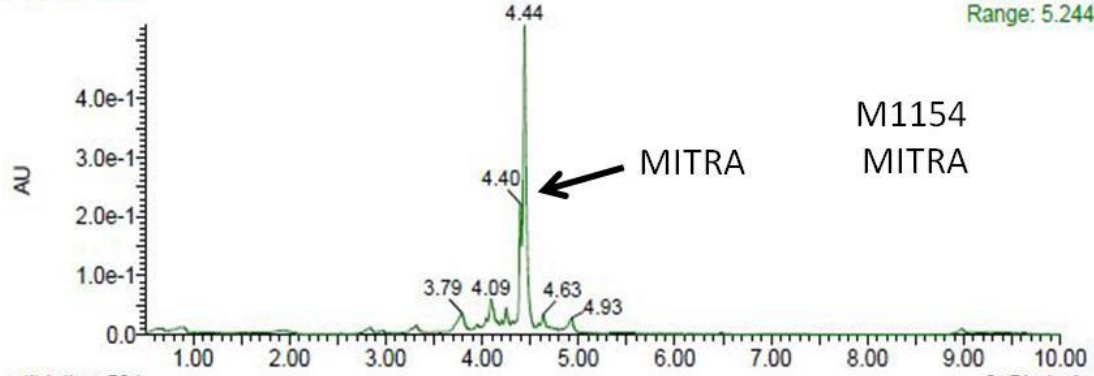
M1154





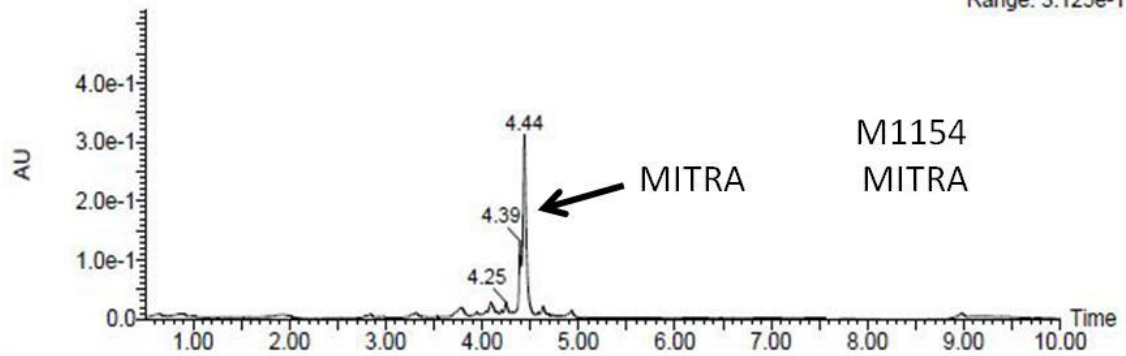
antibioticos505

2: Diode Array
Range: 5.244e-1



antibioticos504

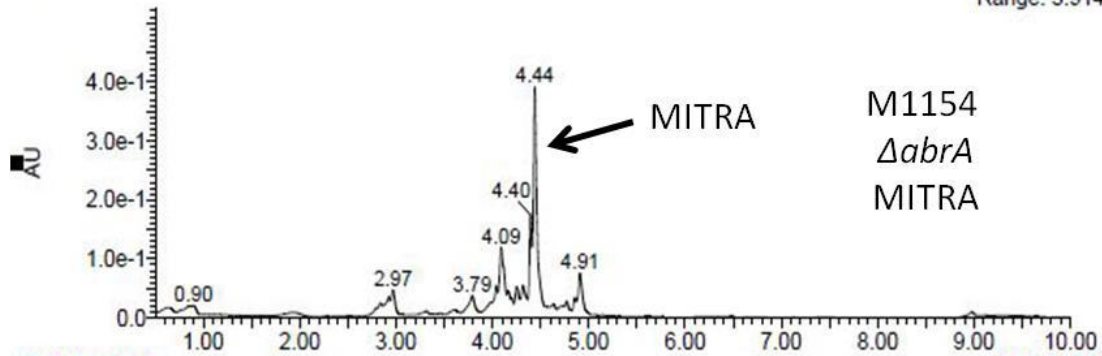
2: Diode Array
Range: 3.125e-1



12 C

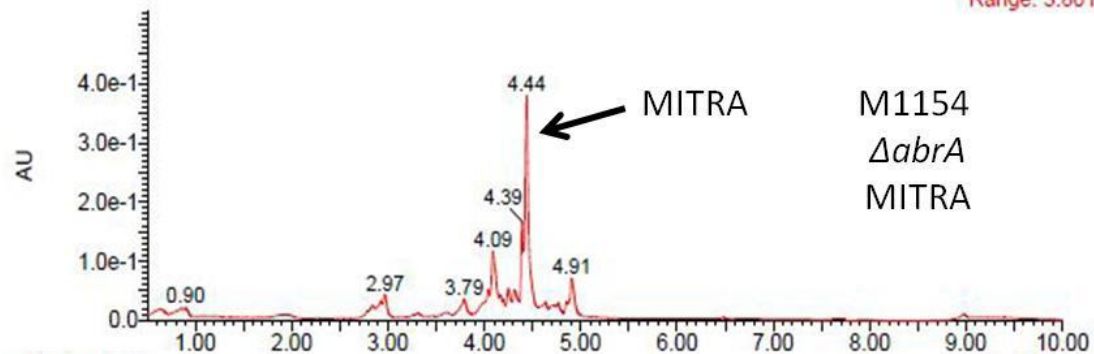
antibioticos507

2: Diode Array
Range: 3.914e-1



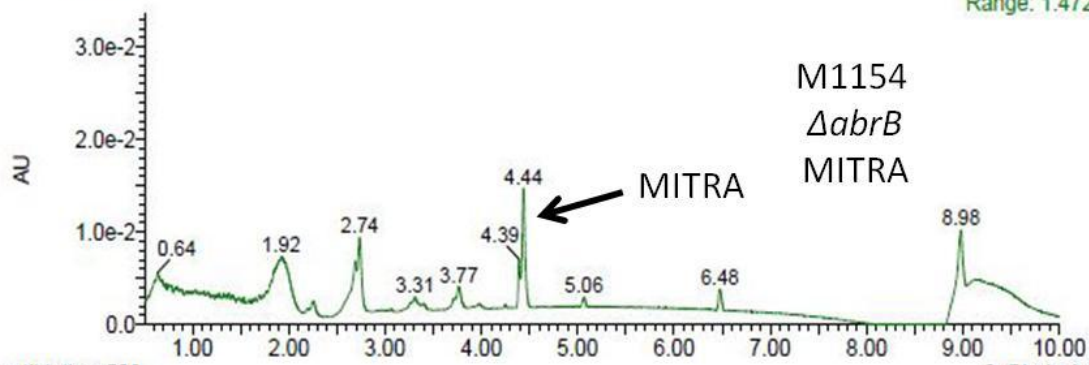
antibioticos506

2: Diode Array
Range: 3.801e-1



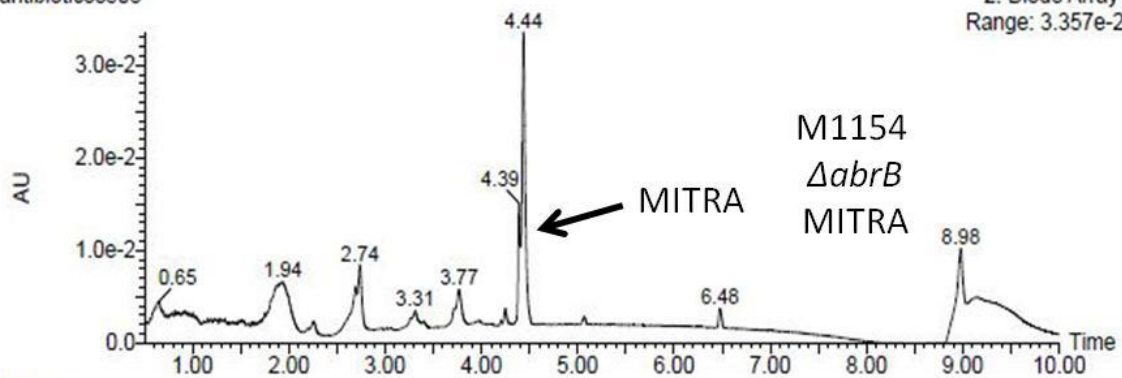
antibioticos509

2: Diode Array
Range: 1.472e-2



antibioticos508

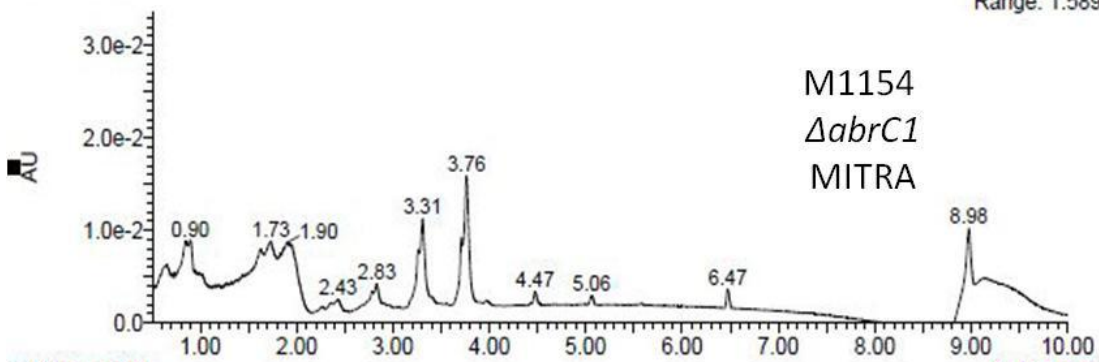
2: Diode Array
Range: 3.357e-2



16 C

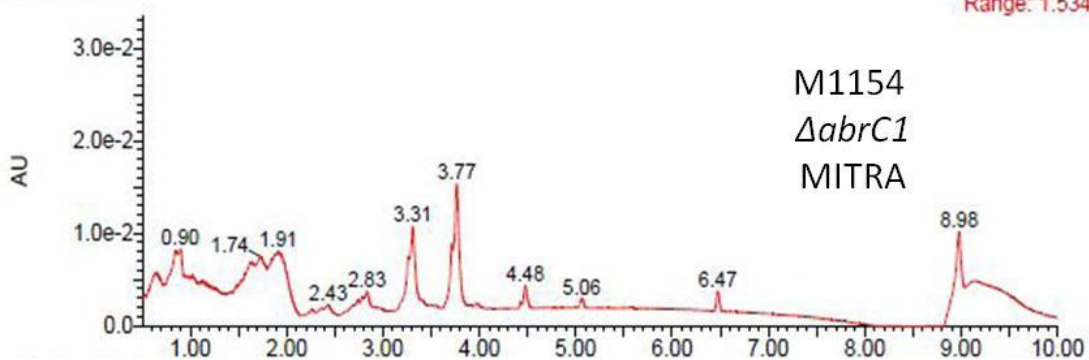
antibioticos511

2: Diode Array
Range: 1.589e-2



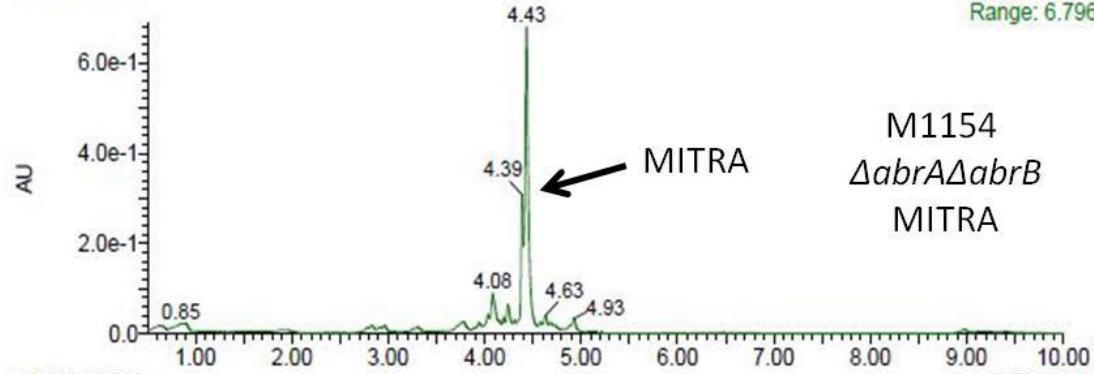
antibioticos510

2: Diode Array
Range: 1.534e-2



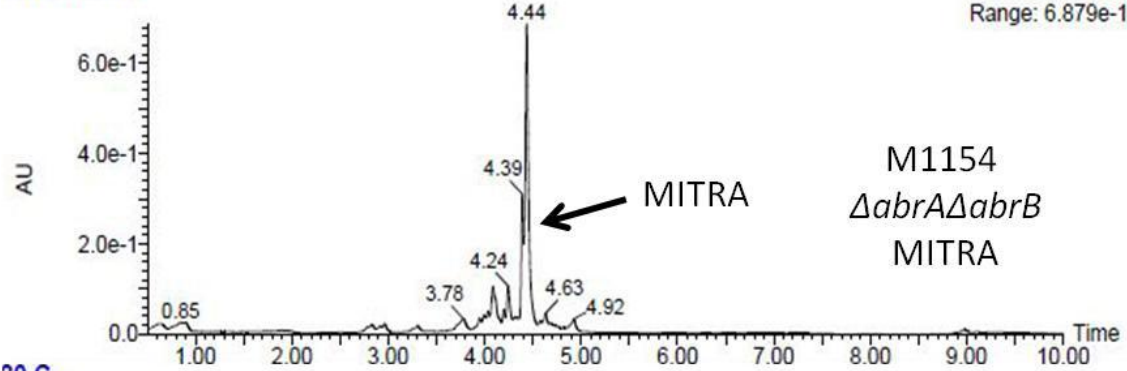
antibioticos513

2: Diode Array
Range: 6.796e-1



antibioticos512

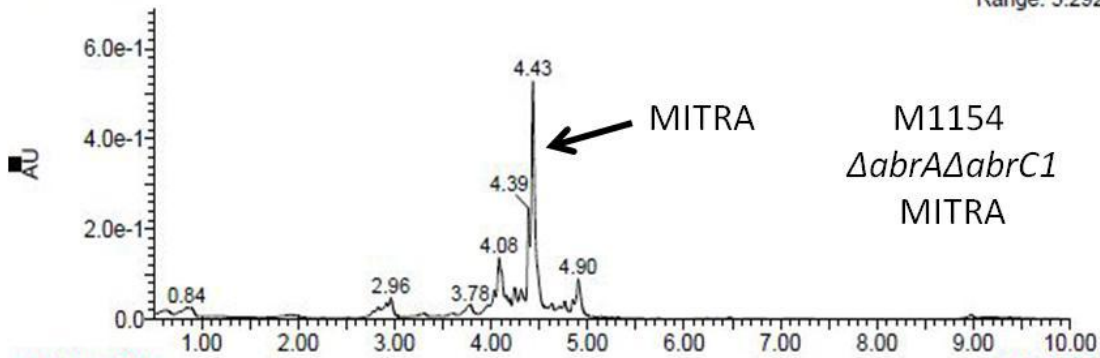
2: Diode Array
Range: 6.879e-1



20 C

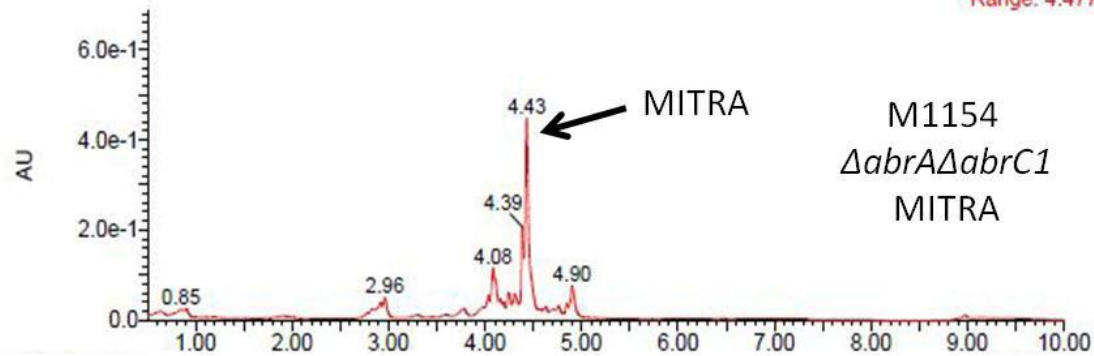
antibioticos515

2: Diode Array
Range: 5.292e-1



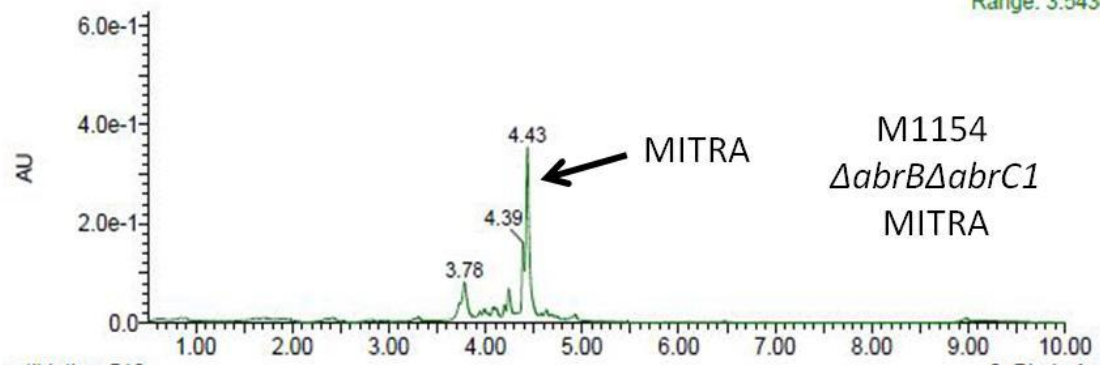
antibioticos514

2: Diode Array
Range: 4.477e-1



antibioticos517

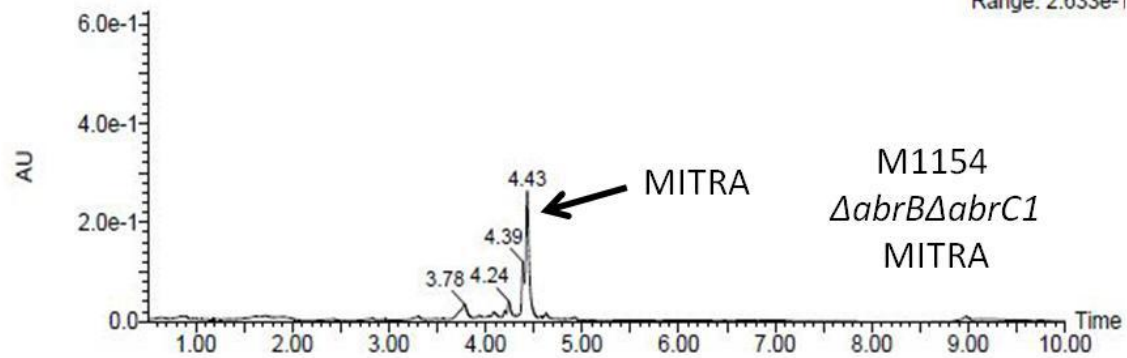
2: Diode Array
Range: 3.543e-1



M1154
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos516

2: Diode Array
Range: 2.633e-1

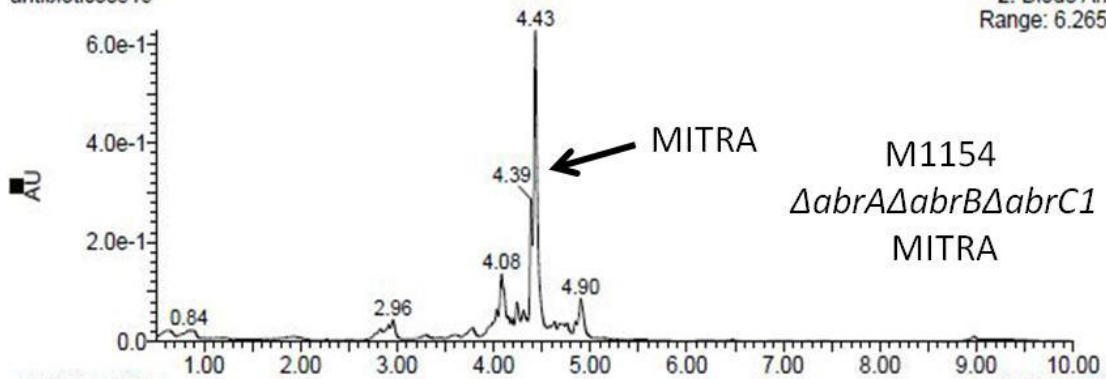


M1154
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

24 C

antibioticos519

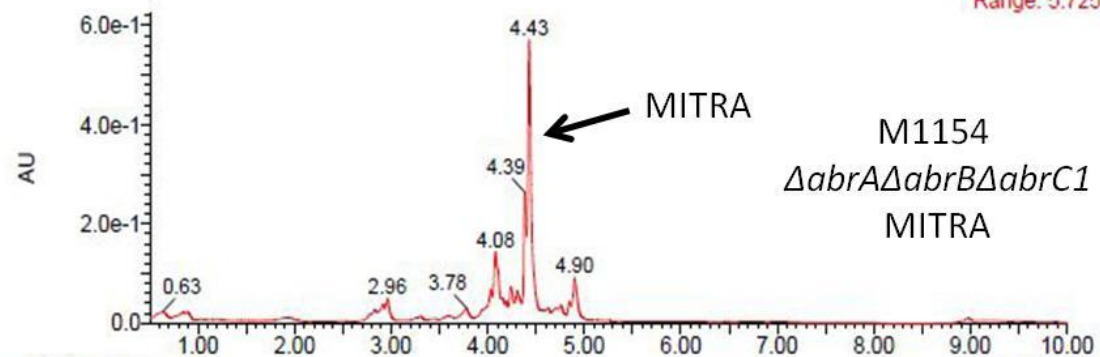
2: Diode Array
Range: 6.265e-1



M1154
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

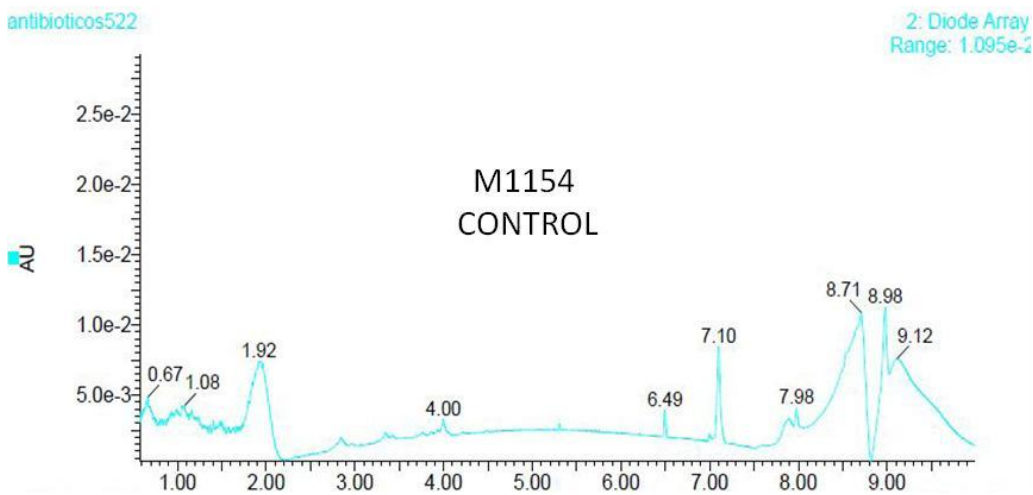
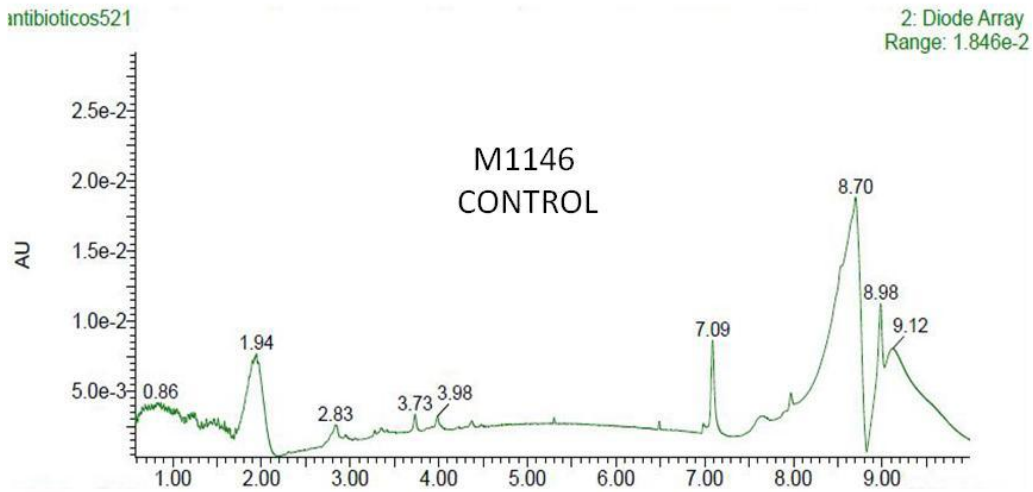
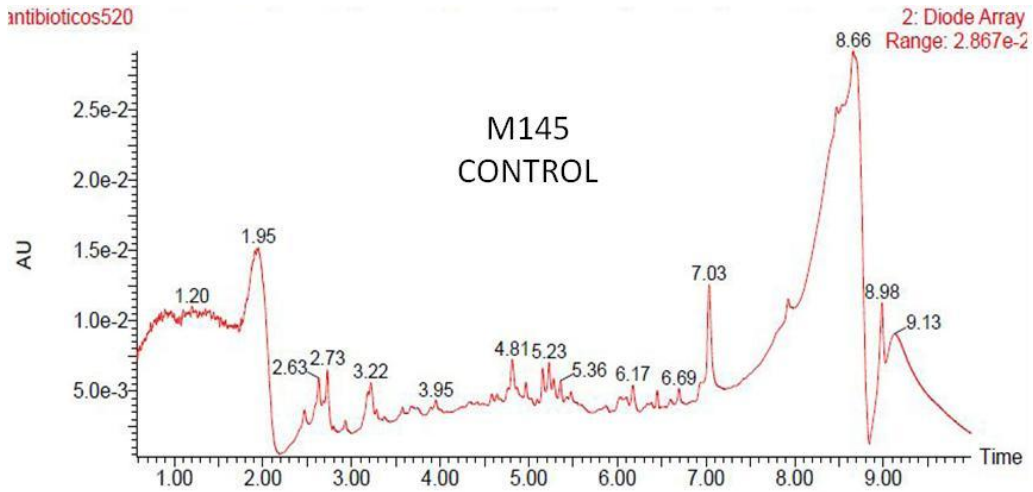
antibioticos518

2: Diode Array
Range: 5.725e-1



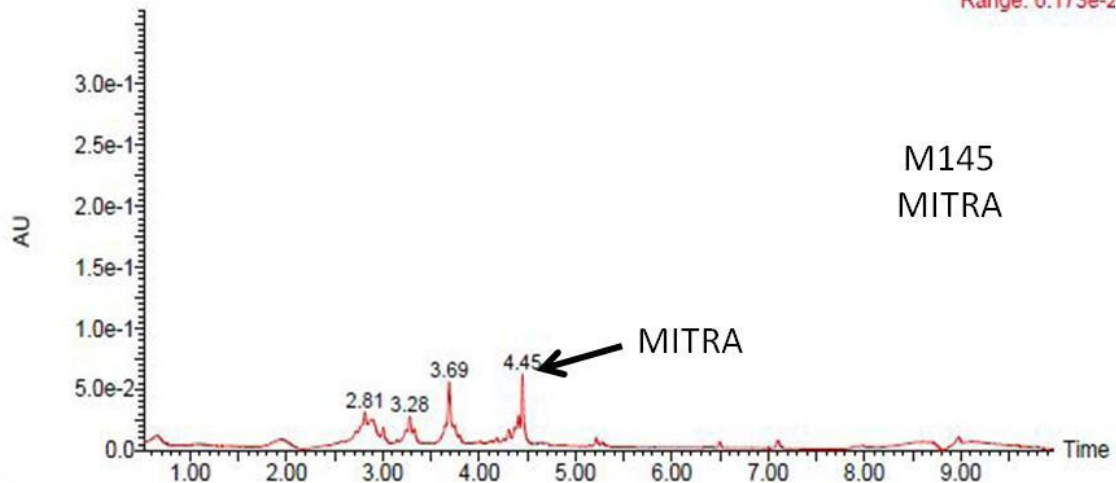
M1154
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

6. Mitramicina: Medio R5A, 3 días de crecimiento. Resultados 1.4, página 70.



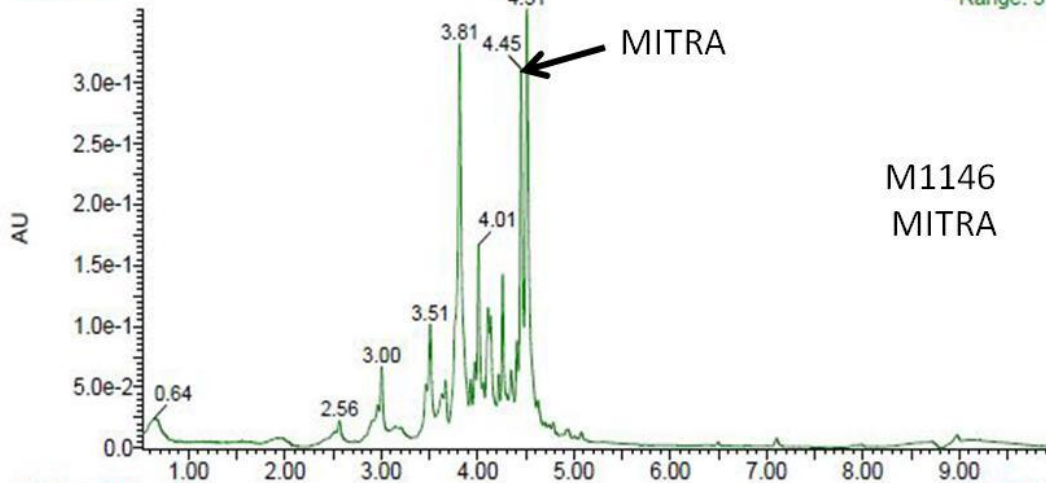
antibioticos523

2: Diode Array
Range: 6.173e-2



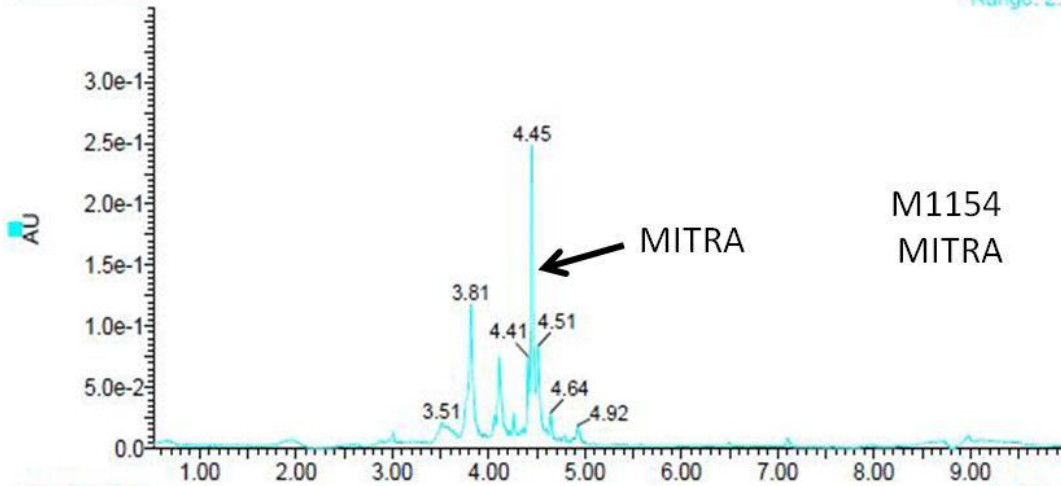
antibioticos524

2: Diode Array
Range: 3.604e-1



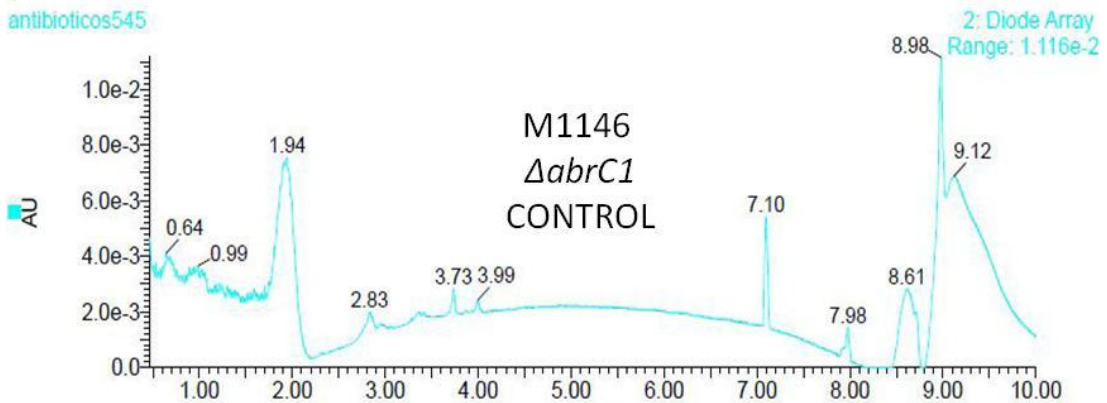
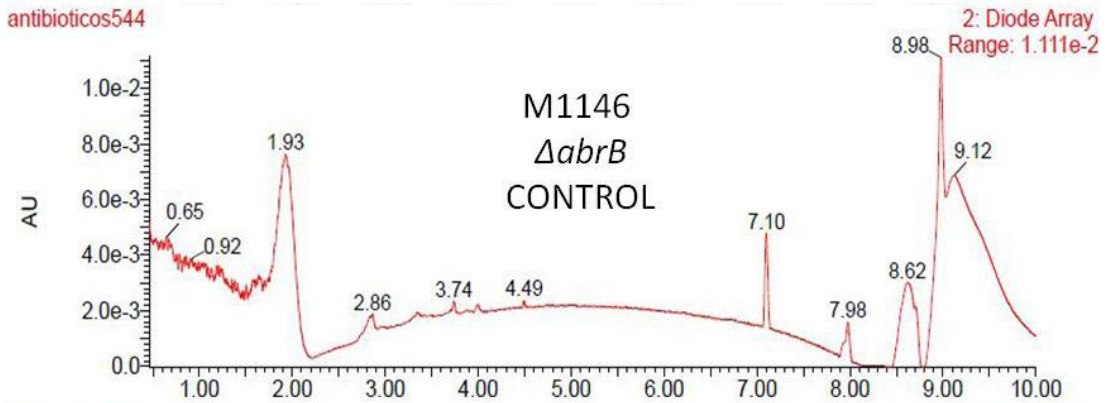
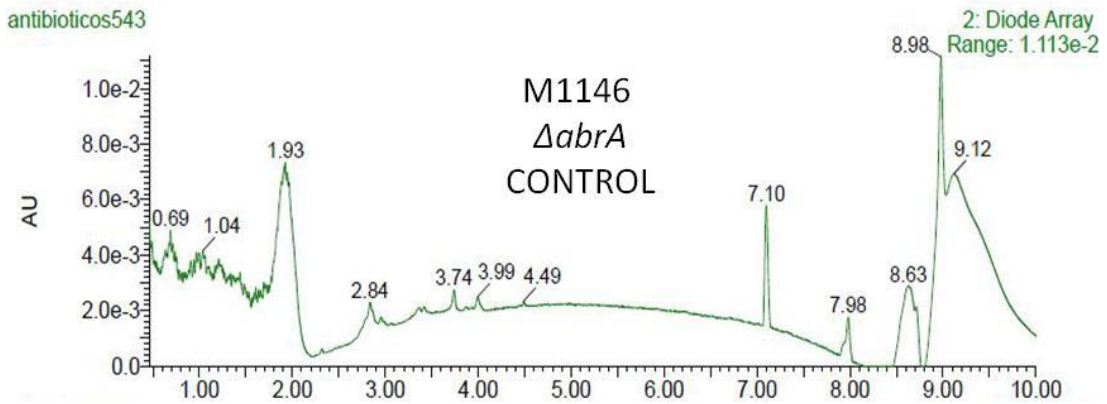
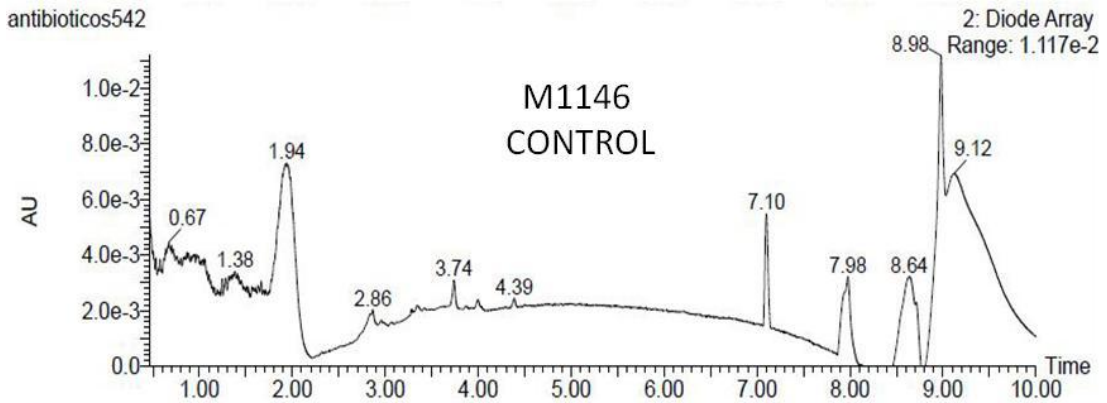
antibioticos525

2: Diode Array
Range: 2.483e-1

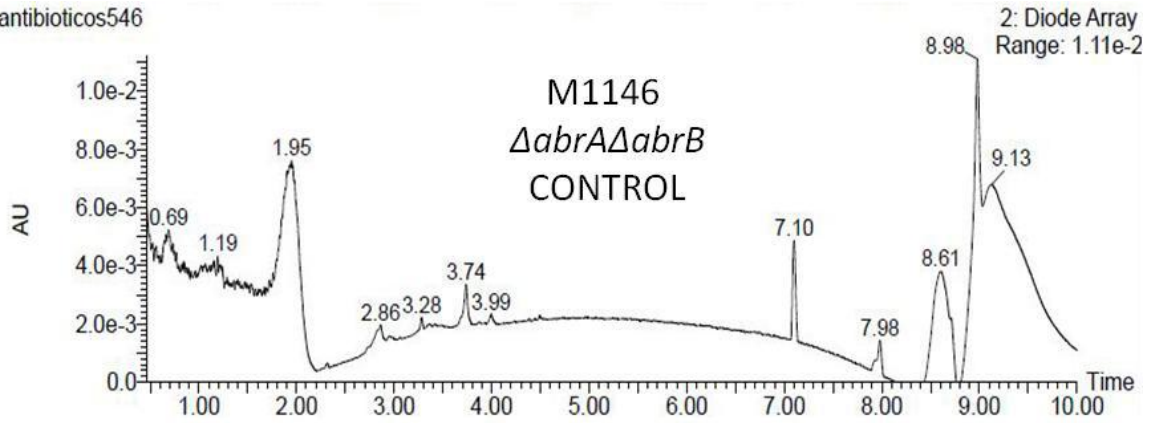


7. Mitramicina: Medio R5A, 3 días de crecimiento. Resultados 1.4, página 70.

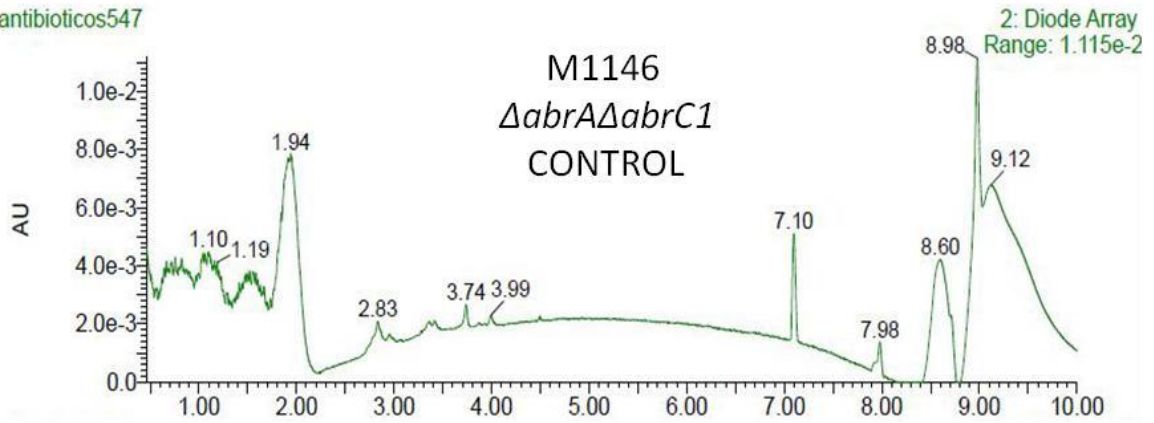
M1146



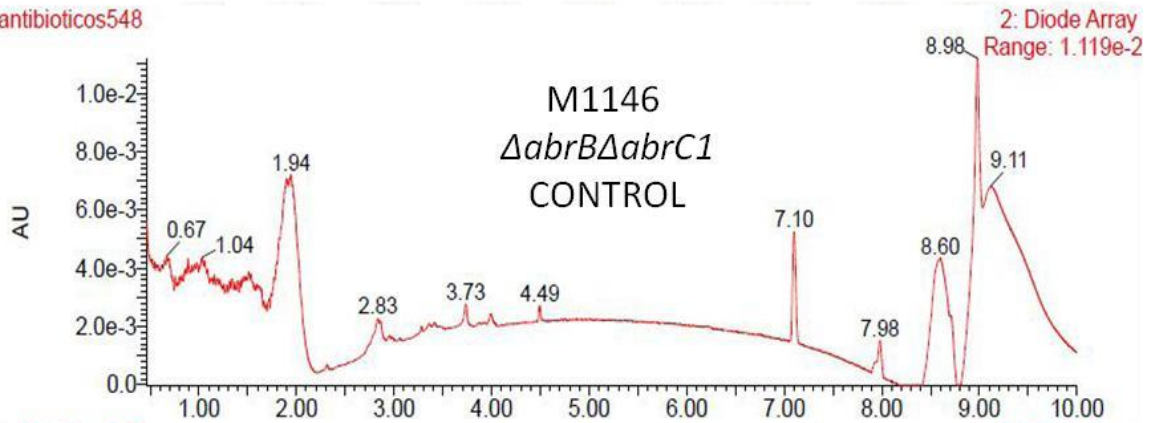
antibioticos546



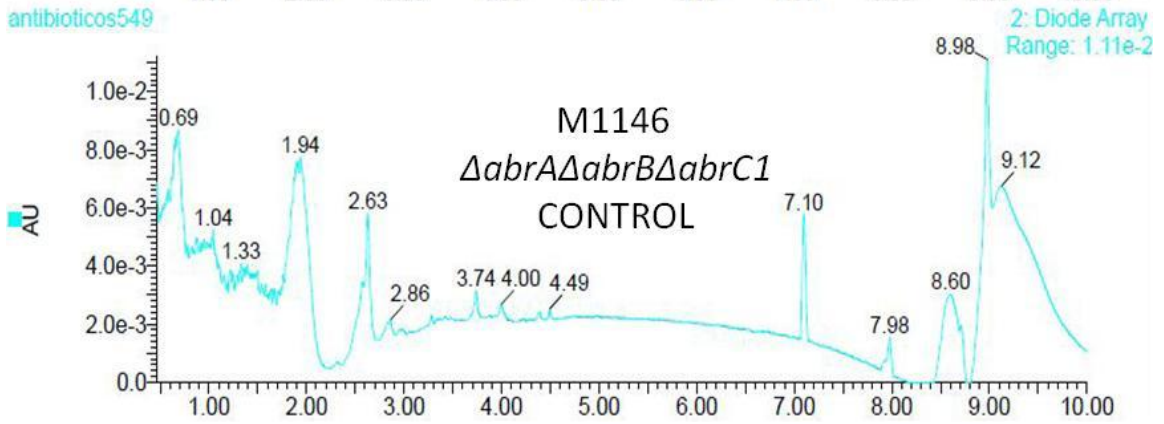
antibioticos547



antibioticos548

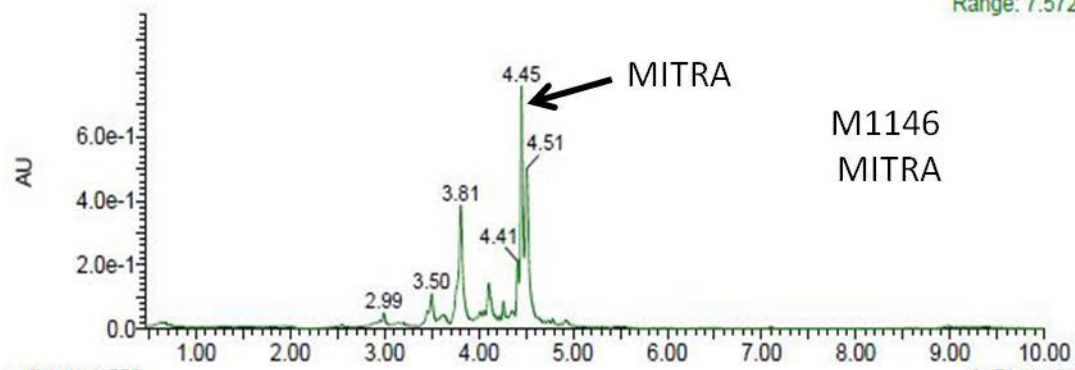


antibioticos549



antibioticos551

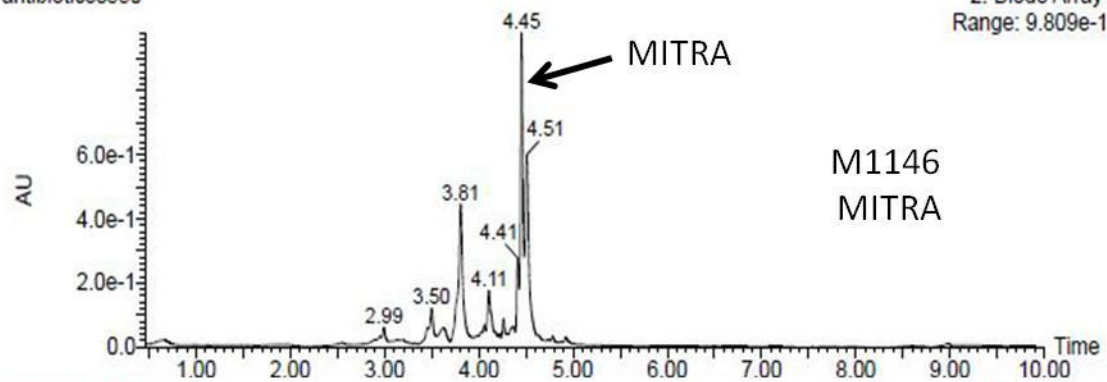
2: Diode Array
Range: 7.572e-1



M1146
MITRA

antibioticos550

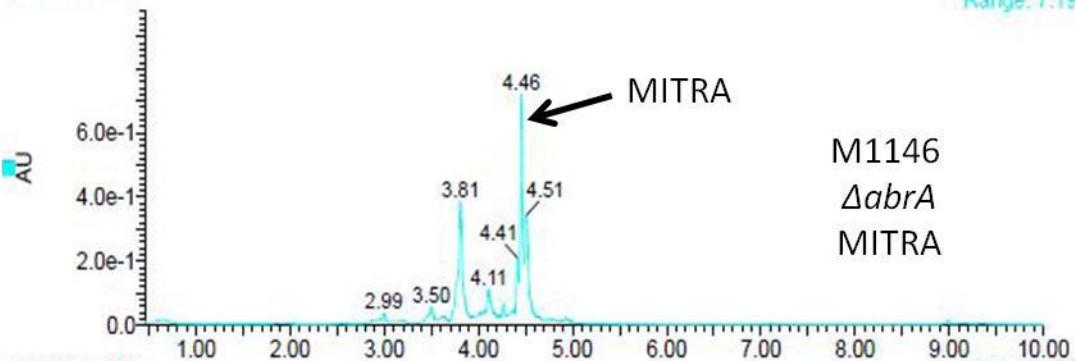
2: Diode Array
Range: 9.809e-1



M1146
MITRA

antibioticos553

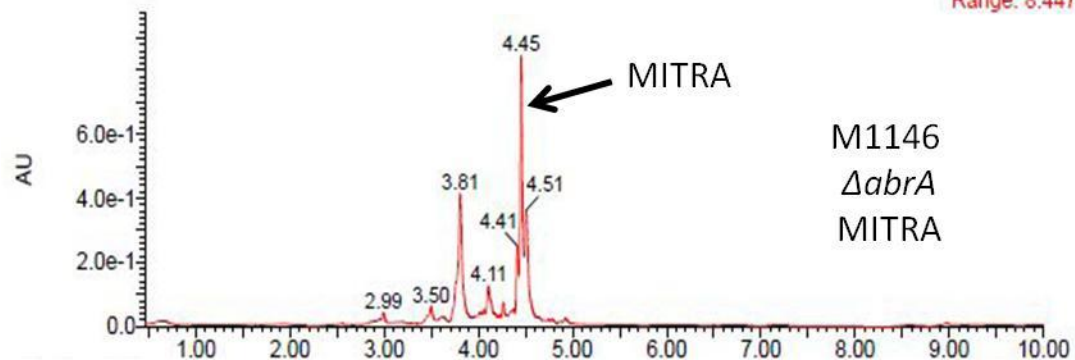
2: Diode Array
Range: 7.19e-1



M1146
ΔabrA
MITRA

antibioticos552

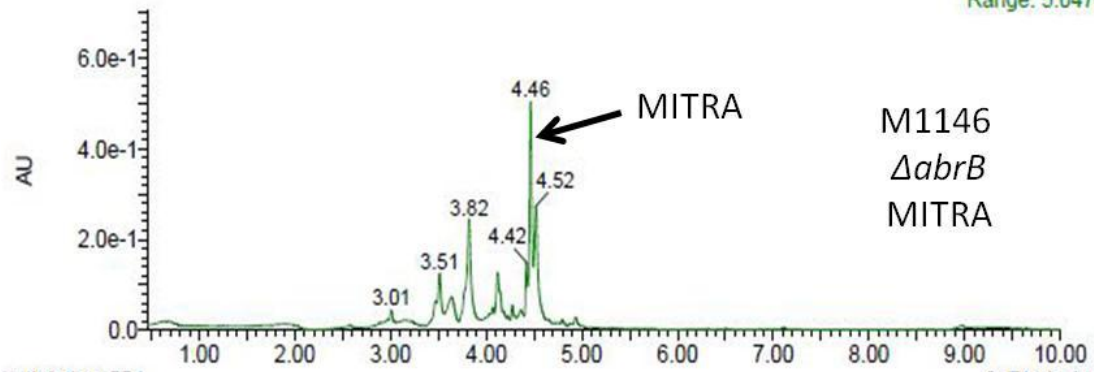
2: Diode Array
Range: 8.447e-1



M1146
ΔabrA
MITRA

antibioticos555

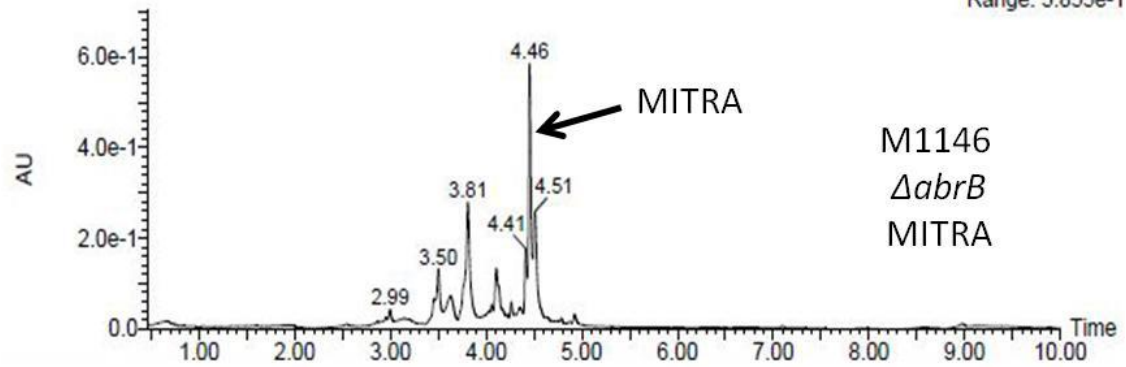
2: Diode Array
Range: 5.047e-1



M1146
 \DeltaabrB
MITRA

antibioticos554

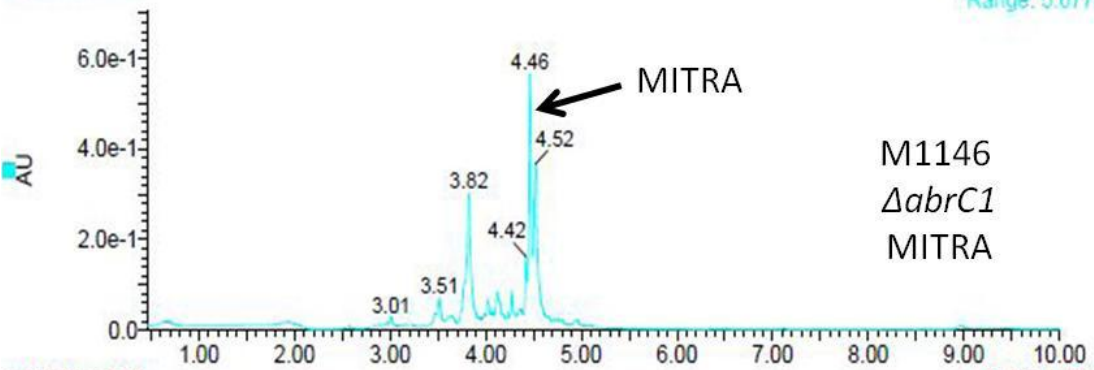
2: Diode Array
Range: 5.855e-1



M1146
 \DeltaabrB
MITRA

antibioticos557

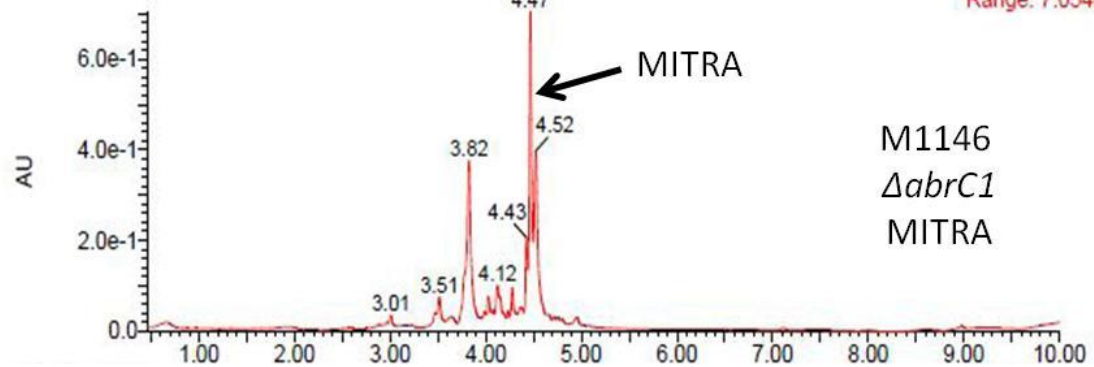
2: Diode Array
Range: 5.677e-1



M1146
 $\DeltaabrC1$
MITRA

antibioticos556

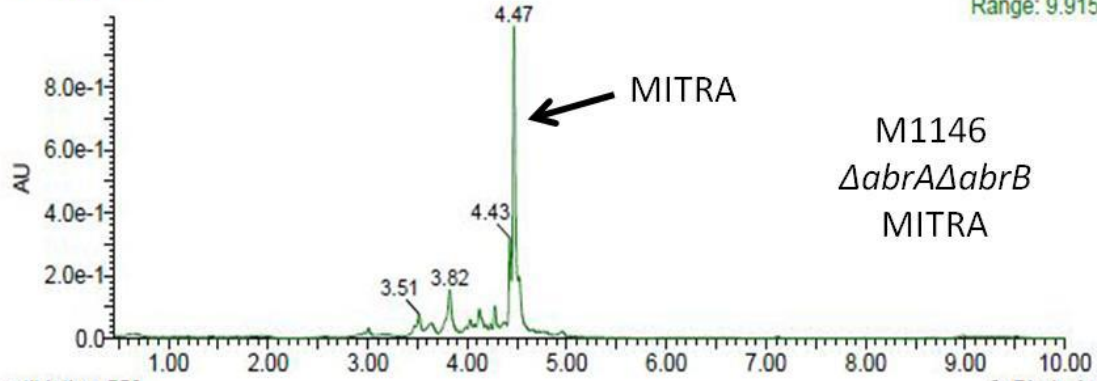
2: Diode Array
Range: 7.054e-1



M1146
 $\DeltaabrC1$
MITRA

antibioticos559

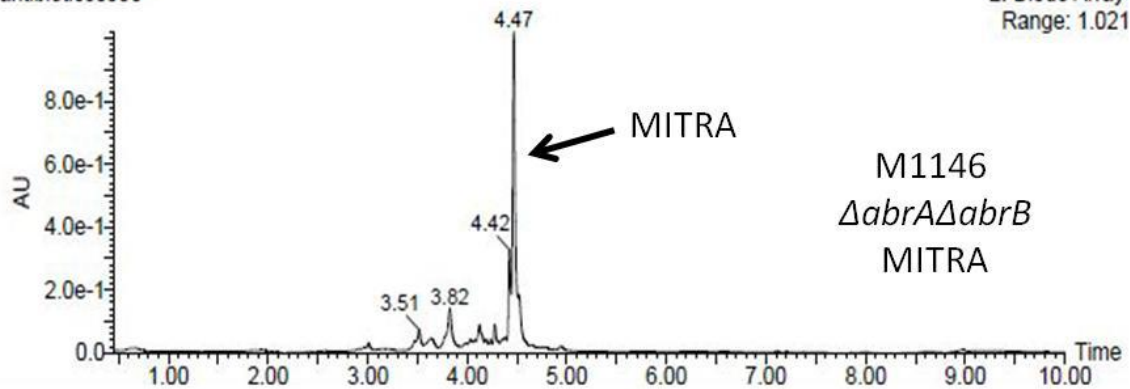
2: Diode Array
Range: 9.915e-1



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB$
MITRA

antibioticos558

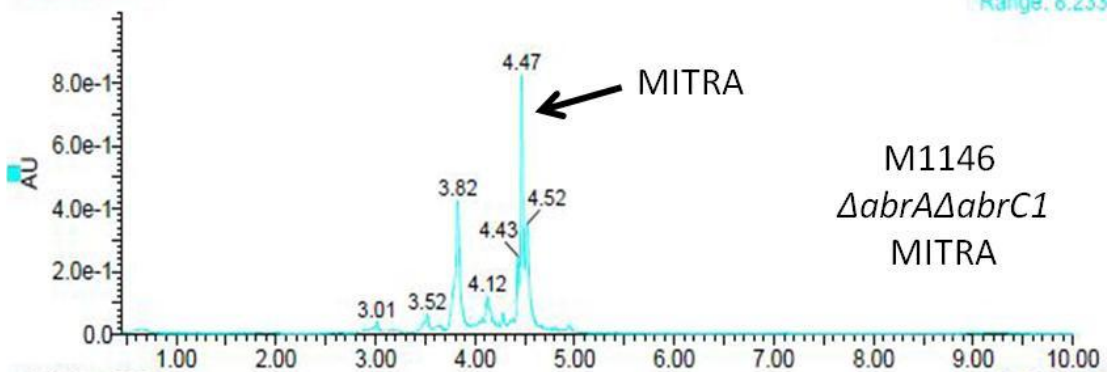
2: Diode Array
Range: 1.021



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB$
MITRA

antibioticos561

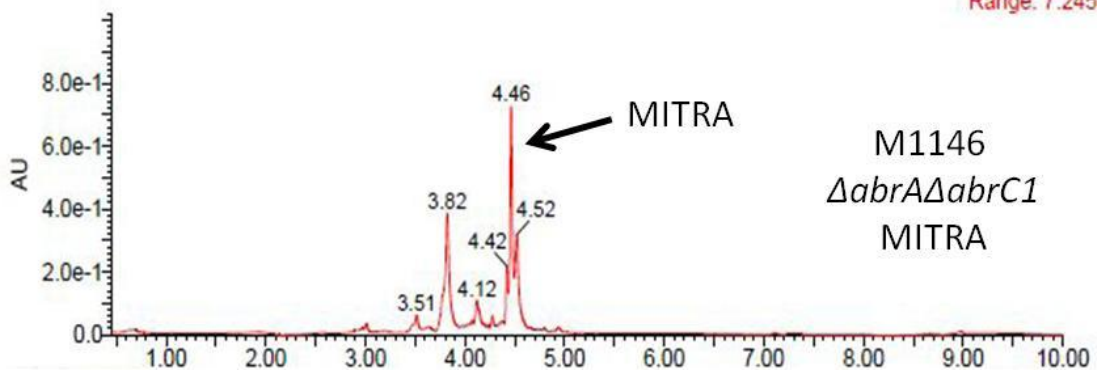
2: Diode Array
Range: 8.233e-1



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos560

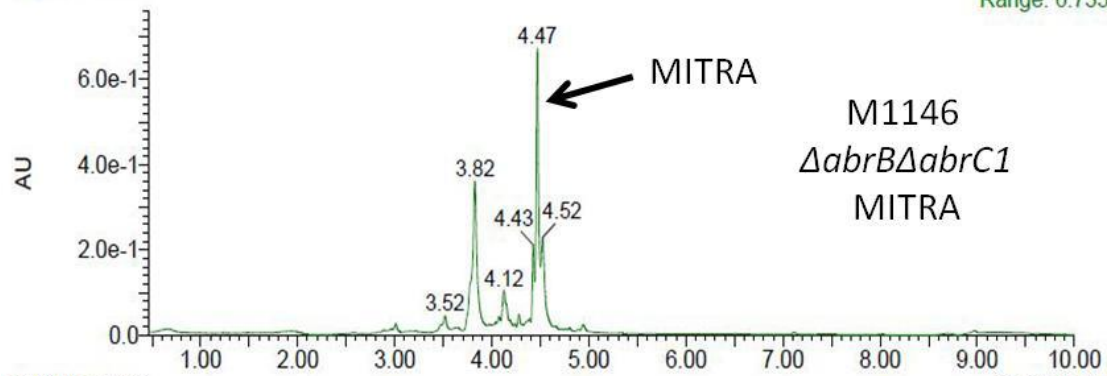
2: Diode Array
Range: 7.245e-1



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos563

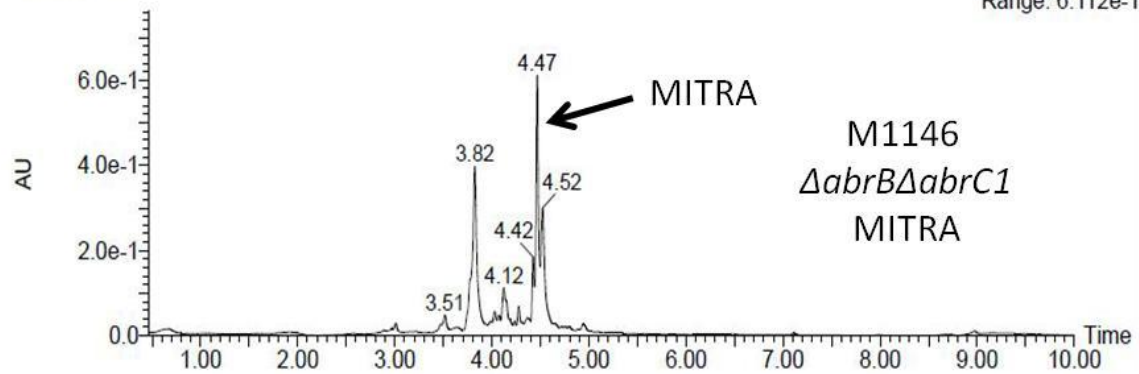
2: Diode Array
Range: 6.735e-1



M1146
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos562

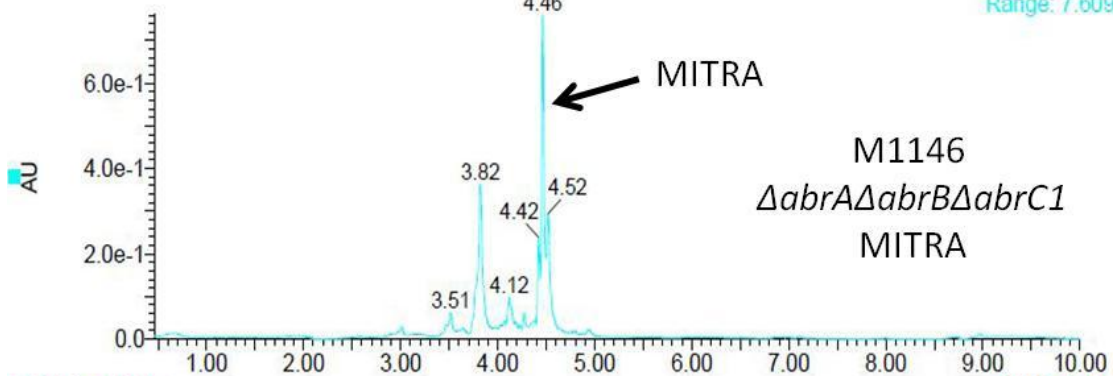
2: Diode Array
Range: 6.112e-1



M1146
 $\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos565

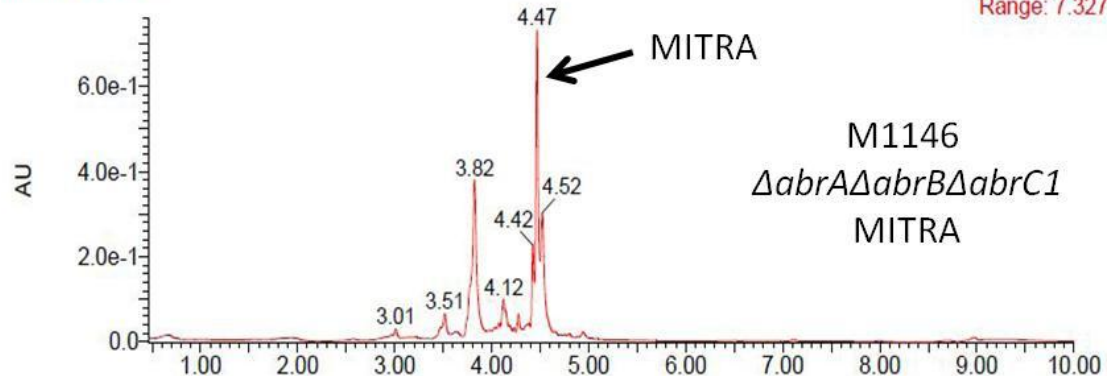
2: Diode Array
Range: 7.609e-1



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

antibioticos564

2: Diode Array
Range: 7.327e-1



M1146
 $\Delta abrA\Delta abrB\Delta abrC1$
MITRA

2518895	<i>SCO2364</i>	P-A	C	G	SNP en M145-uSAL	Conserved hypothetical protein
3392818	<i>SCO3109</i>	Cambio fase	cggggg	cGggggg	Delección en M145-2011	Putative transcriptional-repair coupling factor
3912416	<i>SCO3551</i>	A-E	G	A	SNP en M145-uSAL	Membrane spanning protein
4634053	<i>SCO4242</i>	R-L	C	T	SNP en M145-uSAL	Putative membrane protein
4912830	<i>SCO4507</i>	G-D	G	A	SNP en M145-uSAL	Putative serine/threonine protein kinase
4912835	<i>SCO4507</i>	W-R	T	C	SNP en M145-uSAL	Putative serine/threonine protein kinase
5211493	<i>SCO4801</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Delección en M145-2011	Hypothetical protein
5861792	<i>SCO5404</i>	Cambio fase	gCc	gc	Delección en M145-uSAL	Probable two-component sensor kinase
6025852	<i>SCO5544</i>	Cambio fase	aGgg	agg	Delección en M145-uSAL	Putative membrane protein
6457048	<i>SCO5903</i>	Cambio fase	gccccccc	gCccccccc	Delección en M145-2011	Pseudogene
6538392	<i>SCO5976</i>	Cambio fase	g	gTACGT	Inserción en M145-uSAL	Ornithine carbamoyltransferase
6538393	<i>SCO5976</i>	Cambio fase.	ga	gACGTCa	Delección en M145-2011	Ornithine carbamoyltransferase
6538396	<i>SCO5976</i>	Cambio fase	gt	gTCAGTt	Inserción en M145-uSAL	Ornithine carbamoyltransferase
6836182	<i>SCO6227</i>	9 aas -	gcgccgacgccccctcccgacggc gcccgg	gcgccg	Delección en M145-uSAL	Hypothetical protein
6876107	<i>SCO6263</i>	P-R	C	G	SNP en M145-uSAL	Conserved hypothetical protein
7544067	<i>SCO6794</i>	P-T	C	A	SNP en M145-uSAL	Putative membrane protein
7946013	<i>SCO7163</i>	Cambio fase	agggg	aGgggg	Delección en M145-2011	Putative transferase
8016319	<i>SCO7223</i>	P-P	G	A	SNP en M145-uSAL	Putative monooxygenase
8048809	<i>SCO7251</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Delección en M145-2011	Conserved hypothetical protein
8174378	<i>SCO7374</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Delección en M145-2011	Nitrate reductase NarB (fragment)
8174381	<i>SCO7374</i>	Cambio fase	g	gA	Inserción en M145-uSAL	Nitrate reductase NarB (fragment)
8252680	<i>SCO7450</i>	S-A	T	G	SNP en M145-uSAL	Putative secreted protein
8252683	<i>SCO7450</i>	Cambio fase	c	cT	Inserción en M145-uSAL	Putative secreted protein
8292695	<i>SCO7493</i>	T-P	A	C	SNP en M145-uSAL	Conserved hypothetical protein
8399008	<i>SCO7586</i>	Cambio fase	cggg	cGggg	Delección en M145-2011	Putative oxidoreductase

8399992	<i>SCO7587</i>	Cambio fase	ac	aCc	Delección en M145-2011	Putative integral membrane protein
8399993	<i>SCO7587</i>	Cambio fase	c	cA	Inserción en M145-uSAL	Putative integral membrane protein
8651071	<i>SCO7845</i>	Cambio fase	gcccc	gCcccc	Delección en M145-2011	Hypothetical protein
8652153	<i>SCO7845</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Delección en M145-2011	Hypothetical protein

1.2 SNP e indels en zonas intergénicas.

COORDENADA	INTERGÉNICA	M145-2011	M145-USAL	Comparación con referencia
83082	<i>SCO0120-SCO0121</i>	gcccc	gCcccc	Inserción en M145-uSAL
918308	<i>SCO0887-SCO0888</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
1124105	<i>SCO1078-SCO1079</i>	ccagccacagccacagccacagccacagccacagccacagccacagccac	ccagccacagccacagccacagccacagccacagccacagccacagccac	Delección en M145-uSAL
1322869	<i>SCO1267-SCO1268</i>	cggggg	cGggggg	Delección en M145-2011
1546880	<i>SCO1464-SCO1465</i>	cgggg	cGggg	Delección en M145-2011
1813362	<i>SCO1707-SCO1708</i>	agggg	aGggg	Delección en M145-2011
1837705	<i>SCO1734-SCO1735</i>	cggggggg	cGggggggg	Delección en M145-2011
2324403	<i>SCO2175-SCO2176</i>	accaccgcaccacgcgcaacgcgccccaccgaccc	accaccgcacc	Delección en M145-USAL
2348031	<i>SCO2195-SCO2196</i>	gcccc	gCcccc	Delección en M145-2011
2466422	<i>SCO2310-SCO2311</i>	cggggg	cGggggg	Inserción en M145-uSAL
2754520	<i>SCO2566-SCO2567</i>	A	G	SNP en M145-uSAL
2779306	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
2779308	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
2779310	<i>SCO2587-SCO2588</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
3624741	<i>SCO3290-SCO3291</i>	A	G	SNP en M145-uSAL
4055441	<i>SCO3688-SCO3689</i>	cggggggggg	cGggggggggg	Delección en M145-2011
4547359	<i>SCO4145-SCO4146</i>	T	A	SNP en M145-2011
4547579	<i>SCO4145-SCO4146</i>	A	T	SNP en M145-uSAL

4547583	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
4547587	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
4547590	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	A	SNP en M145-uSAL
4547595	<i>SCO4145-SCO4146</i>	G	T	SNP en M145-uSAL
4547598	<i>SCO4145-SCO4146</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
5396461	<i>SCO4974-SCO4975</i>	A	G	SNP en M145-uSAL
5396465	<i>SCO4974-SCO4975</i>	G	A	SNP en M145-uSAL
5681959	<i>SCO5235-SCO5236</i>	gcccc	gCcccc	Delección en M145-2011
5768018	<i>SCO5310-SCO5311</i>	gcccccc	gCcccccc	Delección en M145-2011
6198885	<i>SCO5699-SCO5700</i>	G	T	SNP en M145-uSAL
6742534	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	T	SNP en M145-uSAL
6742535	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742537	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742538	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742540	<i>SCO6153-SCO6154</i>	C	G	SNP en M145-uSAL
6742541	<i>SCO6153-SCO6154</i>	A	G	SNP en M145-uSAL
6752750	<i>SCO6161-SCO6162</i>	G	T	SNP en M145-uSAL
6752776	<i>SCO6161-SCO6162</i>	A	G	SNP en M145-uSAL
7717987	<i>SCO6963-SCO6964</i>	G	C	SNP en M145-uSAL
7747061	<i>SCO6991-SCO6992</i>	tcccc	tCcccc	Delección en M145-2011
8429591	<i>SCO7613-SCO7614</i>	cggggg	cGggggg	Delección en M145-2011

2. SNP e indels encontrados en los análisis de secuenciación de la cepa M145-2011 frente al genoma de referencia de *S. coelicolor* (M145 REF) (Bentley et al., 2002).

2.1 SNP e indels dentro de genes.

COORDENADA	GEN	EFEECTO	M145-2011	M145 REF	FUNCIÓN
88619	SCO0124	E-E	G	A	Hypothetical protein
246041	SCO0271	Cambio fase	cggg	cGggg	Binding-protein-dependent transport protein(SCO0271)
292448	SCO0311	Cambio fase	acccc	aCcccc	Ligase(SCO0311)
371412	SCO0373	Cambio fase	aggggg	aGggggg	Hypothetical protein(SCO0373)
500236	SCO0492	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Peptide synthetase(SCO0492)
544537	SCO0528	No	aGggggg	aGggggg	Lipoprotein(SCO0528)
603611	SCO0577	A-A	C	G	Conserved hypothetical protein
604417	SCO0578	G-G	C	G	Putative triosephosphate isomerase
631355	SCO0606	P-L	C	T	Hypothetical protein
641520	SCO0616	P-T	C	A	Conserved hypothetical protein
641520	SCO0617	D-D	G	T	Hypothetical protein
660464	SCO0634	Cambio fase	gCccc	gccc	Pseudo(SCO0634)
745338	SCO0717	Cambio fase	tgggg	tGgggg	Hypothetical protein(SCO0717)
1277823	SCO1122	Cambio fase	cggggg	cGggggg	Regulatory protein(SCO1122)
1239977	SCO1184	Cambio fase	tcccc	tCcccc	Hypothetical protein(SCO1184)
1399571	SCO1337	A-G	C	G	Putative oxidoreductase
1497304	SCO1417	Cambio fase	gceccc	gCceccc	GntR family transcriptional regulator(SCO1417)
1597508	SCO1508	Cambio fase	tgggg	tGgggg	Histidyl-tRNA synthetase(hisS)
1600698	SCO1511	Cambio fase	aGg	ag	Hypothetical protein(SCO1511)
1606938	SCO1516	N-Y	A	T	Protein-export membrane protein
1618553	SCO1528	E-D	G	C	Putative elongation factor

1619184	<i>SCO1529</i>	K-E	A	G	Putative membrane protein
1624463	<i>SCO1532</i>	R-R	C	A	Hypothetical protein
1624565	<i>SCO1532</i>	S-R	C	A	Hypothetical protein
1624650	<i>SCO1532</i>	G-A	G	C	Hypothetical protein
1628673	<i>SCO1536</i>	Q-H	G	T	Conserved hypothetical protein
1633547	<i>SCO1539</i>	T-T	G	C	Putative lipoprotein
1649116	<i>SCO1554</i>	Cambio fase	tggggg	tGggggg	Nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase(SCO1554)
1725210	<i>SCO1625</i>	L-F	C	T	Putative ribosomal pseudouridine synthase
1725210	<i>SCO1626</i>	E-E	G	A	Putative cytochrome P450
2049805	<i>SCO1933</i>	Cambio fase	gCcc	gcc	Hypothetical protein(SCO1933)
2310235	<i>SCO2162</i>	K-N	G	C	Putative quinolinate synthetase (fragment)
2325014	<i>SCO2177</i>	Cambio fase	acccc	aCcccc	Adenosylcobinamide-GDP ribazoletransferase(SCO2177)
2486424	<i>SCO2332</i>	L-V	C	G	Putative hydrolase
2840397	<i>SCO2628</i>	Cambio fase	gCcc	gcc	Amino acid permease(SCO2628)
2948046	<i>SCO2720</i>	Cambio fase	cggggg	cGggggg	Long-chain fatty acid ligase(SCO2720)
2960473	<i>SCO2729</i>	G-V	G	T	Putative acetyltransferase
3129452	<i>SCO2890</i>	Cambio fase	accc	aCccc	Pseudo(SCO2890)
3333213	<i>SCO3054</i>	L-P	T	C	Conserved hypothetical protein
3333443	<i>SCO3055</i>	A-P	G	C	Conserved hypothetical protein
3333740	<i>SCO3055</i>	R-G	C	G	Conserved hypothetical protein
3392555	<i>SCO3109</i>	Cambio fase	cggggg	cGggggg	Transcriptional-repair coupling factor(SCO3109)
3445119	<i>SCO3157</i>	Cambio fase	ac	aCc	Penicillin-binding protein(SCO3157)
4381838	<i>SCO4003</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Hypothetical protein(SCO4003)
4381801	<i>SCO4003</i>	R-G	C	G	Hypothetical protein
4423439	<i>SCO4046</i>	Cambio fase	gt	gTt	Hypothetical protein(SCO4046)
4506345	<i>SCO4117</i>	P-P	C	T	Putative membrane protein

4711286	<i>SCO4315</i>	V-L	G	C	Putative homeostasis protein
4897326	<i>SCO4493</i>	Cambio fase	aGgg	agg	Transcription regulator AsnC(SCO4493)
5001241	<i>SCO4594</i>	R-R	C	T	Putative oxidoreductase
5001442	<i>SCO4594</i>	A-A	C	G	Putative oxidoreductase
5001481	<i>SCO4594</i>	A-A	A	G	Putative oxidoreductase
5001935	<i>SCO4594</i>	E-G	A	G	Putative oxidoreductase
5002133	<i>SCO4595</i>	E-E	A	G	Putative oxidoreductase
5002203	<i>SCO4595</i>	G-V	G	T	Putative oxidoreductase
5002400	<i>SCO4595</i>	K-K	A	G	Putative oxidoreductase
5002740	<i>SCO4595</i>	Y-F	A	T	Putative oxidoreductase
5002802	<i>SCO4595</i>	R-R	C	G	Putative oxidoreductase
5028769	<i>SCO4620</i>	P-P	C	G	Putative sporulation-related protein
5078528	<i>SCO4664</i>	A-P	G	C	Putative integral membrane protein
5078528	<i>SCO4665</i>	A-A	C	G	Putative membrane protein
5080193	<i>SCO4665</i>	Alarga gen	G	T	Putative membrane protein
5091942	<i>SCO4676</i>	P-P	C	G	Hypothetical protein
5211230	<i>SCO4801</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Hypothetical protein(SCO4801)
5318646	<i>SCO4900</i>	Cambio fase	tccc	tCccc	Hypothetical protein(SCO4900)
5490248	<i>SCO5065</i>	D-A	A	C	Putative transcriptional regulator
5628668	<i>SCO5186</i>	Cambio fase	cTt	ct	Hypothetical protein(SCO5186)
5628528	<i>SCO5186</i>	Cambio fase	tgg	tGgg	Hypothetical protein(SCO5186)
5899169	<i>SCO5440</i>	Cambio fase	aCccc	acc	Glycogen branching protein(SCO5440)
5993140	<i>SCO5516</i>	T-N	C	A	Putative integral membrane efflux protein
6327538	<i>SCO5800</i>	L-F	C	T	Conserved hypothetical protein
6456785	<i>SCO5903</i>	Cambio fase	gccccccc	gCccccccc	Pseudo(SCO5903)
6538130	<i>SCO5976</i>	Cambio fase	ga	gACGTCa	Ornithine carbamoyltransferase(SCO5976)

6756868	<i>SCO6166</i>	S-S	C	A	Hypothetical protein
6756868	<i>SCO6167</i>	P-H	C	A	Proline rich protein (putative membrane protein)
6877455	<i>SCO6265</i>	T-T	T	C	Gamma-butyrolactone binding protein
7031149	<i>SCO6381</i>	G-G	C	T	Putative lipoprotein
7070825	<i>SCO6415</i>	Cambio fase	cCCGCGc	cc	Phenylhydantoinase(SCO6415)
7071720	<i>SCO6415</i>	G-G	A	C	Putative D-hydantoinase
7071720	<i>SCO6416</i>	D-A	A	C	Putative oxidoreductase
7105234	<i>SCO6436</i>	L-V	C	G	Putative tRNA synthetase
7133758	<i>SCO6458</i>	G-S	G	A	Conserved hypothetical protein
7167136	<i>SCO6487</i>	A-G	C	G	Putative aminoacylase
7170624	<i>SCO6489</i>	A-G	C	G	Conserved hypothetical protein
7190452	<i>SCO6512</i>	L-V	C	G	ABC transporter ATP-binding protein
7247970	<i>SCO6560</i>	V-L	G	C	Putative respiratory chain oxidoreductase
7271807	<i>SCO6578</i>	V-F	G	T	Hypothetical protein
7303694	<i>SCO6597</i>	T-T	C	A	Putative beta-glucosidase
7350981	<i>SCO6635</i>	N-K	C	G	Bacteriophage (phiC31) resistance gene pglY
7371705	<i>SCO6648</i>	Cambio fase	ggTgg	gggg	Hypothetical protein(SCO6648)
7379924	<i>SCO6657</i>	S-R	C	A	Putative membrane protein
7945750	<i>SCO7163</i>	Cambio fase	agggg	aGgggg	Transferase(SCO7163)
8031145	<i>SCO7236</i>	G-G	C	G	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome subunit B
8048546	<i>SCO7251</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Hypothetical protein(SCO7251)
8174115	<i>SCO7374</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Mitrate reductase NarB (fragment)(SCO7374)
8338474	<i>SCO7531</i>	Cambio fase	cgggg	cGgggg	Acytransferase(SCO7531)
8398745	<i>SCO7586</i>	Cambio fase	cggg	cGggg	Oxidoreductase(SCO7586)
8399729	<i>SCO7587</i>	Cambio fase	ac	aCc	Hypothetical protein(SCO7587)
8581134	<i>SCO7763</i>	L-L	C	T	Putative membrane protein

8582647	<i>SCO7766</i>	A-A	G	C	Conserved hypothetical protein
8650808	<i>SCO7845</i>	Cambio fase	gcccc	gCcccc	Hypothetical protein(SCO7845)
8651890	<i>SCO7845</i>	Cambio fase	cggggc	cGggggc	Hypothetical protein(SCO7845)

2.2 SNP e indels en zonas intergénicas.

COORDENADA	INTERGÉNICA	M145-2011	M145 REF
82819	<i>SCO0119-SCO0120</i>	gcccc	gCcccc
534263	<i>SCO0514-SCO0515</i>	acccc	aCcccc
587799	<i>SCO0560-SCO0561</i>	G	A
1095114	<i>SCO1054-SCO1055</i>	aCcccc	acccc
1322606	<i>SCO1267-SCO1268</i>	cggggg	cGggggg
1546617	<i>SCO1464-SCO1465</i>	cgggg	cGgggg
1600987	<i>SCO1512-SCO1513</i>	G	T
1610323	<i>SCO1520-SCO1521</i>	A	G
1626456	<i>SCO1534-SCO1535</i>	A	C
1630011	<i>SCO1536-SCO1537</i>	aGg	ag
1630070	<i>SCO1536-SCO1537</i>	G	A
1633869	<i>SCO1539-SCO1540</i>	aggg	aGggg
1633949	<i>SCO1539-SCO1540</i>	aa	aGa
1643418	<i>SCO1550-SCO1551</i>	cAa	ca
1749637	<i>SCO1650-SCO1651</i>	aGgg	agg
1813099	<i>SCO1707-SCO1708</i>	agggg	aGgggg
1837442	<i>SCO1734-SCO1735</i>	cggggggg	cGggggggg
2347768	<i>SCO2195-SCO2196</i>	gcccc	gCcccc
2436750	<i>SCO2282-SCO2283</i>	G	C

2443380	<i>SCO2287-SCO2288</i>	gCc	gc
2443416	<i>SCO2287-SCO2288</i>	cGg	cg
2466159	<i>SCO2310-SCO2311</i>	cggggg	cGggggg
2517858	<i>SCO2363-SCO2364</i>	G	A
3039073	<i>SCO2797-SCO2798</i>	aCcc	acc
3079716	<i>SCO2835-SCO2836</i>	cGggggg	cggggg
3231152	<i>SCO2980-SCO2981</i>	gCccc	gccc
3652309	<i>SCO3316-SCO3317</i>	C	G
3664867	<i>SCO3328-SCO3329</i>	C	A
3690807	<i>SCO3347-SCO3348</i>	cggggggg	cGggggggg
3942575	<i>SCO3579-SCO3580</i>	C	T
4055178	<i>SCO3688-SCO3689</i>	cgggggggg	cGggggggg
4361676	<i>SCO3974-SCO3975</i>	cgggggggg	cGggggggg
4386090	<i>SCO4007-SCO4008</i>	tccc	tCccc
4547096	<i>SCO4145-SCO4146</i>	T	A
5427673	<i>SCO5004-SCO5005</i>	aGc	ac
5461747	<i>SCO5039-SCO5040</i>	aGggg	aggg
5464350	<i>SCO5040-SCO5041</i>	cGggggg	cggggg
5480703	<i>SCO5056-SCO5057</i>	T	C
5618386	<i>SCO5181-SCO5182</i>	G	C

5681696	<i>SCO5235-SCO5236</i>	gcccc	gCcccc
5738223	<i>SCO5281-SCO5282</i>	tc	tCc
5746586	<i>SCO5288-SCO5289</i>	cGg	cg
5767755	<i>SCO5310-SCO5311</i>	gcccccc	gCcccccc
5877485	<i>SCO5242-SCO5243</i>	gCg	gg
6213866	<i>SCO5711-SCO5712</i>	tGCGTCTg	tg
6337609	<i>SCO5805-SCO5806</i>	gCc	gc
6357201	<i>SCO5821-SCO5822</i>	aGg	ag
6429624	<i>SCO5885-SCO5886</i>	cggggggg	cGgggggg

6870914	<i>SCO6261-SCO6262</i>	gcccc	gCcccc
7539489	<i>SCO6791-SCO6792</i>	tc	tCc
7746798	<i>SCO6991-SCO6992</i>	tcgcc	tCcccc
7846610	<i>SCO7069-7070</i>	A	C
7991882	<i>SCO7201-7202</i>	G	A
8150460	<i>SCO7350-7351</i>	C	T
8275174	<i>SCO7475-SCO7476</i>	tgGa	tga
8429328	<i>SCO7613-SCO7614</i>	cggggg	cGggggg
8599356	<i>SCO7785-SCO7786</i>	C	A

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdano-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.

ANEXO III

Genes expresados diferencialmente (FC>2, FDR<0,05) en el mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 a 24 horas. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante. Funciones predichas mediante DAVID. SM: *Secondary metabolites* (metabolitos secundarios). RP: *Regulatory protein* (proteína reguladora). MB: *Membrane protein* (proteína de membrana). GV: *Gas Vesicle Proteins* (proteínas de vesículas de gas). HP: *Hypothetical protein* (proteína hipotética). S: *Secreted protein* (proteína secretada). O: *Other function* (otra función).

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER
<i>SCO0161</i>	2,33E+00	8,66E-05	5,47E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0175</i>	3,01E+00	2,10E-30	2,50E-28	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0406</i>	1,28E+01	1,16E-175	2,59E-172	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0407</i>	2,95E+00	1,41E-65	9,39E-63	Transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO0423</i>	2,38E+00	2,76E-05	2,01E-04	Membrane transport protein (MB)	
<i>SCO0573</i>	2,27E+00	1,81E-07	2,25E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0644</i>	3,63E+00	4,79E-62	2,46E-59	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0678</i>	-2,11E+00	3,01E-15	1,08E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0750</i>	-2,33E+00	1,70E-13	5,34E-12	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0752</i>	5,28E+00	1,02E-25	8,81E-24	Protease (O)	
<i>SCO0759</i>	-2,58E+00	1,29E-11	3,21E-10	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0814</i>	2,22E+00	4,72E-05	3,22E-04	Rhamnose kinase (O)	
<i>SCO0870</i>	-2,07E+00	1,56E-33	2,37E-31	Two-component system response regulator (RP)	
<i>SCO0896</i>	-2,58E+00	2,72E-06	2,52E-05	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO0897</i>	-2,64E+00	4,79E-21	2,86E-19	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0930</i>	3,68E+00	5,07E-71	3,76E-68	Lipoprotein (MB)	

SCO1357	2,68E+00	1,39E-15	5,15E-14	Hypothetical protein (HP)	
SCO2217	2,43E+00	1,98E-41	4,13E-39	Hypothetical protein (HP)	
SCO2218	2,46E+00	2,24E-08	3,37E-07	Lipoprotein (MB)	
SCO2408	2,68E+00	1,24E-22	8,32E-21	Aminotransferase (O)	
SCO2495	3,97E+00	3,09E-49	8,25E-47	Hypothetical protein (HP)	
SCO2629	2,01E+00	8,49E-08	1,13E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO2728	-2,31E+00	1,45E-10	3,02E-09	Hypothetical protein (HP)	
SCO2783	2,66E+00	9,87E-09	1,59E-07	Monooxygenase (SM)	Desferrioxamina SCO2782-2785
SCO3071	-2,14E+00	1,14E-16	4,69E-15	N-formimino-L-glutamate deiminase (O)	
SCO3072	-2,17E+00	2,24E-29	2,41E-27	Allantoate amidohydrolase (O)	
SCO3073	-2,20E+00	3,58E-54	1,20E-51	Urocanate hydratase (O)	
SCO3281	-2,10E+00	6,16E-06	5,19E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO3445	2,08E+00	3,16E-10	6,34E-09	Small membrane protein (MB)	
SCO3448	2,22E+00	6,99E-15	2,42E-13	Hypothetical protein (HP)	
SCO3570	2,20E+00	2,73E-21	1,66E-19	Hypothetical protein (HP)	
SCO4007	2,73E+00	4,69E-30	5,41E-28	Hypothetical protein (HP)	
SCO4027	-2,91E+00	8,98E-62	4,00E-59	Anti sigma factor antagonist (RP)	
SCO4028	-3,97E+00	1,12E-90	1,49E-87	Hypothetical protein (HP)	
SCO4029	-2,69E+00	1,12E-47	2,88E-45	Hypothetical protein (HP)	
SCO4174	-1,35E+01	3,88E-56	1,44E-53	Hypothetical protein (HP)	
SCO4175	-7,78E+00	3,28E-94	5,47E-91	Hypothetical protein (HP)	
SCO4214	-4,59E+00	1,21E-35	2,02E-33	AbaA-like regulatory protein (RP)	
SCO4262	2,08E+00	3,50E-09	6,06E-08	Hypothetical protein (HP)	
SCO4563	-2,01E+00	1,59E-26	1,47E-24	NADH dehydrogenase subunit B (O)	

SCO4615	5,86E+00	2,61E-49	7,28E-47	Integrase (O)
SCO4617	3,58E+00	2,20E-35	3,58E-33	ATP-binding protein (O)
SCO4618	4,29E+00	1,15E-16	4,70E-15	Hypothetical protein (HP)
SCO4619	6,23E+00	3,70E-19	1,87E-17	Hypothetical protein (HP)
SCO4620	4,06E+00	7,26E-39	1,43E-36	Sporulation-like protein (O)
SCO4621	5,17E+00	6,58E-33	9,56E-31	Sporulation-like protein (O)
SCO4622	5,03E+00	8,49E-23	5,79E-21	Hypothetical protein (HP)
SCO4623	2,77E+00	1,14E-24	8,76E-23	Hypothetical protein (HP)
SCO4624	4,38E+00	9,55E-15	3,29E-13	Hypothetical protein (HP)
SCO4625	4,99E+00	3,30E-78	3,68E-75	Hypothetical protein (HP)
SCO4626	3,86E+00	1,48E-50	4,50E-48	Hypothetical protein (HP)
SCO4627	5,82E+00	6,04E-62	2,88E-59	Hypothetical protein (HP)
SCO4634	2,36E+00	2,58E-37	4,79E-35	Hydrolase (O)
SCO4635	2,19E+00	1,89E-29	2,07E-27	50S ribosomal protein L33 (O)
SCO4647	2,01E+00	1,25E-59	4,93E-57	Transcription antitermination protein (RP)
SCO4664	2,55E+00	6,40E-08	8,78E-07	Hypothetical protein (HP)
SCO4665	2,75E+00	2,77E-07	3,28E-06	Hypothetical protein (HP)
SCO4666	2,89E+00	3,47E-08	5,06E-07	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
SCO4668	2,19E+00	1,53E-34	2,38E-32	Two-component system response regulator (RP)
SCO4670	2,39E+00	4,13E-07	4,68E-06	Serine protease (S)
SCO4671	2,33E+00	8,74E-32	1,18E-29	LysR family transcriptional regulator (RP)

<i>SCO4681</i>	2,68E+00	2,15E-25	1,79E-23	Short chain dehydrogenase (O)	
<i>SCO4682</i>	3,01E+00	8,76E-23	5,91E-21	Tautomerase (O)	
<i>SCO4686</i>	2,28E+00	8,66E-09	1,41E-07	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4691</i>	2,48E+00	1,00E-18	4,85E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4693</i>	2,27E+00	7,55E-26	6,63E-24	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4724</i>	2,14E+00	3,09E-42	6,66E-40	Methionine aminopeptidase (O)	
<i>SCO4733</i>	2,28E+00	9,59E-16	3,64E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4736</i>	2,13E+00	1,12E-61	4,69E-59	Phosphoglucosamine mutase (O)	
<i>SCO4739</i>	2,97E+00	1,84E-31	2,33E-29	Lipoprotein (MB)	
<i>SCO4743</i>	2,22E+00	4,25E-33	6,31E-31	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4746</i>	2,38E+00	3,60E-62	2,00E-59	Lipase (O)	
<i>SCO4748</i>	2,08E+00	2,66E-20	1,51E-18	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4753</i>	2,43E+00	5,06E-30	5,73E-28	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5121</i>	2,31E+00	1,50E-06	1,50E-05	Peptide transport system ATP-binding protein (MB)	
<i>SCO5531</i>	2,13E+00	1,30E-06	1,32E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5790</i>	2,16E+00	8,05E-19	3,98E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5895</i>	-2,14E+00	8,54E-05	5,40E-04	Methyltransferase (SM)	RED SCO5877-5898
<i>SCO5966</i>	-2,11E+00	5,66E-20	3,12E-18	Oxidase (O)	
<i>SCO5987</i>	-2,08E+00	2,54E-19	1,30E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6037</i>	2,31E+00	2,45E-06	2,30E-05	Transmembrane transport protein (MB)	
<i>SCO6180</i>	-3,34E+00	1,00E-07	1,30E-06	Transferase (O)	
<i>SCO6185</i>	-2,66E+00	6,51E-04	3,16E-03	Transferase (O)	
<i>SCO6345</i>	2,83E+00	5,48E-10	1,05E-08	Chitinase (S)	

SCO6496	-2,38E+00	1,12E-11	2,81E-10	Dehydrogenase (O)	
SCO6497	-3,05E+00	3,55E-20	1,98E-18	Transketolase (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6499	-2,28E+00	8,47E-21	4,92E-19	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6500	-2,19E+00	1,30E-15	4,86E-14	Gas vesicle synthesis-like protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6501	-2,58E+00	2,91E-25	2,37E-23	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6505	-2,10E+00	9,70E-06	7,82E-05	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6513	-2,95E+00	3,90E-17	1,65E-15	Hypothetical protein (HP)	
SCO6515	-2,36E+00	1,84E-17	8,10E-16	Protease (O)	
SCO6516	-3,41E+00	7,64E-24	5,55E-22	Hypothetical protein (HP)	
SCO6520	-6,50E+00	1,55E-198	1,04E-194	RNA polymerase sigma factor SigK (RP)	
SCO6521	-3,78E+00	3,04E-14	1,01E-12	Hypothetical protein (HP)	
SCO6651	2,23E+00	3,66E-08	5,31E-07	Glycosyl transferase (O)	
SCO6653	2,06E+00	4,09E-10	8,07E-09	Hypothetical protein (HP)	
SCO6682	2,17E+00	6,82E-10	1,28E-08	Hypothetical protein (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina SCO6681-6685
SCO6706	-2,13E+00	2,10E-10	4,28E-09	Glutathione-dependent aldehyde dehydrogenase (O)	
SCO6715	2,06E+00	6,66E-05	4,37E-04	Transcriptional regulator (RP)	
SCO6728	2,07E+00	2,83E-22	1,85E-20	Hypothetical protein (HP)	
SCO6809	-6,32E+00	1,18E-12	3,32E-11	Integral membrane transport protein (MB)	
SCO6810	-2,97E+01	2,22E-73	2,12E-70	Hypothetical protein (HP)	
SCO6811	-1,79E+01	1,26E-192	4,22E-189	Hypothetical protein (HP)	
SCO6964	-2,36E+00	7,11E-08	9,67E-07	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO6965</i>	-2,58E+00	2,44E-10	4,93E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6992</i>	2,45E+00	1,07E-18	5,13E-17	Regulatory protein (RP)
<i>SCO7010</i>	-2,23E+00	4,87E-08	6,90E-07	Alpha glucosidase (O)
<i>SCO7012</i>	-2,30E+00	6,42E-06	5,39E-05	Binding protein dependent transport protein (MB)
<i>SCO7013</i>	-2,33E+00	9,34E-27	8,92E-25	Sugar-binding lipoprotein (MB)
<i>SCO7014</i>	-2,00E+00	1,52E-25	1,29E-23	LacI family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO7070</i>	2,30E+00	7,24E-07	7,82E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7236</i>	-2,79E+00	3,48E-23	2,45E-21	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome subunit B (O)
<i>SCO7237</i>	-2,30E+00	9,83E-25	7,64E-23	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7238</i>	-2,17E+00	1,45E-10	3,02E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7287</i>	-2,45E+00	2,26E-07	2,74E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7314</i>	-3,18E+00	8,49E-33	1,21E-30	RNA polymerase sigma factor SigM (RP)
<i>SCO7316</i>	-2,43E+00	2,54E-16	1,01E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7317</i>	-2,07E+00	2,65E-07	3,16E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7374</i>	-2,79E+00	8,15E-19	4,01E-17	Nitrate reductase NarB (fragment) (O)
<i>SCO7378</i>	-2,01E+00	4,69E-06	4,07E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7381</i>	-2,23E+00	1,37E-06	1,38E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7383</i>	2,03E+00	4,04E-11	9,28E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7388</i>	-2,43E+00	6,67E-06	5,58E-05	Dehydrogenase (O)
<i>SCO7412</i>	-2,60E+00	1,02E-29	1,13E-27	Thiamine pyrophosphate protein (O)

<i>SCO7413</i>	-2,46E+00	2,57E-07	3,09E-06	Short chain dehydrogenase (O)
<i>SCO7428</i>	2,45E+00	9,28E-25	7,36E-23	Flavoheprotein (O)
<i>SCO7489</i>	2,06E+00	1,02E-04	6,27E-04	Binding protein dependent transport lipoprotein (MB)
<i>SCO7607</i>	2,11E+00	1,35E-17	6,09E-16	Hydrolase (S)

ANEXO IV

Genes expresados diferencialmente (FC>2, FDR<0,05) en el mutante *ΔabrA* con respecto a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 a 36 horas. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante. Funciones predichas mediante DAVID. SM: *Secondary metabolites* (metabolitos secundarios). RP: *Regulatory protein* (proteína reguladora). MB: *Membrane protein* (proteína de membrana). GV: *Gas Vesicle Proteins* (proteínas de vesículas de gas). HP: *Hypothetical protein* (proteína hipotética). S: *Secreted protein* (proteína secretada). O: *Other function* (otra función).

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER
<i>SCO0021</i>	-2,50E+00	4,31E-09	4,04E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0040</i>	6,32E+00	4,42E-03	1,19E-02	Glycosyl transferase (O)	
<i>SCO0044</i>	2,83E+00	1,50E-03	4,76E-03	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO0064</i>	2,55E+00	4,75E-03	1,27E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0068</i>	7,62E+00	4,38E-04	1,64E-03	Hydrolase (O)	
<i>SCO0069</i>	5,46E+00	2,33E-04	9,35E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0081</i>	-3,05E+00	8,06E-09	7,23E-08	Pseudo (O)	
<i>SCO0124</i>	-2,30E+00	3,13E-19	9,87E-18	Hypothetical protein (SM)	Ácido eicosapentaenoico <i>SCO0124-0129</i>
<i>SCO0125</i>	-2,62E+00	1,62E-13	2,78E-12	Oxidoreductase (SM)	Ácido eicosapentaenoico <i>SCO0124-0129</i>
<i>SCO0131</i>	2,50E+00	1,79E-02	3,88E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0141</i>	-3,46E+00	1,39E-51	3,31E-49	Calcium-binding protein (O)	
<i>SCO0152</i>	2,07E+00	1,18E-02	2,73E-02	Transmembrane transport protein (MB)	
<i>SCO0159</i>	3,39E+00	2,09E-02	4,44E-02	ECF sigma factor (RP)	
<i>SCO0163</i>	-2,36E+00	6,15E-14	1,12E-12	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0164</i>	-2,11E+00	1,91E-15	4,05E-14	Cation-transporting ATPase (MB)	
<i>SCO0166</i>	-2,27E+00	5,19E-14	9,56E-13	Regulator (RP)	
<i>SCO0172</i>	-2,23E+00	1,67E-09	1,64E-08	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO0179</i>	-2,10E+00	2,61E-13	4,38E-12	Zinc-containing dehydrogenase (O)	
<i>SCO0188</i>	-2,23E+00	2,67E-21	9,73E-20	Methylesterase (SM)	Isorenierateno <i>SCO0185-0191</i>
<i>SCO0209</i>	-2,17E+00	3,83E-10	4,07E-09	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0221</i>	-3,20E+00	1,09E-15	2,39E-14	Pseudo (O)	
<i>SCO0231</i>	-2,62E+00	1,19E-19	3,94E-18	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0243</i>	-2,13E+00	4,45E-14	8,28E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0258</i>	2,69E+00	1,54E-02	3,39E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0268</i>	-2,55E+00	7,32E-29	4,70E-27	Hypothetical protein (SM)	Lantibiótico <i>SCO0267-0270</i>
<i>SCO0281</i>	3,32E+00	7,48E-03	1,86E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0293</i>	6,32E+00	2,61E-05	1,33E-04	Beta-xylosidase (O)	
<i>SCO0311</i>	4,96E+00	4,98E-03	1,32E-02	Ligase (O)	
<i>SCO0313</i>	3,10E+00	9,57E-03	2,30E-02	Transmembrane transport protein (MB)	
<i>SCO0315</i>	-4,66E+00	8,05E-67	3,50E-64	Decarboxylase (O)	
<i>SCO0320</i>	2,06E+00	1,21E-21	4,52E-20	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0324</i>	3,20E+00	5,58E-03	1,45E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0330</i>	2,16E+00	1,05E-02	2,49E-02	3-ketoacyl-ACP reductase (O)	
<i>SCO0331</i>	2,23E+00	6,26E-03	1,60E-02	Short chain oxidoreductase (O)	
<i>SCO0338</i>	2,43E+00	1,37E-02	3,09E-02	Dehydrogenase (O)	
<i>SCO0339</i>	3,27E+00	1,20E-04	5,22E-04	Dehydrogenase (O)	
<i>SCO0341</i>	4,63E+00	1,24E-03	4,02E-03	Large hypothetical protein (O)	
<i>SCO0348</i>	2,66E+00	2,24E-02	4,70E-02	2-hydroxyacid dehydrogenase (O)	
<i>SCO0349</i>	3,01E+00	3,63E-03	1,01E-02	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO0350</i>	3,97E+00	6,08E-03	1,56E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0351</i>	2,95E+00	1,18E-03	3,88E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0363</i>	3,68E+00	8,82E-04	2,98E-03	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO0369</i>	2,46E+00	9,99E-03	2,38E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0370</i>	1,42E+01	1,41E-05	7,63E-05	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO0371</i>	8,22E+00	2,27E-04	9,15E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0372</i>	3,46E+00	3,86E-06	2,35E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0380</i>	-2,46E+00	3,17E-07	2,28E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0406</i>	3,73E+00	1,36E-32	1,13E-30	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0409</i>	-3,27E+00	4,39E-29	2,89E-27	Spore-associated protein (O)
<i>SCO0418</i>	5,62E+00	5,77E-03	1,50E-02	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO0423</i>	2,75E+00	1,16E-02	2,70E-02	Membrane transport protein (MB)
<i>SCO0437</i>	2,77E+00	1,56E-03	4,93E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0439</i>	3,48E+00	2,48E-03	7,28E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0459</i>	2,28E+00	1,86E-18	5,56E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0461</i>	2,85E+00	7,23E-04	2,53E-03	Hydrolase (O)
<i>SCO0470</i>	2,57E+00	1,17E-03	3,85E-03	Hydrolase (O)
<i>SCO0472</i>	3,36E+00	3,30E-03	9,29E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0474</i>	4,50E+00	1,41E-02	3,15E-02	Lipoprotein (MB)
<i>SCO0475</i>	3,18E+00	9,60E-03	2,30E-02	ABC transporter (MB)
<i>SCO0476</i>	3,76E+00	5,29E-03	1,39E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO0480</i>	1,69E+01	1,28E-05	7,01E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0500</i>	-2,08E+00	6,60E-16	1,48E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0534</i>	1,19E+01	1,68E-04	6,99E-04	Beta-hexosaminidase (O)
<i>SCO0540</i>	2,33E+00	4,00E-03	1,10E-02	Sugar transport membrane protein (MB)
<i>SCO0545</i>	2,89E+00	1,17E-02	2,71E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0547</i>	4,03E+00	2,30E-02	4,80E-02	Acyltransferase (O)

SCO0553	3,34E+00	1,49E-02	3,31E-02	Hypothetical protein (HP)
SCO0578	3,25E+00	8,68E-03	2,12E-02	Triosephosphate isomerase (O)
SCO0580	2,95E+00	7,66E-04	2,65E-03	Dihydroxyacetone kinase (O)
SCO0584	-2,20E+00	9,70E-15	1,94E-13	Cytochrome P450 (O)
SCO0585	-2,41E+00	1,03E-13	1,81E-12	ATP/GTP binding protein (O)
SCO0586	-2,16E+00	3,52E-12	4,98E-11	Hypothetical protein (HP)
SCO0587	-2,01E+00	1,43E-09	1,42E-08	Hypothetical protein (HP)
SCO0588	-2,14E+00	2,13E-24	9,89E-23	Sensor kinase (RP)
SCO0596	-2,87E+00	6,70E-39	9,52E-37	DNA-binding protein (RP)
SCO0631	-2,38E+00	8,39E-07	5,67E-06	Hypothetical protein (HP)
SCO0634	9,13E+00	1,52E-04	6,40E-04	Pseudo (O)
SCO0651	2,91E+00	1,21E-02	2,79E-02	Gas vesicle synthesis protein (GV)
SCO0668	2,73E+00	1,62E-04	6,79E-04	Flavoprotein (O)
SCO0678	-5,90E+00	5,79E-55	1,53E-52	Hypothetical protein (HP)
SCO0679	-3,07E+00	3,70E-14	7,01E-13	Hypothetical protein (HP)
SCO0686	-2,13E+00	1,66E-07	1,24E-06	Hypothetical protein (HP)
SCO0694	-2,69E+00	1,93E-05	1,01E-04	Hypothetical protein (HP)
SCO0698	-3,34E+00	1,43E-33	1,33E-31	Hypothetical protein (HP)
SCO0707	8,06E+00	1,40E-02	3,15E-02	Branched-chain amino acid ABC transporter permease (MB)
SCO0708	2,46E+01	4,35E-05	2,11E-04	Branched-chain amino acid ABC transporter (MB)
SCO0710	7,41E+00	8,54E-03	2,09E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
SCO0713	1,16E+01	6,28E-04	2,23E-03	Lipase (O)

<i>SCO0718</i>	-2,50E+00	1,42E-12	2,15E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0743</i>	-2,45E+00	1,23E-17	3,34E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0746</i>	2,41E+00	1,37E-02	3,09E-02	Ser/Thr protein kinase (O)
<i>SCO0750</i>	-3,89E+00	2,85E-12	4,10E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0762</i>	2,17E+00	1,49E-29	9,98E-28	Protease inhibitor protein (O)
<i>SCO0779</i>	-2,14E+00	5,16E-12	7,06E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0785</i>	5,82E+00	1,36E-03	4,36E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0809</i>	7,06E+00	2,91E-05	1,48E-04	ABC transporter permease (MB)
<i>SCO0834</i>	-4,47E+00	3,95E-32	3,11E-30	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0842</i>	3,46E+00	3,44E-03	9,65E-03	Deoxyribodipyrimidine photolyase (O)
<i>SCO0849</i>	2,95E+00	1,27E-02	2,90E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0854</i>	2,14E+00	5,58E-06	3,29E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0856</i>	6,28E+00	2,30E-03	6,85E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0893</i>	3,32E+00	4,13E-03	1,13E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0897</i>	-3,23E+00	1,12E-11	1,48E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0921</i>	2,75E+00	7,93E-07	5,37E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0923</i>	2,00E+00	2,69E-19	8,58E-18	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (O)
<i>SCO0932</i>	-2,41E+00	5,66E-31	4,27E-29	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0933</i>	-2,04E+00	5,93E-17	1,49E-15	Lipoprotein (MB)
<i>SCO0939</i>	2,38E+00	7,40E-04	2,57E-03	Hydrolase (O)
<i>SCO0941</i>	5,17E+00	3,07E-03	8,72E-03	Lipoprotein (MB)
<i>SCO0949</i>	1,31E+01	1,12E-04	4,90E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO0961</i>	-2,79E+00	1,62E-24	7,55E-23	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (O)

<i>SCO0978</i>	-2,30E+00	1,14E-22	4,61E-21	Aspartate alpha-decarboxylase (O)
<i>SCO0983</i>	6,41E+00	8,06E-04	2,78E-03	Malate synthase (O)
<i>SCO0991</i>	-2,06E+00	9,13E-08	7,04E-07	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1023</i>	-2,25E+00	1,21E-16	2,96E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1029</i>	-2,03E+00	8,88E-11	1,03E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1030</i>	-2,10E+00	3,39E-23	1,42E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1032</i>	8,06E+00	4,74E-03	1,27E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO1044</i>	3,61E+00	4,17E-03	1,14E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1046</i>	3,20E+00	2,00E-03	6,05E-03	Metal transporter atpase (MB)
<i>SCO1049</i>	2,35E+00	1,27E-02	2,91E-02	Oxidoreductase (O)
<i>SCO1052</i>	2,58E+01	5,74E-05	2,69E-04	Regulatory protein (RP)
<i>SCO1053</i>	8,57E+00	2,89E-03	8,31E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1055</i>	2,27E+00	1,51E-05	8,10E-05	Alpha-xylosidase (O)
<i>SCO1061</i>	3,36E+00	9,43E-03	2,27E-02	Bifunctional sugar binding protein/sugar hydrolase (O)
<i>SCO1062</i>	1,01E+01	4,09E-05	2,01E-04	Hydrolase (O)
<i>SCO1065</i>	3,16E+00	1,65E-02	3,61E-02	Sugar transport sugar binding protein (MB)
<i>SCO1076</i>	-2,41E+00	3,74E-22	1,46E-20	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1099</i>	3,10E+00	1,11E-02	2,61E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1100</i>	-3,36E+00	1,44E-26	8,24E-25	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1118</i>	-2,35E+00	1,10E-10	1,25E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1128</i>	2,28E+00	2,16E-02	4,55E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1138</i>	-3,03E+00	1,32E-25	6,83E-24	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO1147</i>	2,75E+00	7,83E-15	1,58E-13	ABC transporter transmembrane subunit (MB)	
<i>SCO1189</i>	-2,10E+00	1,07E-18	3,25E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1190</i>	2,43E+00	1,45E-04	6,13E-04	Export protein (MB)	
<i>SCO1195</i>	-2,06E+00	3,41E-06	2,09E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1208</i>	-2,39E+00	2,19E-10	2,40E-09	Hypothetical protein (SM)	THN , flaviolina <i>SCO1206-1208</i>
<i>SCO1216</i>	-2,08E+00	3,75E-08	3,05E-07	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1218</i>	2,16E+00	1,59E-06	1,03E-05	Transmembrane transport protein (MB)	
<i>SCO1219</i>	5,17E+00	4,80E-04	1,76E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1222</i>	-2,30E+00	3,26E-15	6,79E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1223</i>	-2,51E+00	2,03E-30	1,47E-28	Ornithine aminotransferase (O)	
<i>SCO1226</i>	2,79E+00	1,09E-02	2,57E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1249</i>	-2,14E+00	9,47E-09	8,42E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1264</i>	2,08E+00	1,01E-02	2,41E-02	Hydrolase (O)	
<i>SCO1266</i>	3,27E+00	1,28E-02	2,91E-02	3-oxoacyl-ACP synthase (SM)	Poliquétido aromático <i>SCO1265-1273</i>
<i>SCO1274</i>	4,20E+00	1,26E-02	2,88E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1276</i>	-2,48E+00	3,15E-03	8,94E-03	RNA polymerase ECF sigma factor sigj (RP)	
<i>SCO1280</i>	5,98E+00	2,23E-03	6,67E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1281</i>	7,46E+00	1,34E-03	4,30E-03	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO1284</i>	9,32E+00	8,79E-05	3,95E-04	Aminotransferase (O)	
<i>SCO1287</i>	5,62E+00	9,94E-03	2,37E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1306</i>	2,06E+00	1,18E-03	3,88E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1324</i>	2,89E+00	5,60E-03	1,46E-02	3-ketoacyl-coa thiolase (O)	
<i>SCO1333</i>	-2,68E+00	9,57E-09	8,49E-08	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO1334</i>	-2,16E+00	3,08E-05	1,55E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1338</i>	3,89E+00	1,70E-03	5,30E-03	Monooxygenase (O)
<i>SCO1354</i>	1,23E+01	2,31E-03	6,87E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1355</i>	1,74E+01	5,91E-04	2,12E-03	Serine protease (O)
<i>SCO1365</i>	-2,28E+00	2,94E-03	8,42E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1366</i>	-3,81E+00	2,02E-39	2,99E-37	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1367</i>	-7,06E+00	2,35E-109	4,34E-106	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO1368</i>	-5,58E+00	2,71E-98	2,86E-95	ABC transporter (MB)
<i>SCO1402</i>	2,11E+00	4,93E-23	2,05E-21	Large hypothetical protein (O)
<i>SCO1403</i>	-2,08E+00	6,21E-14	1,13E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1404</i>	2,85E+00	6,66E-23	2,73E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1405</i>	2,69E+00	8,92E-17	2,21E-15	HSP90 family protein. Putative heat shock protein (O)
<i>SCO1411</i>	-2,41E+00	6,42E-25	3,12E-23	Transmembrane transport protein (MB)
<i>SCO1412</i>	-2,20E+00	6,91E-09	6,30E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1427</i>	-2,30E+00	3,72E-26	2,04E-24	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1431</i>	-2,04E+00	6,33E-16	1,44E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1456</i>	3,84E+00	4,43E-03	1,19E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1459</i>	2,41E+00	4,28E-04	1,60E-03	Amino acid transporter (MB)
<i>SCO1470</i>	-2,07E+00	3,09E-15	6,47E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1532</i>	-2,08E+00	2,64E-11	3,26E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1534</i>	-2,46E+00	1,59E-21	5,89E-20	DNA polymerase III subunit epsilon (O)
<i>SCO1539</i>	-2,58E+00	1,51E-03	4,79E-03	Lipoprotein (MB)

<i>SCO1570</i>	6,15E+00	6,59E-34	6,41E-32	Argininosuccinate lyase (O)
<i>SCO1576</i>	2,85E+00	3,11E-38	4,04E-36	Arginine repressor (O)
<i>SCO1577</i>	5,28E+00	6,78E-82	4,17E-79	Acetylornithine aminotransferase (O)
<i>SCO1578</i>	5,86E+00	3,75E-28	2,31E-26	Acetylglutamate kinase (O)
<i>SCO1579</i>	5,94E+00	1,56E-25	7,94E-24	Bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase (O)
<i>SCO1580</i>	7,21E+00	2,94E-49	6,39E-47	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase (O)
<i>SCO1583</i>	3,36E+00	1,03E-02	2,44E-02	Arabinosidase (O)
<i>SCO1587</i>	2,01E+00	1,01E-04	4,47E-04	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO1611</i>	-2,71E+00	2,17E-20	7,52E-19	3-oxoacyl-ACP reductase (O)
<i>SCO1613</i>	-2,27E+00	1,73E-13	2,95E-12	Glutamine synthetase (O)
<i>SCO1617</i>	-6,32E+00	3,36E-04	1,30E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1640</i>	-2,16E+00	1,49E-19	4,88E-18	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1643</i>	-2,08E+00	4,26E-17	1,08E-15	20S proteasome alpha-subunit (O)
<i>SCO1645</i>	-2,11E+00	1,34E-17	3,60E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1646</i>	-3,53E+00	5,61E-26	3,00E-24	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1684</i>	2,01E+00	1,29E-02	2,95E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1693</i>	3,32E+00	1,86E-02	4,01E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1711</i>	3,12E+00	1,76E-04	7,29E-04	Dehydrogenase (O)
<i>SCO1719</i>	3,89E+00	3,69E-03	1,03E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO1738</i>	2,25E+00	2,98E-03	8,51E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1739</i>	2,25E+00	5,41E-10	5,63E-09	DNA polymerase III subunit alpha (O)

SCO1789	2,33E+00	3,59E-25	1,81E-23	Hypothetical protein (HP)
SCO1795	-2,22E+00	1,17E-15	2,55E-14	Hypothetical protein (HP)
SCO1835	-2,10E+00	2,89E-11	3,55E-10	Hypothetical protein (HP)
SCO1838	-2,48E+00	5,71E-26	3,04E-24	Enoyl-coa hydratase/isomerase (O)
SCO1839	-4,47E+00	8,95E-25	4,32E-23	Transcriptional regulator (RP)
SCO1845	2,43E+00	2,42E-24	1,12E-22	Low-affinity phosphate transport protein (MB)
SCO1846	2,19E+00	4,67E-04	1,72E-03	Hypothetical protein (HP)
SCO1850	2,19E+00	8,12E-15	1,63E-13	Chelatase (O)
SCO1868	-2,10E+00	1,03E-19	3,43E-18	Hypothetical protein (HP)
SCO1879	9,00E+00	1,98E-03	6,02E-03	Pectinesterase (O)
SCO1880	7,46E+00	3,45E-03	9,67E-03	Pectate lyase (O)
SCO1883	2,99E+00	9,60E-03	2,30E-02	Xylanase (S)
SCO1884	5,35E+00	2,66E-03	7,71E-03	Hypothetical protein (HP)
SCO1885	5,35E+00	1,87E-03	5,71E-03	Oxidoreductase (O)
SCO1887	3,12E+00	2,27E-02	4,75E-02	Integral membrane transport protein (MB)
SCO1891	2,93E+00	1,13E-02	2,64E-02	Hypothetical protein (HP)
SCO1908	-2,45E+00	1,57E-12	2,36E-11	Large hypothetical protein (O)
SCO1909	2,41E+00	6,69E-15	1,36E-13	Hypothetical protein (HP)
SCO1910	-2,43E+00	4,99E-04	1,82E-03	Alanine-rich protein (O)
SCO1914	-2,50E+00	4,62E-04	1,71E-03	Hypothetical protein (HP)
SCO1963	-2,17E+00	6,41E-09	5,87E-08	Integral membrane export protein (MB)
SCO2009	-2,03E+00	3,18E-08	2,61E-07	Branched-chain amino acid ABC transporter permease (MB)

<i>SCO2012</i>	-2,30E+00	4,17E-17	1,06E-15	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO2018</i>	2,27E+00	1,28E-18	3,87E-17	Aminopeptidase (O)
<i>SCO2029</i>	1,51E+01	1,70E-04	7,06E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2030</i>	5,31E+00	5,18E-03	1,37E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2031</i>	2,34E+01	2,60E-04	1,03E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2032</i>	3,20E+00	2,37E-03	7,03E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2033</i>	4,66E+00	7,10E-04	2,48E-03	Citrate lyase subunit beta (O)
<i>SCO2099</i>	1,27E+01	2,42E-04	9,71E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2113</i>	-2,95E+00	2,03E-30	1,47E-28	Bacterioferritin (O)
<i>SCO2136</i>	2,16E+00	1,05E-24	5,02E-23	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2144</i>	2,46E+00	6,73E-03	1,70E-02	Integral membrane transporter (MB)
<i>SCO2145</i>	9,38E+00	1,64E-04	6,86E-04	Glycerate kinase (O)
<i>SCO2228</i>	-2,04E+00	7,35E-13	1,15E-11	Alpha-glucosidase (O)
<i>SCO2230</i>	-2,17E+00	8,33E-05	3,76E-04	Maltose permease (O)
<i>SCO2231</i>	-2,23E+00	1,11E-21	4,15E-20	Maltose-binding protein (O)
<i>SCO2250</i>	-2,79E+00	8,28E-26	4,37E-24	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2254</i>	3,07E+00	1,31E-16	3,17E-15	Transmembrane efflux protein (MB)
<i>SCO2265</i>	-2,03E+00	1,28E-10	1,45E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2270</i>	2,48E+00	4,93E-20	1,65E-18	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2271</i>	2,95E+00	8,14E-13	1,26E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2273</i>	3,34E+00	2,06E-06	1,31E-05	FecCD-family membrane transport protein (MB)
<i>SCO2286</i>	5,21E+00	1,27E-04	5,43E-04	Alkaline phosphatase (O)
<i>SCO2291</i>	2,73E+00	2,50E-03	7,34E-03	Acetylxyylan esterase (O)

<i>SCO2302</i>	-2,83E+00	8,99E-30	6,15E-28	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2310</i>	4,32E+00	2,43E-14	4,71E-13	Integral membrane efflux protein (MB)
<i>SCO2332</i>	2,28E+00	1,32E-02	2,99E-02	Hydrolase (O)
<i>SCO2334</i>	2,38E+00	2,39E-16	5,66E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2341</i>	-2,35E+00	4,41E-03	1,19E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2342</i>	-2,06E+00	3,72E-03	1,03E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2355</i>	2,25E+00	2,30E-09	2,22E-08	Lipoprotein (MB)
<i>SCO2372</i>	-3,03E+00	3,20E-17	8,27E-16	Small hydrophobic protein (MB)
<i>SCO2373</i>	2,11E+00	3,70E-19	1,15E-17	Tetracenomycin C efflux protein (MB)
<i>SCO2404</i>	-2,10E+00	3,69E-12	5,17E-11	Sugar-binding receptor (MB)
<i>SCO2409</i>	4,06E+00	8,29E-03	2,03E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2410</i>	5,24E+00	2,22E-03	6,65E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2412</i>	4,86E+00	6,56E-03	1,67E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2414</i>	4,32E+00	6,41E-03	1,64E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2416</i>	3,51E+00	1,01E-02	2,39E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2419</i>	6,32E+00	8,82E-04	2,98E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2424</i>	3,92E+00	2,51E-03	7,35E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2431</i>	2,81E+00	1,96E-02	4,19E-02	Alpha-L-arabinofuranosidase (O)
<i>SCO2434</i>	8,75E+00	2,60E-04	1,03E-03	Sugar transporter sugar binding protein (MB)
<i>SCO2452</i>	4,92E+00	7,93E-04	2,74E-03	Two-component sensor histidine kinase (RP)
<i>SCO2453</i>	-4,26E+00	1,25E-07	9,50E-07	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2471</i>	3,71E+00	6,96E-03	1,75E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2473</i>	3,20E+00	1,91E-04	7,83E-04	Nitrate reductase (O)

<i>SCO2474</i>	8,82E+00	9,85E-05	4,35E-04	Putative metalloproteinase (putative secreted protein)(S)
<i>SCO2477</i>	2,22E+00	1,03E-13	1,80E-12	Short chain dehydrogenase (O)
<i>SCO2478</i>	2,51E+00	8,96E-23	3,66E-21	Reductase (O)
<i>SCO2480</i>	9,32E+00	6,95E-03	1,75E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2485</i>	6,15E+00	3,55E-41	5,96E-39	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2486</i>	3,73E+00	1,80E-05	9,53E-05	Nitrite reductase nirb (O)
<i>SCO2487</i>	3,81E+00	1,01E-05	5,64E-05	Nitrite reductase large subunit NirB (O)
<i>SCO2488</i>	4,86E+00	3,91E-04	1,48E-03	Nitrite reductase small subunit NirC (O)
<i>SCO2498</i>	2,13E+00	1,34E-06	8,78E-06	Efflux protein (MB)
<i>SCO2500</i>	4,38E+00	5,06E-03	1,34E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2502</i>	9,58E+00	1,89E-04	7,78E-04	Transporter (MB)
<i>SCO2512</i>	-2,77E+00	2,06E-03	6,22E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2513</i>	-4,03E+00	1,99E-51	4,60E-49	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2519</i>	-2,22E+00	5,17E-19	1,58E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2526</i>	-2,13E+00	2,13E-15	4,52E-14	Acetyltransferase (O)
<i>SCO2529</i>	-2,17E+00	4,80E-18	1,35E-16	Metalloprotease (O)
<i>SCO2530</i>	-3,05E+00	4,69E-36	5,41E-34	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2531</i>	-2,66E+00	5,60E-33	4,81E-31	Beta-glucosidase (O)
<i>SCO2536</i>	3,41E+00	2,06E-03	6,22E-03	Transmembrane transport protein (MB)
<i>SCO2543</i>	3,41E+00	1,20E-02	2,77E-02	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase (O)
<i>SCO2567</i>	3,73E+00	2,17E-04	8,79E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2591</i>	2,41E+00	5,25E-29	3,40E-27	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2628</i>	-2,06E+00	1,09E-18	3,32E-17	Amino acid permease (MB)

<i>SCO2629</i>	-2,22E+00	9,08E-05	4,06E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2638</i>	2,35E+00	2,13E-02	4,51E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2645</i>	3,51E+00	7,20E-03	1,80E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2646</i>	3,12E+00	6,37E-03	1,62E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2688</i>	7,06E+00	7,07E-04	2,48E-03	Riboflavin-specific deaminase (O)
<i>SCO2689</i>	5,10E+00	4,46E-04	1,66E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2691</i>	4,44E+00	1,52E-03	4,80E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2692</i>	3,89E+00	2,38E-04	9,57E-04	Repetative protein (O)
<i>SCO2693</i>	3,63E+00	8,18E-03	2,01E-02	Oxygenase (O)
<i>SCO2694</i>	3,92E+00	4,97E-03	1,32E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2705</i>	-2,08E+00	4,78E-18	1,35E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2706</i>	2,33E+00	1,44E-02	3,21E-02	Transferase (O)
<i>SCO2707</i>	2,93E+00	3,61E-03	1,01E-02	Transferase (O)
<i>SCO2708</i>	2,01E+00	1,98E-02	4,23E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2709</i>	2,46E+00	1,60E-02	3,52E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2710</i>	1,13E+01	4,98E-04	1,82E-03	Polysaccharide deacetylase (O)
<i>SCO2711</i>	9,45E+00	9,41E-05	4,18E-04	Glycosyl transferase (O)
<i>SCO2715</i>	3,68E+00	1,24E-04	5,34E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2716</i>	-3,32E+00	3,56E-12	5,02E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2717</i>	-5,35E+00	1,49E-76	7,88E-74	Small membrane protein (MB)
<i>SCO2718</i>	-5,74E+00	1,45E-64	5,66E-62	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2719</i>	-6,59E+00	1,34E-52	3,41E-50	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2720</i>	4,06E+00	2,67E-04	1,05E-03	Long-chain fatty acid ligase (O)
<i>SCO2726</i>	-2,48E+00	5,85E-30	4,12E-28	Methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase (O)

<i>SCO2727</i>	-3,61E+00	1,44E-16	3,47E-15	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2744</i>	2,69E+01	1,03E-05	5,71E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2751</i>	2,62E+00	1,61E-02	3,53E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2762</i>	2,55E+00	3,52E-04	1,35E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2765</i>	-2,27E+00	3,98E-12	5,55E-11	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2775</i>	-2,85E+00	7,04E-39	9,82E-37	TetR family transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO2776</i>	-1,20E+01	9,26E-197	6,84E-193	Acetyl/propionyl coa carboxylase subunit beta (O)	
<i>SCO2777</i>	-1,10E+01	1,57E-103	2,32E-100	Acetyl/propionyl coa carboxylase subunit alpha (O)	
<i>SCO2778</i>	-9,32E+00	1,64E-62	5,78E-60	Hydroxymethylglutaryl-coa lyase (O)	
<i>SCO2779</i>	-1,01E+01	2,64E-113	6,49E-110	Acyl-coa dehydrogenase (O)	
<i>SCO2781</i>	2,25E+00	4,08E-22	1,57E-20	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2782</i>	3,25E+00	6,89E-12	9,33E-11	Pyridoxal-dependent decarboxylase (SM)	Desferrioxamina <i>SCO2782-2785</i>
<i>SCO2783</i>	3,58E+00	1,25E-11	1,63E-10	Monoxygenase (SM)	Desferrioxamina <i>SCO2782-2785</i>
<i>SCO2784</i>	3,53E+00	7,19E-04	2,51E-03	Acetyltransferase (SM)	Desferrioxamina <i>SCO2782-2785</i>
<i>SCO2785</i>	2,14E+00	7,44E-12	9,97E-11	Hypothetical protein (SM)	Desferrioxamina <i>SCO2782-2785</i>
<i>SCO2798</i>	4,38E+00	1,62E-04	6,77E-04	Cellobiose hydrolase(S)	
<i>SCO2812</i>	4,89E+00	2,23E-03	6,66E-03	Drug efflux protein (O)	
<i>SCO2816</i>	2,17E+00	1,69E-06	1,09E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2819</i>	-2,43E+00	1,05E-21	3,96E-20	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2826</i>	-2,39E+00	1,79E-13	3,05E-12	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO2851</i>	4,38E+00	1,73E-03	5,39E-03	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO2854</i>	6,87E+00	5,32E-04	1,93E-03	Transmembrane efflux protein (MB)
<i>SCO2874</i>	3,05E+00	1,27E-03	4,11E-03	Oxidoreductase (O)
<i>SCO2910</i>	2,36E+00	4,24E-18	1,20E-16	Cysteine synthase (O)
<i>SCO2911</i>	2,23E+00	1,29E-25	6,69E-24	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2912</i>	2,07E+00	1,93E-12	2,85E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2935</i>	-2,14E+00	3,33E-17	8,58E-16	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO2956</i>	6,68E+00	2,79E-04	1,09E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2965</i>	3,34E+00	1,29E-03	4,18E-03	Transporter (MB)
<i>SCO2976</i>	-2,85E+00	1,16E-29	7,84E-28	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2997</i>	2,46E+00	2,50E-04	9,99E-04	Transferase (O)
<i>SCO2998</i>	3,63E+00	6,47E-03	1,65E-02	Transferase (O)
<i>SCO3004</i>	1,06E+01	8,12E-04	2,80E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3010</i>	-2,27E+00	2,79E-12	4,03E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3051</i>	-2,55E+00	6,55E-24	2,92E-22	Acyl-coa dehydrogenase (O)
<i>SCO3070</i>	-2,10E+00	2,61E-07	1,90E-06	Imidazolonepropionase (O)
<i>SCO3071</i>	-2,08E+00	2,30E-10	2,51E-09	N-formimino-L-glutamate deiminase (O)
<i>SCO3072</i>	-2,41E+00	6,60E-16	1,48E-14	Allantoate amidohydrolase (O)
<i>SCO3073</i>	-2,22E+00	8,48E-14	1,51E-12	Urocanate hydratase (O)
<i>SCO3082</i>	-2,01E+00	8,24E-13	1,28E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3087</i>	-2,10E+00	4,66E-06	2,80E-05	Pseudo (O)
<i>SCO3108</i>	-2,87E+00	6,16E-30	4,29E-28	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3110</i>	2,10E+00	2,41E-21	8,87E-20	ABC transporter (MB)
<i>SCO3117</i>	2,04E+00	1,39E-13	2,39E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3168</i>	3,46E+00	7,89E-06	4,50E-05	Protease (O)

<i>SCO3171</i>	2,77E+00	7,51E-03	1,87E-02	Hydrolase (O)	
<i>SCO3172</i>	3,61E+00	2,43E-04	9,73E-04	Monooxygenase (O)	
<i>SCO3204</i>	3,76E+00	3,29E-03	9,28E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3211</i>	2,69E+00	1,58E-02	3,48E-02	Indoleglycerol phosphate synthase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3212</i>	3,03E+00	8,26E-03	2,03E-02	Anthranilate phosphoribotransferase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3213</i>	6,54E+00	3,74E-04	1,42E-03	Anthranilate synthase component II (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3214</i>	3,78E+00	2,04E-04	8,35E-04	Anthranilate synthase component I (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3219</i>	2,08E+00	9,47E-03	2,28E-02	Lipase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3227</i>	2,06E+00	1,51E-03	4,78E-03	Aminotransferase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3229</i>	2,13E+00	3,30E-05	1,66E-04	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3230</i>	2,51E+00	1,31E-05	7,13E-05	CDA peptide synthetase I (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3232</i>	2,33E+00	4,36E-05	2,12E-04	CDA peptide synthetase III (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3233</i>	2,33E+00	2,86E-05	1,45E-04	Hydrolase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3234</i>	2,30E+00	1,55E-08	1,33E-07	Phosphotransferase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3237</i>	2,55E+00	1,25E-04	5,40E-04	Hypothetical protein (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3238</i>	2,51E+00	8,88E-04	3,00E-03	Hypothetical protein (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3242</i>	2,14E+00	1,10E-02	2,59E-02	Puitative transferase (SM)	CDA <i>SCO3210-3249</i>
<i>SCO3252</i>	6,54E+00	1,31E-02	2,98E-02	Replication initiator protein (O)	
<i>SCO3256</i>	1,44E+01	1,53E-03	4,83E-03	SpdA protein (O)	
<i>SCO3263</i>	-2,68E+00	1,36E-04	5,80E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3273</i>	-2,03E+00	1,15E-11	1,50E-10	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3279</i>	5,66E+00	7,17E-04	2,51E-03	Integral membrane efflux protein (MB)	

<i>SCO3288</i>	-2,27E+00	3,20E-19	1,00E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3290</i>	-2,11E+00	4,01E-22	1,55E-20	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3327</i>	-3,34E+00	4,32E-25	2,14E-23	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3328</i>	-3,05E+00	1,45E-22	5,83E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3329</i>	-2,28E+00	1,37E-16	3,33E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3335</i>	2,57E+00	1,63E-03	5,09E-03	AraC family transcription regulator (RP)
<i>SCO3368</i>	2,14E+00	6,45E-05	2,98E-04	Peptidase (O)
<i>SCO3412</i>	-2,08E+00	2,48E-13	4,17E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3415</i>	5,86E+00	3,94E-04	1,49E-03	Esterase (O)
<i>SCO3417</i>	3,29E+00	7,27E-04	2,54E-03	ABC transporter (MB)
<i>SCO3418</i>	2,57E+00	6,88E-03	1,74E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO3426</i>	2,07E+00	1,71E-02	3,72E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3441</i>	5,10E+00	5,61E-03	1,46E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3445</i>	-3,66E+00	2,37E-13	3,99E-12	Small membrane protein (MB)
<i>SCO3475</i>	-2,08E+00	3,11E-12	4,45E-11	Galactonate dehydratase (O)
<i>SCO3494</i>	2,48E+00	8,83E-04	2,99E-03	Sugar kinase (O)
<i>SCO3495</i>	4,32E+00	5,66E-03	1,47E-02	Aldolase (O)
<i>SCO3511</i>	3,53E+00	1,99E-03	6,04E-03	Lipoprotein (MB)
<i>SCO3513</i>	8,80E+01	4,60E-05	2,22E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3514</i>	6,50E+00	5,65E-03	1,47E-02	ATP-binding protein (O)
<i>SCO3515</i>	9,32E+00	4,93E-04	1,81E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3517</i>	3,01E+01	2,01E-05	1,05E-04	ATP-binding protein (O)
<i>SCO3519</i>	9,32E+00	3,02E-03	8,62E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3520</i>	9,00E+00	3,01E-03	8,58E-03	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO3523</i>	2,57E+00	2,48E-03	7,29E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3526</i>	7,78E+00	2,87E-03	8,24E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3528</i>	7,11E+00	3,86E-04	1,46E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3554</i>	2,85E+00	1,27E-02	2,91E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3556</i>	2,60E+00	3,31E-03	9,33E-03	Secretory protein (O)
<i>SCO3570</i>	-2,01E+00	1,37E-03	4,39E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3579</i>	-2,39E+00	2,72E-20	9,35E-19	Regulatory protein (RP)
<i>SCO3587</i>	3,58E+00	1,56E-02	3,43E-02	Regulatory protein (RP)
<i>SCO3588</i>	3,27E+00	1,57E-03	4,96E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3594</i>	-2,19E+00	3,05E-03	8,69E-03	D-lactate dehydrogenase (O)
<i>SCO3598</i>	3,41E+00	9,72E-04	3,26E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3642</i>	6,45E+00	4,14E-04	1,56E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3656</i>	-2,28E+00	2,86E-18	8,26E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3660</i>	-2,01E+00	1,07E-16	2,64E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3663</i>	-2,68E+00	2,70E-22	1,07E-20	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3674</i>	2,43E+00	2,35E-07	1,72E-06	Sensor kinase (RP)
<i>SCO3689</i>	3,81E+00	7,28E-03	1,82E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3695</i>	3,48E+00	2,49E-03	7,30E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3697</i>	2,39E+00	3,49E-03	9,76E-03	Oxidoreductase (O)
<i>SCO3723</i>	2,13E+00	1,52E-02	3,37E-02	Regulatory protein (RP)
<i>SCO3730</i>	2,43E+00	7,92E-03	1,96E-02	Oxidoreductase (O)
<i>SCO3742</i>	2,46E+00	5,34E-03	1,40E-02	Glycosyltransferase (O)
<i>SCO3744</i>	2,19E+00	1,68E-02	3,68E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3752</i>	3,94E+00	4,83E-03	1,29E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)

<i>SCO3753</i>	3,78E+00	3,80E-04	1,44E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3754</i>	3,34E+00	3,15E-04	1,22E-03	ABC transporter (MB)
<i>SCO3758</i>	6,06E+00	4,81E-04	1,77E-03	Fatty acid desaturase (O)
<i>SCO3759</i>	6,59E+00	6,75E-05	3,10E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3771</i>	2,27E+00	9,49E-03	2,28E-02	Penicillin binding protein (O)
<i>SCO3772</i>	7,57E+00	5,39E-05	2,55E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3775</i>	2,89E+00	8,75E-03	2,13E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3777</i>	2,11E+00	2,73E-21	9,83E-20	Peptidase (O)
<i>SCO3787</i>	3,05E+00	5,21E-03	1,37E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO3814</i>	-2,07E+00	1,34E-17	3,60E-16	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO3829</i>	-2,07E+00	6,28E-23	2,59E-21	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 (O)
<i>SCO3830</i>	-2,23E+00	3,77E-16	8,68E-15	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 subunit beta (O)
<i>SCO3831</i>	-2,51E+00	3,19E-16	7,46E-15	E1-alpha branched-chain alpha keto acid dehydrogenase (O)
<i>SCO3833</i>	-2,64E+00	1,15E-35	1,30E-33	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO3834</i>	-2,11E+00	1,94E-17	5,17E-16	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase (O)
<i>SCO3835</i>	-3,78E+00	3,90E-34	3,90E-32	Dehydrogenase (O)
<i>SCO3926</i>	-2,25E+00	6,83E-18	1,89E-16	Regulator (RP)
<i>SCO3969</i>	2,13E+00	3,89E-03	1,07E-02	ATP/GTP-binding protein (O)
<i>SCO3997</i>	2,38E+00	7,12E-03	1,78E-02	Integrase (O)
<i>SCO4000</i>	6,15E+00	6,37E-05	2,95E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4001</i>	4,99E+00	7,44E-04	2,59E-03	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO4017</i>	2,13E+00	7,79E-12	1,04E-10	Iron dependent repressor (RP)
<i>SCO4021</i>	4,72E+00	3,24E-04	1,25E-03	Two component system histidine kinase (RP)
<i>SCO4022</i>	6,28E+00	9,58E-04	3,22E-03	Glycosyl transferase (O)
<i>SCO4023</i>	4,56E+00	5,04E-04	1,84E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4027</i>	-4,50E+00	8,42E-43	1,60E-40	Anti sigma factor antagonist (RP)
<i>SCO4028</i>	-2,93E+00	2,36E-34	2,50E-32	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4029</i>	-3,68E+00	9,81E-24	4,29E-22	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4030</i>	3,01E+00	4,24E-03	1,15E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4031</i>	2,04E+00	1,03E-03	3,42E-03	Integral membrane transport protein (MB)
<i>SCO4040</i>	5,03E+00	1,11E-02	2,60E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4049</i>	2,51E+00	5,52E-06	3,27E-05	Antibiotic binding protein (O)
<i>SCO4060</i>	-2,22E+00	2,17E-08	1,82E-07	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4079</i>	2,16E+00	3,56E-16	8,24E-15	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II (O)
<i>SCO4080</i>	-2,23E+00	2,99E-16	7,05E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4097</i>	2,20E+00	1,51E-02	3,35E-02	Amino acid/metabolite permease (MB)
<i>SCO4102</i>	2,01E+00	5,13E-04	1,86E-03	MerR family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO4105</i>	1,42E+01	1,20E-04	5,21E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4141</i>	4,96E+00	2,85E-03	8,21E-03	Phosphate ABC transporter permease (MB)
<i>SCO4164</i>	2,27E+00	6,31E-22	2,40E-20	Thiosulfate sulfurtransferase (O)
<i>SCO4169</i>	2,07E+00	1,93E-02	4,15E-02	Oxidoreductase (O)

<i>SCO4174</i>	-1,03E+01	3,83E-26	2,08E-24	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4175</i>	-1,16E+01	3,27E-65	1,34E-62	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4183</i>	-2,25E+00	1,08E-02	2,56E-02	Transposase (O)
<i>SCO4187</i>	-7,78E+00	1,06E-77	6,03E-75	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4189</i>	-3,27E+00	1,01E-08	8,93E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4191</i>	-2,22E+00	1,35E-19	4,43E-18	Hydrolase (O)
<i>SCO4214</i>	-3,71E+00	1,13E-24	5,35E-23	AbaA-like regulatory protein (RP)
<i>SCO4243</i>	2,95E+00	5,55E-06	3,28E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4246</i>	2,07E+00	3,57E-13	5,85E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4248</i>	2,22E+00	7,21E-07	4,92E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4249</i>	7,31E+00	9,31E-04	3,13E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4250</i>	3,05E+00	1,39E-03	4,44E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4252</i>	2,07E+00	6,85E-14	1,24E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4253</i>	2,39E+00	1,80E-20	6,26E-19	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4259</i>	2,13E+00	6,46E-12	8,76E-11	ATPase AAA (O)
<i>SCO4265</i>	2,01E+00	1,62E-14	3,19E-13	Transport integral membrane protein (MB)
<i>SCO4266</i>	2,69E+00	2,76E-23	1,19E-21	Oxidoreductase (O)
<i>SCO4271</i>	9,45E+00	2,48E-06	1,56E-05	NADP-dependent alcohol dehydrogenase (O)
<i>SCO4291</i>	4,32E+00	2,39E-03	7,07E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4295</i>	-2,43E+00	2,25E-18	6,57E-17	Cold shock protein (O)
<i>SCO4301</i>	-2,07E+00	3,11E-17	8,05E-16	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO4335</i>	-2,33E+00	6,25E-15	1,28E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4368</i>	2,89E+00	7,78E-05	3,54E-04	Lipase (O)

<i>SCO4378</i>	2,23E+00	1,18E-03	3,86E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4379</i>	2,55E+00	1,04E-04	4,58E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4380</i>	2,93E+00	1,97E-04	8,06E-04	Acetyl/propionyl CoA carboxylase subunit beta (O)
<i>SCO4381</i>	3,94E+00	4,78E-04	1,76E-03	Acetyl/propionyl CoA carboxylase subunit alpha (O)
<i>SCO4390</i>	-2,04E+00	7,06E-12	9,51E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4399</i>	-3,12E+00	3,23E-37	3,97E-35	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4401</i>	3,34E+00	6,09E-03	1,56E-02	Lipoprotein (MB)
<i>SCO4405</i>	5,39E+00	4,66E-03	1,25E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO4406</i>	3,81E+00	6,02E-03	1,55E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4412</i>	-3,05E+00	9,41E-33	7,90E-31	Regulatory protein (RP)
<i>SCO4440</i>	-4,63E+00	2,94E-73	1,36E-70	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4446</i>	3,63E+00	4,21E-03	1,15E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4448</i>	2,14E+00	9,49E-05	4,22E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4455</i>	7,21E+00	4,62E-04	1,71E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4476</i>	-2,13E+00	2,73E-16	6,44E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4484</i>	2,50E+00	7,96E-03	1,97E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4498</i>	2,31E+00	2,80E-15	5,90E-14	Proton transport protein (MB)
<i>SCO4500</i>	9,06E+00	3,72E-04	1,41E-03	Dehydratase (O)
<i>SCO4501</i>	9,78E+00	5,86E-04	2,10E-03	3-ketoacyl-ACP reductase (O)
<i>SCO4544</i>	-2,01E+00	7,12E-14	1,28E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4545</i>	-2,10E+00	1,54E-19	5,00E-18	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4555</i>	2,23E+00	1,68E-02	3,66E-02	Integral membrane transferase (MB)

<i>SCO4562</i>	-3,68E+00	7,42E-24	3,26E-22	NADH dehydrogenase subunit A (O)
<i>SCO4563</i>	-2,71E+00	6,74E-15	1,37E-13	NADH dehydrogenase subunit B (O)
<i>SCO4564</i>	-2,39E+00	6,79E-13	1,07E-11	NADH dehydrogenase subunit C (O)
<i>SCO4565</i>	-3,48E+00	1,26E-38	1,73E-36	NADH dehydrogenase subunit D (O)
<i>SCO4566</i>	-3,14E+00	1,78E-20	6,24E-19	NADH dehydrogenase subunit E (O)
<i>SCO4567</i>	-2,87E+00	5,25E-24	2,35E-22	NADH dehydrogenase subunit NuoF (O)
<i>SCO4568</i>	-2,62E+00	2,83E-32	2,30E-30	NADH dehydrogenase subunit G (O)
<i>SCO4569</i>	-3,12E+00	2,07E-26	1,15E-24	NADH dehydrogenase subunit H (O)
<i>SCO4582</i>	3,81E+00	9,26E-03	2,24E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4607</i>	2,53E+00	1,85E-23	8,05E-22	NADH dehydrogenase subunit nuom2 (O)
<i>SCO4608</i>	2,62E+00	6,73E-13	1,06E-11	NADH dehydrogenase subunit nuon2 (O)
<i>SCO4612</i>	2,62E+00	5,38E-38	6,86E-36	Amino acid transporter (MB)
<i>SCO4614</i>	2,20E+00	4,58E-22	1,75E-20	Nucleotide-binding protein (O)
<i>SCO4615</i>	2,33E+00	4,25E-05	2,07E-04	Integrase (O)
<i>SCO4618</i>	6,19E+00	4,88E-05	2,34E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4619</i>	3,61E+00	5,19E-03	1,37E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4620</i>	3,12E+00	1,70E-12	2,54E-11	Sporulation-like protein (O)
<i>SCO4621</i>	4,76E+00	1,11E-05	6,12E-05	Sporulation-like protein (O)
<i>SCO4622</i>	5,70E+00	1,93E-03	5,88E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4625</i>	2,46E+00	1,39E-04	5,90E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4637</i>	2,04E+00	3,38E-14	6,46E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4641</i>	4,92E+00	2,44E-05	1,25E-04	Transmembrane efflux protein (MB)

<i>SCO4642</i>	2,25E+00	1,47E-02	3,28E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4643</i>	2,57E+00	3,83E-35	4,28E-33	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase (O)
<i>SCO4651</i>	2,81E+00	8,85E-35	9,47E-33	Lipoprotein (MB)
<i>SCO4657</i>	4,86E+00	2,85E-86	1,91E-83	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4658</i>	3,53E+00	4,05E-60	1,25E-57	Glucosyltransferase (O)
<i>SCO4664</i>	7,06E+00	5,55E-06	3,28E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4665</i>	4,44E+00	1,24E-03	4,03E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4667</i>	3,12E+00	1,11E-13	1,92E-12	Two-component system sensor kinase (RP)
<i>SCO4670</i>	3,86E+00	4,37E-05	2,12E-04	Serine protease (O)
<i>SCO4673</i>	-2,57E+00	1,17E-33	1,11E-31	DeoR family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO4675</i>	-2,48E+00	9,18E-28	5,47E-26	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4680</i>	2,62E+00	1,86E-33	1,70E-31	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO4684</i>	2,51E+00	2,46E-20	8,48E-19	Cold shock protein (O)
<i>SCO4685</i>	5,35E+00	1,20E-12	1,82E-11	DEAD/DEAH box helicase (O)
<i>SCO4686</i>	2,07E+00	1,69E-03	5,28E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4691</i>	2,58E+00	1,27E-06	8,39E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4695</i>	1,01E+01	4,38E-04	1,64E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4724</i>	2,53E+00	2,88E-25	1,46E-23	Methionine aminopeptidase (O)
<i>SCO4727</i>	2,20E+00	7,26E-12	9,78E-11	30S ribosomal protein S13 (O)
<i>SCO4732</i>	2,28E+00	1,95E-29	1,30E-27	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4733</i>	2,53E+00	4,15E-13	6,77E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4736</i>	4,47E+00	3,39E-90	2,50E-87	Phosphoglucosamine mutase (O)

<i>SCO4738</i>	2,11E+00	6,52E-15	1,33E-13	Pantothenate kinase (O)
<i>SCO4739</i>	4,35E+00	7,31E-60	2,16E-57	Lipoprotein (MB)
<i>SCO4740</i>	2,66E+00	3,45E-36	4,04E-34	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (O)
<i>SCO4741</i>	2,22E+00	3,76E-16	8,68E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4742</i>	2,10E+00	8,01E-11	9,36E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4745</i>	2,66E+00	2,51E-40	4,03E-38	Alanine racemase (O)
<i>SCO4746</i>	2,03E+00	3,64E-19	1,14E-17	Lipase (O)
<i>SCO4747</i>	2,01E+00	1,27E-20	4,45E-19	ATP/GTP binding protein (O)
<i>SCO4749</i>	2,95E+00	4,92E-33	4,33E-31	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4750</i>	2,73E+00	5,84E-27	3,37E-25	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4751</i>	2,27E+00	1,91E-27	1,12E-25	Acetyltransferase (O)
<i>SCO4752</i>	2,46E+00	5,48E-37	6,64E-35	DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease (RP)
<i>SCO4755</i>	2,10E+00	1,43E-03	4,57E-03	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO4783</i>	7,67E+00	2,18E-03	6,54E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4800</i>	-2,71E+00	4,00E-32	3,11E-30	Isobutyryl-CoA mutase, small subunit (O)
<i>SCO4831</i>	2,79E+00	2,84E-05	1,45E-04	Glycine/betaine ABC transporter integral membrane protein (O)
<i>SCO4836</i>	2,46E+00	4,66E-04	1,72E-03	GntR family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO4844</i>	3,97E+00	1,91E-02	4,11E-02	Phosphoribose diphosphate:decaprenyl-phosphate phosphoribosyltransferase (O)

<i>SCO4853</i>	-2,33E+00	8,86E-19	2,71E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4868</i>	-2,08E+00	3,49E-10	3,72E-09	Lipoprotein (MB)
<i>SCO4870</i>	2,25E+00	4,22E-03	1,15E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4874</i>	1,23E+01	1,59E-04	6,65E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4878</i>	6,45E+00	6,52E-03	1,66E-02	Glycosyltransferase (O)
<i>SCO4879</i>	7,52E+00	1,20E-03	3,93E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4880</i>	1,94E+01	5,78E-05	2,71E-04	Transferase (O)
<i>SCO4882</i>	3,81E+00	1,22E-03	3,99E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4884</i>	-2,13E+00	4,81E-15	9,90E-14	Lipoprotein (MB)
<i>SCO4896</i>	2,11E+00	3,35E-18	9,62E-17	Transport integral membrane protein (MB)
<i>SCO4902</i>	-2,14E+00	3,23E-15	6,75E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4930</i>	-3,68E+00	1,09E-13	1,89E-12	Enoyl-CoA hydratase (O)
<i>SCO4937</i>	2,46E+00	1,41E-02	3,16E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4951</i>	2,38E+00	1,35E-02	3,05E-02	Aldoketoreductase (O)
<i>SCO4971</i>	-2,53E+00	5,02E-09	4,65E-08	Dehydrogenase (O)
<i>SCO4972</i>	-3,97E+00	6,58E-34	6,41E-32	Dehydrogenase (O)
<i>SCO4973</i>	-2,64E+00	3,97E-11	4,78E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4985</i>	5,94E+00	1,60E-03	5,01E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5002</i>	5,31E+00	2,98E-03	8,51E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5007</i>	-2,51E+00	3,96E-18	1,13E-16	Septum site-determining protein (O)
<i>SCO5012</i>	-2,07E+00	1,80E-12	2,68E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5013</i>	-2,53E+00	3,94E-28	2,41E-26	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5014</i>	-3,10E+00	2,98E-17	7,76E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5016</i>	2,75E+00	1,33E-02	3,02E-02	Hypothetical protein (HP)

SCO5028	-2,53E+00	4,05E-25	2,02E-23	ATP-binding protein (O)	
SCO5045	2,08E+00	3,86E-22	1,50E-20	Hypothetical protein (HP)	
SCO5049	2,51E+00	1,04E-02	2,46E-02	Hypothetical protein (HP)	
SCO5051	3,16E+00	8,14E-03	2,00E-02	Glycosyltransferase (O)	
SCO5053	5,43E+00	1,39E-04	5,90E-04	Hypothetical protein (HP)	
SCO5067	3,68E+00	3,29E-03	9,28E-03	Carboxylesterase (O)	
SCO5069	4,00E+00	1,83E-04	7,53E-04	Oxidoreductase (O)	
SCO5071	6,19E+00	1,75E-63	6,46E-61	Hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5072	3,56E+00	6,10E-61	2,05E-58	Hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5073	3,94E+00	6,90E-57	1,89E-54	Oxidoreductase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5074	4,53E+00	1,57E-60	5,04E-58	Dehydratase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5079	2,89E+00	2,14E-38	2,83E-36	Hypothetical protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5080	2,46E+00	4,20E-30	3,01E-28	Hydrolase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5082	2,50E+00	2,60E-21	9,52E-20	Transcriptional regulator (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5083	9,65E+00	1,57E-91	1,29E-88	Actinorhodin transporter (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5084	9,99E+00	6,44E-97	5,95E-94	Hypothetical protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5085	2,36E+00	6,98E-24	3,09E-22	Actinorhodin operon activator protein(SCO5085). ActII-ORF4 (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5086	3,18E+00	1,54E-33	1,42E-31	Ketoacyl reductase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5087	3,36E+00	1,20E-41	2,06E-39	Actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase subunit alpha (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5088	3,81E+00	2,94E-32	2,36E-30	Actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase subunit beta (SM)	ACT SCO5071-5092

<i>SCO5089</i>	5,90E+00	4,11E-07	2,92E-06	Actinorhodin polyketide synthase (SM)	ACT <i>SCO5071-5092</i>
<i>SCO5090</i>	3,53E+00	5,47E-33	4,76E-31	Actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase (SM)	ACT <i>SCO5071-5092</i>
<i>SCO5091</i>	3,73E+00	1,49E-25	7,63E-24	Cyclase (SM)	ACT <i>SCO5071-5092</i>
<i>SCO5092</i>	3,41E+00	2,05E-27	1,19E-25	Actinorhodin polyketide dimerase (SM)	ACT <i>SCO5071-5092</i>
<i>SCO5108</i>	-2,28E+00	1,45E-02	3,22E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5109</i>	-2,06E+00	1,50E-02	3,33E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5110</i>	-2,16E+00	4,84E-19	1,49E-17	Lipoprotein (MB)	
<i>SCO5125</i>	-3,10E+00	6,15E-38	7,71E-36	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5160</i>	-2,16E+00	1,48E-16	3,57E-15	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5174</i>	-2,50E+00	1,15E-33	1,11E-31	Transferase (O)	
<i>SCO5205</i>	-2,23E+00	4,04E-15	8,36E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5226</i>	2,16E+00	4,32E-12	5,98E-11	Ribonucleotide-diphosphate reductase large chain (O)	
<i>SCO5232</i>	-2,03E+00	1,30E-14	2,56E-13	Sugar transporter sugar binding protein (MB)	
<i>SCO5248</i>	-2,06E+00	3,47E-17	8,90E-16	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5253</i>	-2,06E+00	3,98E-14	7,50E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5268</i>	-2,33E+00	1,94E-17	5,17E-16	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5269</i>	-2,30E+00	2,72E-21	9,83E-20	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5272</i>	-2,45E+00	3,73E-18	1,07E-16	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5299</i>	-3,61E+00	3,77E-14	7,13E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5300</i>	-2,68E+00	1,10E-06	7,30E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5313</i>	2,27E+00	1,69E-11	2,15E-10	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5321</i>	2,64E+00	7,53E-03	1,87E-02	Polyketide hydroxylase (O)	

<i>SCO5322</i>	2,68E+00	1,51E-03	4,78E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5324</i>	2,04E+00	2,13E-02	4,51E-02	Oxidoreductase (O)
<i>SCO5329</i>	-2,22E+00	3,68E-22	1,45E-20	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5332</i>	-2,39E+00	7,35E-21	2,61E-19	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5339</i>	4,38E+00	3,23E-03	9,13E-03	Plasmid transfer protein (O)
<i>SCO5341</i>	2,05E+01	2,60E-05	1,33E-04	SpdA2 protein (O)
<i>SCO5345</i>	1,62E+01	2,79E-04	1,09E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5347</i>	1,55E+01	1,01E-04	4,44E-04	Replication initiation protein (O)
<i>SCO5350</i>	-2,85E+00	5,11E-04	1,86E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5377</i>	-2,04E+00	2,65E-19	8,49E-18	Chitinase two-component response regulator (RP)
<i>SCO5383</i>	2,60E+00	5,95E-03	1,53E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO5415</i>	-2,07E+00	1,95E-18	5,77E-17	Isobutyryl-coa mutase A (O)
<i>SCO5420</i>	-3,48E+00	7,52E-42	1,32E-39	Cholesterol esterase (O)
<i>SCO5421</i>	-2,00E+00	6,07E-10	6,30E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5422</i>	-2,08E+00	1,66E-15	3,56E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5440</i>	-2,19E+00	3,39E-16	7,87E-15	Glycogen branching protein (O)
<i>SCO5442</i>	-2,10E+00	1,23E-15	2,66E-14	Trehalose synthase (O)
<i>SCO5443</i>	-2,62E+00	3,42E-24	1,56E-22	Alpha-amylase (O)
<i>SCO5453</i>	8,34E+00	1,77E-03	5,47E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5456</i>	-3,23E+00	2,57E-26	1,42E-24	Glycosyl hydrolase (O)
<i>SCO5459</i>	-2,41E+00	8,00E-32	6,15E-30	Enoyl-CoA hydratase (O)
<i>SCO5461</i>	-2,51E+00	1,12E-11	1,48E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5466</i>	-2,36E+00	2,02E-18	5,95E-17	Hydrolase (O)

<i>SCO5484</i>	3,63E+00	2,59E-39	3,75E-37	Small hydrophobic membrane protein (MB)
<i>SCO5485</i>	5,13E+00	6,31E-37	7,52E-35	Small hydrophobic membrane protein (MB)
<i>SCO5490</i>	-2,33E+00	2,30E-08	1,92E-07	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5520</i>	-2,36E+00	2,04E-17	5,39E-16	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (O)
<i>SCO5521</i>	-4,72E+00	2,46E-34	2,56E-32	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5522</i>	2,10E+00	4,89E-21	1,75E-19	3-isopropylmalate dehydrogenase (O)
<i>SCO5524</i>	2,89E+00	8,03E-03	1,98E-02	Transmembrane transport protein (MB)
<i>SCO5527</i>	2,93E+00	1,64E-02	3,59E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5553</i>	2,04E+00	1,88E-18	5,58E-17	3-isopropylmalate dehydratase large subunit (O)
<i>SCO5554</i>	2,13E+00	2,30E-15	4,85E-14	3-isopropylmalate dehydratase small subunit (O)
<i>SCO5642</i>	-2,57E+00	1,53E-21	5,68E-20	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5644</i>	-2,11E+00	2,28E-14	4,43E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5658</i>	-2,53E+00	4,60E-33	4,15E-31	Polyamine-binding lipoprotein (O)
<i>SCO5659</i>	-2,13E+00	1,03E-14	2,06E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5676</i>	-2,08E+00	2,85E-23	1,22E-21	4-aminobutyrate aminotransferase (O)
<i>SCO5681</i>	4,86E+00	1,48E-03	4,68E-03	Glycosyl transferase (O)
<i>SCO5682</i>	3,23E+00	1,64E-02	3,59E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5685</i>	5,74E+00	9,91E-04	3,31E-03	Sugar hydrolase (O)
<i>SCO5690</i>	9,32E+00	6,37E-05	2,95E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5758</i>	-2,43E+00	2,70E-23	1,16E-21	Transcriptional regulator (RP)

<i>SCO5774</i>	2,60E+00	8,22E-08	6,39E-07	Glutamate permease (MB)	
<i>SCO5775</i>	3,20E+00	3,66E-12	5,15E-11	Glutamate permease (MB)	
<i>SCO5776</i>	2,55E+00	4,96E-07	3,47E-06	Glutamate binding protein (O)	
<i>SCO5777</i>	2,81E+00	8,56E-08	6,63E-07	Glutamate uptake system ATP-binding protein (MB)	
<i>SCO5786</i>	5,24E+00	6,69E-04	2,36E-03	Hydrolase (O)	
<i>SCO5826</i>	-2,55E+00	4,50E-26	2,43E-24	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5827</i>	-2,16E+00	2,13E-19	6,83E-18	Transmembrane transport protein (MB)	
<i>SCO5834</i>	-2,46E+00	3,08E-22	1,22E-20	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5882</i>	4,79E+00	2,72E-03	7,88E-03	RedV protein (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5883</i>	3,94E+00	7,41E-03	1,85E-02	Hypothetical protein (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5888</i>	4,50E+00	7,08E-04	2,48E-03	3-oxoacyl-ACP synthase III (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5890</i>	2,91E+00	1,96E-02	4,20E-02	8-amino-7-oxononanoate synthase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5891</i>	5,54E+00	4,96E-04	1,82E-03	Peptide synthase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5892</i>	6,92E+00	5,69E-05	2,67E-04	Polyketide synthase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5893</i>	6,32E+00	3,86E-03	1,07E-02	Oxidoreductase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5895</i>	3,25E+00	2,26E-02	4,74E-02	Methyltransferase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5896</i>	3,39E+00	2,26E-04	9,12E-04	Phosphoenolpyruvate-utilizing enzyme (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5897</i>	-2,60E+00	1,41E-06	9,21E-06	Oxidase (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5898</i>	-2,08E+00	2,95E-17	7,71E-16	Hypothetical protein (SM)	RED <i>SCO5877-5898</i>
<i>SCO5905</i>	2,38E+00	1,32E-03	4,26E-03	Export protein (MB)	
<i>SCO5917</i>	-2,25E+00	1,27E-15	2,73E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO5920</i>	2,95E+00	1,53E-03	4,84E-03	DEAD/DEAH box helicase (O)	

<i>SCO5924</i>	7,57E+00	3,56E-03	9,93E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5933</i>	4,72E+00	1,01E-03	3,38E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5941</i>	2,87E+00	1,33E-02	3,02E-02	Aminotransferase (O)
<i>SCO5943</i>	2,95E+00	9,50E-03	2,28E-02	Hydrolase (O)
<i>SCO5944</i>	5,17E+00	1,93E-03	5,89E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5945</i>	6,96E+00	4,21E-04	1,58E-03	Transferase (O)
<i>SCO5946</i>	3,36E+00	2,39E-02	4,97E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5948</i>	3,51E+00	4,97E-04	1,82E-03	Oxidoreductase (O)
<i>SCO5950</i>	6,73E+00	2,89E-04	1,13E-03	Export protein (MB)
<i>SCO5957</i>	1,85E+01	2,13E-166	7,88E-163	Transporter (MB)
<i>SCO5964</i>	2,22E+00	6,45E-03	1,64E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5970</i>	-2,30E+00	2,73E-18	7,90E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5974</i>	4,44E+00	5,08E-03	1,34E-02	Integral membrane ion exchanger (MB)
<i>SCO5977</i>	3,51E+00	1,64E-26	9,34E-25	Amino acid permease (MB)
<i>SCO5979</i>	6,23E+00	1,23E-04	5,30E-04	Enoyl-CoA hydratase (O)
<i>SCO5980</i>	8,57E+00	3,92E-05	1,93E-04	Salicylyl-CoA 5-hydroxylase (O)
<i>SCO5983</i>	2,97E+00	1,35E-02	3,05E-02	Fatty acid-CoA ligase (O)
<i>SCO5984</i>	6,28E+00	4,53E-03	1,22E-02	Acyl-CoA dehydrogenase (O)
<i>SCO5990</i>	-2,58E+00	1,33E-07	1,01E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6000</i>	-2,10E+00	2,32E-12	3,40E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6005</i>	-2,36E+00	1,15E-24	5,39E-23	Lipoprotein (MB)
<i>SCO6012</i>	3,12E+00	1,94E-02	4,16E-02	Chitinase(S)
<i>SCO6020</i>	2,06E+00	2,33E-13	3,95E-12	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO6022</i>	2,62E+00	1,16E-03	3,83E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6023</i>	4,26E+00	6,76E-04	2,38E-03	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO6024</i>	2,48E+00	5,22E-04	1,89E-03	Transferase (O)
<i>SCO6025</i>	2,48E+00	5,24E-04	1,90E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6045</i>	4,00E+00	1,21E-16	2,97E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6059</i>	-2,95E+00	1,69E-42	3,12E-40	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6089</i>	6,11E+00	5,32E-05	2,53E-04	Antibiotic resistance rRNA adenine methyltransferase (O)
<i>SCO6090</i>	2,30E+00	2,14E-16	5,08E-15	Antibiotic resistance macrolide glycosyltransferase (O)
<i>SCO6093</i>	2,69E+00	1,90E-19	6,14E-18	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6094</i>	3,23E+00	3,37E-34	3,46E-32	Transport system integral membrane protein (MB)
<i>SCO6095</i>	3,16E+00	3,16E-32	2,51E-30	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO6096</i>	2,85E+00	6,53E-42	1,18E-39	Lipoprotein (MB)
<i>SCO6097</i>	2,97E+00	3,47E-40	5,34E-38	Sulfate adenylyltransferase subunit 1 (O)
<i>SCO6098</i>	3,20E+00	8,04E-43	1,56E-40	Sulfate adenylyltransferase subunit 2 (O)
<i>SCO6099</i>	2,53E+00	4,31E-21	1,55E-19	Adenylyl-sulfate kinase (O)
<i>SCO6100</i>	2,62E+00	7,20E-33	6,11E-31	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase (O)
<i>SCO6102</i>	2,50E+00	4,77E-30	3,39E-28	Nitrite/sulfite reductase (O)
<i>SCO6124</i>	6,11E+00	2,05E-19	6,62E-18	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6125</i>	3,68E+00	8,74E-28	5,25E-26	Membrane lipoprotein (MB)
<i>SCO6129</i>	-2,71E+00	1,05E-17	2,84E-16	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO6141</i>	-2,27E+00	2,42E-11	3,00E-10	Transmembrane protein (MB)
<i>SCO6145</i>	7,73E+00	3,65E-03	1,02E-02	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO6163</i>	-2,30E+00	4,05E-16	9,30E-15	Sensor kinase (RP)
<i>SCO6165</i>	-2,19E+00	1,21E-15	2,62E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6166</i>	-3,05E+00	4,52E-29	2,96E-27	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6167</i>	-3,16E+00	8,23E-21	2,91E-19	Proline rich protein membrane protein (MB)
<i>SCO6170</i>	-3,97E+00	9,93E-26	5,20E-24	Oxidoreductase subunit (O)
<i>SCO6171</i>	-3,34E+00	1,65E-08	1,41E-07	Oxidoreductase (O)
<i>SCO6172</i>	-4,41E+00	3,99E-24	1,81E-22	Oxidoreductase (O)
<i>SCO6173</i>	-5,74E+00	1,84E-28	1,14E-26	Permease SC6C509 (MB)
<i>SCO6174</i>	-2,23E+00	3,55E-03	9,90E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6179</i>	-2,46E+00	3,56E-12	5,02E-11	Nucleotide-sugar dehydratase (O)
<i>SCO6180</i>	3,41E+00	4,34E-03	1,17E-02	Transferase (O)
<i>SCO6182</i>	4,06E+00	1,48E-02	3,29E-02	Dehydratase (O)
<i>SCO6183</i>	9,99E+00	7,31E-04	2,55E-03	Transferase (O)
<i>SCO6185</i>	4,23E+00	1,14E-02	2,66E-02	Transferase (O)
<i>SCO6186</i>	5,13E+00	6,14E-03	1,57E-02	Phosphoheptose isomerase (O)
<i>SCO6187</i>	5,43E+00	9,49E-03	2,28E-02	Bifunctional synthase/transferase (O)
<i>SCO6189</i>	9,71E+00	1,74E-03	5,41E-03	Transferase (O)
<i>SCO6190</i>	6,23E+00	4,04E-04	1,52E-03	Transferase (O)
<i>SCO6200</i>	-2,23E+00	1,78E-11	2,24E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6201</i>	-2,16E+00	2,46E-08	2,05E-07	Glyoxylate carboligase (O)
<i>SCO6211</i>	-2,43E+00	6,06E-06	3,55E-05	Uricase (O)
<i>SCO6219</i>	2,06E+00	3,14E-23	1,33E-21	Ser/Thr protein kinase (O)
<i>SCO6224</i>	2,60E+00	3,65E-34	3,69E-32	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6225</i>	2,36E+00	8,02E-30	5,54E-28	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO6236</i>	-2,08E+00	3,27E-14	6,27E-13	DNA-binding protein (RP)	
<i>SCO6240</i>	-2,73E+00	1,02E-08	8,97E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6243</i>	-2,14E+00	4,46E-24	2,01E-22	Malate synthase (O)	
<i>SCO6247</i>	-2,97E+00	2,03E-26	1,14E-24	Allantoinase (O)	
<i>SCO6248</i>	-2,16E+00	3,07E-13	5,10E-12	Allantoicase (O)	
<i>SCO6250</i>	5,82E+00	5,76E-03	1,49E-02	Transporter (MB)	
<i>SCO6274</i>	4,08E+00	8,34E-05	3,76E-04	Type I polyketide synthase (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6275</i>	7,01E+00	8,02E-06	4,57E-05	Type I polyketide synthase (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6276</i>	4,03E+00	1,93E-03	5,87E-03	Hypothetical protein (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6279</i>	2,64E+00	4,71E-03	1,26E-02	Diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6281</i>	2,06E+00	1,05E-02	2,48E-02	FAD-binding protein (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6282</i>	-2,23E+00	1,92E-08	1,62E-07	3-oxoacyl-ACP reductase (SM)	CPK <i>SCO6273-6288</i>
<i>SCO6296</i>	2,60E+00	1,40E-04	5,94E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6298</i>	2,14E+00	1,03E-05	5,74E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6301</i>	4,14E+00	2,51E-03	7,34E-03	SCO6301 (O)	
<i>SCO6305</i>	2,31E+00	1,81E-04	7,47E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6306</i>	2,48E+00	1,82E-12	2,71E-11	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6323</i>	-2,77E+00	1,32E-38	1,77E-36	TetR family transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO6328</i>	5,86E+00	1,23E-03	4,01E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6344</i>	3,81E+00	2,72E-03	7,88E-03	Amidase (O)	
<i>SCO6347</i>	2,66E+00	3,43E-03	9,62E-03	Beta-galactosidase (O)	
<i>SCO6348</i>	3,01E+00	9,44E-03	2,28E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6352</i>	-2,13E+00	3,19E-05	1,60E-04	Hypothetical protein (HP)	

SCO6365	2,69E+00	3,37E-03	9,48E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6370	4,69E+00	3,79E-03	1,05E-02	Hypothetical protein (HP)	
SCO6373	-2,28E+00	8,33E-07	5,63E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6378	-2,22E+00	2,60E-12	3,77E-11	Hypothetical protein (HP)	
SCO6384	-2,10E+00	3,67E-17	9,38E-16	Integral membrane lysyl-tRNA synthetase (MB)	
SCO6393	-2,01E+00	2,04E-18	5,99E-17	Transposase (O)	
SCO6395	-2,93E+00	5,18E-28	3,14E-26	Pseudo (O)	
SCO6399	-2,69E+00	6,54E-16	1,48E-14	Hypothetical protein (HP)	
SCO6404	-2,27E+00	1,62E-06	1,05E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO6420	6,28E+00	1,50E-03	4,74E-03	DNA-binding protein (RP)	
SCO6424	-2,14E+00	7,74E-18	2,12E-16	Two-component system sensor protein (RP)	
SCO6426	2,85E+00	6,80E-03	1,72E-02	Hypothetical protein (HP)	
SCO6427	2,45E+00	1,02E-04	4,50E-04	Integral membrane transport protein (MB)	
SCO6428	2,64E+00	2,54E-04	1,01E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6432	2,81E+00	9,62E-04	3,23E-03	Peptide synthase (SM)	Dipeptido <i>SCO6429-6438</i>
SCO6434	3,07E+00	4,44E-04	1,65E-03	Oxidoreductase (SM)	Dipeptido <i>SCO6429-6438</i>
SCO6460	7,57E+00	1,67E-03	5,20E-03	Cation-transporting ATPase (MB)	
SCO6476	-2,00E+00	5,24E-18	1,47E-16	Adenylosuccinate lyase (O)	
SCO6494	-2,30E+00	5,99E-06	3,50E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO6499	-3,78E+00	2,23E-13	3,78E-12	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas <i>SCO6496-6509</i>
SCO6500	-3,92E+00	2,25E-11	2,79E-10	Gas vesicle synthesis-like protein (GV)	Vesículas de gas <i>SCO6496-6509</i>
SCO6501	-2,31E+00	1,22E-07	9,30E-07	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas <i>SCO6496-6509</i>

<i>SCO6502</i>	-3,97E+00	5,15E-06	3,07E-05	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas <i>SCO6496-6509</i>
<i>SCO6508</i>	-3,29E+00	1,42E-03	4,52E-03	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas <i>SCO6496-6509</i>
<i>SCO6515</i>	-3,12E+00	9,37E-16	2,08E-14	Protease (O)	
<i>SCO6516</i>	-4,00E+00	6,33E-06	3,68E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6520</i>	-6,28E+00	2,61E-40	4,10E-38	RNA polymerase sigma factor SigK (RP)	
<i>SCO6526</i>	-2,16E+00	1,67E-18	5,03E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6545</i>	3,41E+00	5,04E-03	1,33E-02	Cellulase(S)	
<i>SCO6546</i>	2,51E+00	3,16E-03	8,96E-03	Cellulase(S)	
<i>SCO6548</i>	2,16E+00	1,69E-02	3,69E-02	Cellulase(S)	
<i>SCO6553</i>	3,10E+00	7,55E-03	1,88E-02	Integral membrane efflux protein (MB)	
<i>SCO6554</i>	2,03E+00	6,70E-03	1,70E-02	Transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO6560</i>	5,66E+00	2,21E-04	8,95E-04	Respiratory chain oxidoreductase (O)	
<i>SCO6569</i>	-2,38E+00	5,81E-13	9,30E-12	Solute binding protein (O)	
<i>SCO6573</i>	2,95E+00	2,08E-02	4,42E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6574</i>	5,54E+00	2,95E-03	8,43E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6575</i>	1,05E+01	6,98E-04	2,45E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6576</i>	8,51E+00	1,29E-03	4,17E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6578</i>	6,63E+00	4,26E-03	1,16E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6579</i>	3,68E+00	1,10E-02	2,60E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6584</i>	5,13E+00	4,82E-03	1,28E-02	TPP-requiring enzyme (O)	
<i>SCO6587</i>	5,82E+00	2,34E-03	6,94E-03	Dehydrogenase (O)	
<i>SCO6602</i>	1,18E+01	7,64E-04	2,65E-03	Transmembrane sugar transport protein (MB)	
<i>SCO6611</i>	-2,06E+00	1,02E-13	1,79E-12	Hypothetical protein (HP)	

SCO6619	6,92E+00	1,42E-04	6,00E-04	Dehydrogenase (O)	
SCO6624	-2,06E+00	2,79E-07	2,02E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6625	-2,23E+00	1,13E-14	2,25E-13	Hypothetical protein (HP)	
SCO6629	-2,58E+00	5,02E-31	3,82E-29	Hypothetical protein (HP)	
SCO6677	3,76E+00	9,70E-03	2,32E-02	ABC transporter ATP-binding protein (MB)	
SCO6681	-2,10E+00	3,02E-13	5,03E-12	Ser/Thr protein kinase (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina <i>SCO6681-6685</i>
SCO6682	-4,23E+00	7,15E-31	5,34E-29	Hypothetical protein (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina <i>SCO6681-6685</i>
SCO6685	-3,27E+00	1,62E-30	1,20E-28	Two-component system response regulator (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina <i>SCO6681-6685</i>
SCO6689	9,65E+00	5,04E-05	2,41E-04	Hypothetical protein (HP)	
SCO6706	-2,20E+00	1,16E-05	6,39E-05	Glutathione-dependent aldehyde dehydrogenase (O)	
SCO6708	-2,04E+00	1,73E-11	2,19E-10	Hypothetical protein (HP)	
SCO6721	-3,10E+00	1,24E-27	7,31E-26	Hypothetical protein (HP)	
SCO6724	-2,53E+00	1,98E-26	1,12E-24	Hypothetical protein (HP)	
SCO6761	-2,23E+00	3,49E-05	1,74E-04	Hypothetical protein (SM)	Hopeno <i>SCO6759-6771</i>
SCO6767	-2,06E+00	6,28E-18	1,75E-16	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (SM)	Hopeno <i>SCO6759-6771</i>
SCO6771	-2,04E+00	7,01E-07	4,81E-06	Small hydrophobic hypothetical protein (SM)	Hopeno <i>SCO6759-6771</i>
SCO6783	-2,35E+00	9,52E-14	1,69E-12	Hypothetical protein (HP)	
SCO6785	4,14E+00	1,01E-02	2,40E-02	Fatty acid co-A racemase (O)	
SCO6793	3,56E+00	2,83E-03	8,16E-03	Aldehyde dehydrogenase (O)	

<i>SCO6809</i>	-5,66E+00	1,01E-03	3,38E-03	Integral membrane transport protein (MB)	
<i>SCO6810</i>	-5,31E+01	9,35E-74	4,61E-71	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6811</i>	-1,42E+01	2,26E-103	2,78E-100	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6812</i>	-2,14E+00	1,65E-10	1,83E-09	Transcription regulator ArsR (RP)	
<i>SCO6813</i>	-2,36E+00	3,31E-16	7,72E-15	Transcription regulator ArsR (RP)	
<i>SCO6818</i>	2,16E+00	3,30E-03	9,30E-03	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (O)	
<i>SCO6827</i>	4,14E+00	4,30E-05	2,09E-04	Polyketide synthase (SM)	Poliquétido <i>SCO6826-6827</i>
<i>SCO6833</i>	-2,08E+00	8,12E-08	6,33E-07	Isobutyryl-CoA mutase, small subunit (O)	
<i>SCO6841</i>	-2,50E+00	2,81E-10	3,03E-09	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6842</i>	1,50E+01	1,05E-03	3,48E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6843</i>	1,60E+01	1,19E-03	3,89E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6844</i>	5,66E+00	8,07E-03	1,99E-02	DNA methylase (O)	
<i>SCO6852</i>	1,69E+01	6,14E-04	2,19E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6856</i>	6,73E+00	6,94E-03	1,75E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6864</i>	8,06E+00	1,82E-03	5,59E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6865</i>	5,62E+00	9,53E-03	2,29E-02	Regulatory protein (RP)	
<i>SCO6866</i>	1,27E+01	3,48E-04	1,33E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6868</i>	1,03E+01	1,79E-03	5,52E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO6878</i>	9,45E+00	1,97E-03	5,98E-03	ATP-binding protein (O)	
<i>SCO6880</i>	1,41E+01	2,26E-05	1,17E-04	Lipoprotein (MB)	
<i>SCO6881</i>	5,03E+00	5,00E-03	1,32E-02	ATP-binding protein (O)	
<i>SCO6884</i>	5,94E+00	3,99E-03	1,10E-02	Hypothetical protein (HP)	

SCO6896	7,57E+00	5,45E-03	1,43E-02	Hypothetical protein (HP)	
SCO6898	7,15E+01	9,16E-05	4,09E-04	Carboxylase (O)	
SCO6899	3,53E+00	1,13E-03	3,75E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6906	-2,64E+00	3,15E-23	1,33E-21	Hypothetical protein (HP)	
SCO6908	-2,30E+00	4,38E-20	1,48E-18	Hypothetical protein (HP)	
SCO6909	-2,25E+00	7,36E-07	5,02E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6921	4,22E+01	4,44E-07	3,12E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6922	5,20E+01	9,04E-04	3,05E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6923	2,36E+01	5,49E-05	2,59E-04	Hypothetical protein (HP)	
SCO6924	4,06E+00	3,76E-03	1,04E-02	DNA-binding protein (RP)	
SCO6927	-2,13E+00	5,48E-09	5,05E-08	Hypothetical protein (SM)	Lantibiótico <i>SCO6927-6932</i>
SCO6931	-2,77E+00	3,71E-07	2,65E-06	Hypothetical protein (SM)	Lantibiótico <i>SCO6927-6932</i>
SCO6932	-2,14E+00	8,66E-10	8,84E-09	Hypothetical protein (SM)	Lantibiótico <i>SCO6927-6932</i>
SCO6934	-3,46E+00	2,82E-04	1,11E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6939	-2,69E+00	1,44E-03	4,59E-03	Hypothetical protein (HP)	
SCO6942	-4,38E+00	6,33E-05	2,93E-04	Hypothetical protein (HP)	
SCO6943	-3,07E+00	3,67E-14	6,98E-13	Sensor histidine-kinase (RP)	
SCO6944	-3,03E+00	2,86E-11	3,52E-10	Hypothetical protein (HP)	
SCO6945	-3,66E+00	3,23E-09	3,06E-08	Hypothetical protein (HP)	
SCO6949	-4,99E+00	1,84E-08	1,56E-07	Hypothetical protein (HP)	
SCO6952	-2,13E+00	9,02E-15	1,81E-13	Hypothetical protein (HP)	
SCO6954	3,10E+00	4,23E-03	1,15E-02	Monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit A (MB)	
SCO6963	4,14E+00	5,51E-03	1,44E-02	Lipoprotein (MB)	
SCO6965	-2,46E+00	8,34E-05	3,76E-04	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO6985</i>	2,04E+00	2,61E-03	7,61E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6988</i>	-2,36E+00	1,42E-28	8,95E-27	Oxidoreductase (O)
<i>SCO6989</i>	-2,23E+00	6,99E-13	1,10E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6990</i>	2,39E+00	9,54E-18	2,60E-16	Membrane transport protein (MB)
<i>SCO7008</i>	2,85E+00	4,87E-23	2,03E-21	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO7013</i>	-2,39E+00	1,19E-09	1,19E-08	Sugar-binding lipoprotein (MB)
<i>SCO7020</i>	3,97E+00	1,95E-02	4,18E-02	Alpha-amylase (O)
<i>SCO7031</i>	4,72E+00	6,29E-04	2,23E-03	Beta-D-xylosidase (O)
<i>SCO7036</i>	4,82E+00	1,32E-39	1,99E-37	Argininosuccinate synthase (O)
<i>SCO7037</i>	2,50E+00	6,70E-03	1,70E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7068</i>	8,17E+00	1,28E-04	5,50E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7079</i>	-3,53E+00	2,23E-32	1,83E-30	Pseudo (O)
<i>SCO7085</i>	-2,27E+00	2,64E-04	1,04E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7094</i>	5,46E+00	6,16E-04	2,19E-03	Flavohemoprotein (O)
<i>SCO7099</i>	6,73E+00	6,43E-04	2,28E-03	RNA polymerase sigma factor (RP)
<i>SCO7113</i>	1,04E+01	9,54E-03	2,29E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7114</i>	7,31E+00	9,93E-03	2,37E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7115</i>	8,11E+00	2,91E-03	8,34E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7117</i>	7,73E+00	6,48E-03	1,65E-02	Ferredoxin reductase (O)
<i>SCO7118</i>	1,50E+01	2,66E-04	1,05E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7119</i>	5,98E+00	5,18E-03	1,37E-02	Dehydrogenase (O)
<i>SCO7120</i>	4,41E+00	4,39E-03	1,19E-02	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome B subunit (O)
<i>SCO7122</i>	1,50E+01	3,22E-03	9,10E-03	Acetyltransferase (O)

<i>SCO7123</i>	4,20E+00	5,93E-03	1,53E-02	Acyltransferase (O)
<i>SCO7124</i>	4,32E+00	2,14E-04	8,69E-04	Pyruvate dehydrogenase subunit E1 (O)
<i>SCO7125</i>	4,79E+00	3,66E-03	1,02E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7128</i>	6,11E+00	1,35E-03	4,33E-03	Transmembrane efflux protein (MB)
<i>SCO7153</i>	-2,27E+00	2,59E-04	1,03E-03	Sugar transporter (MB)
<i>SCO7164</i>	3,27E+00	5,51E-03	1,44E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7169</i>	6,28E+00	1,25E-03	4,07E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7170</i>	2,28E+00	2,03E-02	4,33E-02	Secreted sugar hydrolase(S)
<i>SCO7176</i>	7,62E+00	1,20E-04	5,22E-04	Secreted peptidase(S)
<i>SCO7178</i>	6,63E+00	1,11E-02	2,60E-02	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO7179</i>	2,00E+00	2,22E-02	4,67E-02	Amidase (O)
<i>SCO7183</i>	3,36E+00	1,77E-02	3,84E-02	Branched amino acid transport system permease (MB)
<i>SCO7186</i>	-3,23E+00	2,68E-11	3,31E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7188</i>	2,58E+00	2,37E-03	7,03E-03	Secreted peptidase(S)
<i>SCO7210</i>	-2,62E+00	5,55E-25	2,71E-23	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7223</i>	2,17E+00	9,19E-03	2,22E-02	Monoxygenase (O)
<i>SCO7226</i>	-2,23E+00	2,78E-17	7,33E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7227</i>	-2,22E+00	7,09E-16	1,58E-14	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7236</i>	-4,29E+00	4,23E-13	6,87E-12	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome subunit B (O)
<i>SCO7237</i>	-4,29E+00	4,72E-33	4,20E-31	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7238</i>	-3,14E+00	8,31E-05	3,76E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7257</i>	-2,35E+00	9,60E-25	4,61E-23	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7260</i>	-3,61E+00	7,75E-15	1,57E-13	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO7267</i>	2,16E+00	2,43E-12	3,54E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7268</i>	2,83E+00	1,88E-18	5,58E-17	Adenosine deaminase (O)
<i>SCO7274</i>	2,14E+00	2,05E-02	4,36E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7276</i>	-2,55E+00	9,00E-09	8,02E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7289</i>	-3,27E+00	1,67E-07	1,24E-06	Regulator (RP)
<i>SCO7290</i>	-2,27E+00	3,49E-12	4,95E-11	Dehydrogenase (O)
<i>SCO7311</i>	-2,48E+00	5,25E-10	5,48E-09	Amino acid decarboxylase (O)
<i>SCO7314</i>	-2,73E+00	2,61E-12	3,78E-11	RNA polymerase sigma factor SigM (RP)
<i>SCO7316</i>	-2,68E+00	1,75E-03	5,42E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7317</i>	-2,45E+00	2,49E-04	9,94E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7325</i>	-2,57E+00	3,30E-24	1,51E-22	Anti-sigma factor antagonist (RP)
<i>SCO7328</i>	-3,20E+00	9,53E-23	3,87E-21	Regulatory protein (RP)
<i>SCO7329</i>	-2,57E+00	5,50E-25	2,71E-23	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase (O)
<i>SCO7345</i>	1,45E+01	5,52E-05	2,60E-04	ATP-dependent DNA ligase (O)
<i>SCO7346</i>	2,79E+00	6,99E-03	1,76E-02	Membrane transport protein (MB)
<i>SCO7350</i>	5,39E+00	4,09E-04	1,54E-03	Membrane efflux protein (MB)
<i>SCO7362</i>	2,03E+00	1,00E-10	1,15E-09	Oxidoreductase (O)
<i>SCO7363</i>	2,62E+00	8,22E-09	7,35E-08	Oxidoreductase (O)
<i>SCO7371</i>	-2,22E+00	4,56E-10	4,80E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7380</i>	3,18E+00	9,08E-03	2,21E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7383</i>	-2,31E+00	7,32E-11	8,57E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7384</i>	1,03E+01	1,18E-04	5,11E-04	Transmembrane transport protein (MB)
<i>SCO7393</i>	-3,01E+00	4,43E-18	1,25E-16	Lipoprotein (MB)
<i>SCO7394</i>	6,23E+00	1,47E-04	6,19E-04	Hypothetical protein (HP)

<i>SCO7396</i>	2,95E+00	2,38E-02	4,95E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7398</i>	2,28E+00	9,57E-16	2,12E-14	Iron-hydroxamate transporter permease subunit (MB)
<i>SCO7399</i>	2,04E+00	4,67E-20	1,58E-18	Binding-protein-dependent transport lipoprotein (MB)
<i>SCO7407</i>	2,51E+00	2,38E-02	4,96E-02	Beta-galactosidase (O)
<i>SCO7412</i>	-2,45E+00	5,52E-14	1,01E-12	Thiamine pyrophosphate protein (O)
<i>SCO7428</i>	2,08E+00	2,80E-12	4,03E-11	Flavoheмоprotein (O)
<i>SCO7431</i>	-3,10E+00	1,13E-11	1,48E-10	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7437</i>	3,36E+00	9,81E-04	3,29E-03	Benzoylformate decarboxylase (O)
<i>SCO7450</i>	5,62E+00	1,61E-02	3,54E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7451</i>	2,33E+00	1,87E-02	4,04E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7457</i>	5,74E+00	3,90E-03	1,07E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7463</i>	3,01E+00	4,16E-41	6,84E-39	Sensor histidine kinase (RP)
<i>SCO7464</i>	3,51E+00	4,93E-35	5,35E-33	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7465</i>	4,59E+00	1,43E-28	8,95E-27	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7466</i>	4,50E+00	7,58E-45	1,51E-42	ATP/GTP-binding protein (O)
<i>SCO7469</i>	-4,44E+00	3,05E-20	1,04E-18	Phenylacetate-coa ligase (O)
<i>SCO7470</i>	-7,89E+00	5,66E-58	1,61E-55	Phenylacetic acid degradation protein PaaI (O)
<i>SCO7471</i>	-5,28E+00	7,98E-52	1,97E-49	Phenylacetate-coa oxygenase subunit PaaA (O)
<i>SCO7472</i>	-3,71E+00	6,96E-12	9,41E-11	Phenylacetate-coa oxygenase subunit PaaB (O)

<i>SCO7473</i>	-2,75E+00	4,80E-19	1,49E-17	Phenylacetic acid degradation protein PaaC (O)
<i>SCO7474</i>	-2,08E+00	5,32E-05	2,53E-04	Phenylacetic acid degradation protein PaaD (O)
<i>SCO7475</i>	-3,86E+00	9,50E-29	6,05E-27	Phenylacetic acid degradation NADH oxidoreductase PaaE (O)
<i>SCO7482</i>	2,79E+00	6,12E-03	1,57E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7488</i>	4,23E+00	1,02E-02	2,41E-02	Integral membrane binding protein dependent transport protein (MB)
<i>SCO7490</i>	3,01E+00	2,71E-04	1,07E-03	Oxidoreductase (O)
<i>SCO7492</i>	3,32E+00	3,88E-03	1,07E-02	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7493</i>	3,63E+00	1,26E-03	4,10E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7495</i>	4,23E+00	1,27E-02	2,90E-02	Pseudo (O)
<i>SCO7500</i>	2,81E+00	1,84E-02	3,98E-02	Allantoin permease (O)
<i>SCO7501</i>	4,03E+00	1,06E-02	2,50E-02	Hydrolase (O)
<i>SCO7503</i>	5,50E+00	2,64E-03	7,66E-03	Extracellular solute-binding protein(S)
<i>SCO7513</i>	1,30E+01	2,56E-04	1,02E-03	Secreted hydrolase(S)
<i>SCO7525</i>	2,50E+00	7,82E-03	1,94E-02	Oxidoreductase (O)
<i>SCO7526</i>	5,82E+00	1,15E-03	3,79E-03	Chloramphenicol resistance protein (MB)
<i>SCO7531</i>	5,28E+00	2,00E-03	6,06E-03	Acyltransferase (O)
<i>SCO7551</i>	-2,16E+00	1,52E-07	1,14E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7563</i>	3,05E+00	1,22E-02	2,79E-02	ABC transporter solute binding lipoprotein (MB)

<i>SCO7564</i>	9,25E+00	3,69E-04	1,40E-03	Oligopeptide ABC transporter integral membrane protein (MB)	
<i>SCO7565</i>	6,23E+00	9,76E-04	3,27E-03	Oligopeptide ABC transporter integral membrane protein (MB)	
<i>SCO7567</i>	7,89E+00	1,17E-03	3,85E-03	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein (MB)	
<i>SCO7569</i>	4,38E+00	4,50E-03	1,21E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7573</i>	-3,51E+00	8,28E-46	1,75E-43	Anti-sigma factor antagonist (RP)	
<i>SCO7575</i>	1,27E+01	7,39E-04	2,57E-03	Hydrolase (O)	
<i>SCO7586</i>	2,13E+00	2,14E-02	4,52E-02	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO7592</i>	6,45E+00	6,61E-03	1,68E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7625</i>	2,38E+00	4,32E-03	1,17E-02	Monooxygenase (O)	
<i>SCO7631</i>	5,06E+00	7,91E-04	2,73E-03	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7646</i>	-4,03E+00	4,46E-35	4,92E-33	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7647</i>	-2,51E+00	7,33E-22	2,78E-20	Calcium binding protein (O)	
<i>SCO7650</i>	2,55E+00	4,13E-03	1,13E-02	Hydrolase (O)	
<i>SCO7663</i>	-2,19E+00	3,28E-07	2,36E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7665</i>	-2,57E+00	3,98E-09	3,73E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7668</i>	3,01E+00	9,20E-03	2,23E-02	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7669</i>	6,54E+00	1,77E-03	5,47E-03	Oxidoreductase (SM)	Poliquétido aromático <i>SCO7669-7671</i>
<i>SCO7671</i>	9,38E+00	6,46E-04	2,28E-03	Transferase (SM)	Poliquétido aromático <i>SCO7669-7671</i>
<i>SCO7677</i>	4,89E+00	3,57E-04	1,37E-03	Solute-binding protein (O)	
<i>SCO7678</i>	5,54E+00	6,39E-04	2,26E-03	Metal transport integral membrane protein (MB)	

<i>SCO7679</i>	2,64E+01	9,23E-04	3,11E-03	Transport system integral membrane protein (MB)	
<i>SCO7680</i>	3,58E+00	2,84E-03	8,18E-03	ABC transporter ATP-binding protein (MB)	
<i>SCO7682</i>	8,28E+00	1,90E-05	9,99E-05	Non-ribosomal peptide synthase (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7683</i>	5,66E+00	9,03E-05	4,04E-04	Non-ribosomal peptide synthase (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7684</i>	7,21E+00	3,36E-03	9,46E-03	Hypothetical protein (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7685</i>	1,08E+01	1,39E-03	4,45E-03	Hypothetical protein (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7686</i>	8,06E+00	1,53E-04	6,44E-04	Cytochrome P450 (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7687</i>	1,47E+01	1,33E-04	5,66E-04	Thioesterase (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7689</i>	7,21E+00	4,83E-04	1,77E-03	ABC transporter ATP-binding protein (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7690</i>	4,06E+00	2,80E-03	8,09E-03	ABC transporter ATP-binding protein (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7691</i>	3,39E+00	8,49E-04	2,90E-03	Lyase (SM)	Coelibactina <i>SCO7681-7691</i>
<i>SCO7695</i>	2,38E+00	1,43E-04	6,06E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7699</i>	-2,22E+00	3,93E-08	3,19E-07	Nucleotide-binding protein (O)	
<i>SCO7700</i>	-2,11E+00	1,65E-05	8,79E-05	Cyclase (SM)	2-Metilisoborneol <i>SCO7700-7701</i>
<i>SCO7701</i>	-3,51E+00	2,32E-22	9,26E-21	Methyltransferase (SM)	2-Metilisoborneol <i>SCO7700-7701</i>
<i>SCO7702</i>	-2,06E+00	1,38E-10	1,55E-09	GntR family transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO7720</i>	3,48E+00	1,95E-04	7,99E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7727</i>	-2,07E+00	8,14E-16	1,81E-14	MarR family regulatory protein (RP)	
<i>SCO7740</i>	-2,31E+00	1,43E-05	7,73E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO7747</i>	-2,57E+00	7,09E-16	1,58E-14	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO7755</i>	-2,13E+00	3,60E-05	1,79E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7766</i>	-2,03E+00	2,51E-12	3,65E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7771</i>	-2,66E+00	1,35E-14	2,66E-13	Pseudo (O)
<i>SCO7781</i>	-2,11E+00	2,82E-09	2,69E-08	Pseudo (O)
<i>SCO7798</i>	-2,00E+00	1,08E-09	1,09E-08	Transposase (O)
<i>SCO7821</i>	-2,62E+00	2,90E-03	8,32E-03	Hypothetical protein (HP)

ANEXO V

Genes expresados diferencialmente (FC>2, FDR<0,05) en el mutante *Δaor1* con respecto a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 a 36 horas. En azul los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados en la cepa mutante. Funciones predichas mediante DAVID. SM: *Secondary metabolites* (metabolitos secundarios). RP: *Regulatory protein* (proteína reguladora). MB: *Membrane protein* (proteína de membrana). GV: *Gas Vesicle Proteins* (proteínas de vesículas de gas). HP: *Hypothetical protein* (proteína hipotética). S: *Secreted protein* (proteína secretada). O: *Other function* (otra función).

GEN	FC	P-VALOR	FDR	FUNCIÓN	CLÚSTER
<i>SCO0039</i>	-3,22E+00	7,38E-07	6,52E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0070</i>	-3,16E+00	2,29E-05	1,24E-04	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0072</i>	5,79E+00	2,60E-30	1,76E-28	Hypothetical protein (S)	
<i>SCO0103</i>	4,52E+00	5,00E-25	2,47E-23	Flavoheмоprotein (O)	
<i>SCO0104</i>	3,39E+00	3,84E-12	8,38E-11	Hydrolase (O)	
<i>SCO0130</i>	5,33E+00	2,32E-43	2,81E-41	Beta-lactamase (O)	
<i>SCO0197</i>	3,42E+00	3,48E-09	5,29E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0212</i>	3,62E+00	2,46E-09	3,78E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0217</i>	3,93E+00	2,90E-08	3,60E-07	Nitrate reductase subunit beta NarH2 (O)	
<i>SCO0218</i>	4,84E+00	7,73E-10	1,28E-08	Nitrate reductase subunit delta NarJ2 (O)	
<i>SCO0219</i>	3,94E+00	6,10E-08	7,03E-07	Nitrate reductase subunit delta NarI2 (O)	
<i>SCO0220</i>	4,40E+00	3,46E-09	5,27E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0224</i>	-1,34E+01	5,79E-09	8,36E-08	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0231</i>	2,34E+01	7,32E-65	2,71E-62	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0256</i>	8,41E+00	1,13E-05	6,80E-05	Short chain oxidoreductase (O)	
<i>SCO0257</i>	1,04E+01	2,41E-06	1,81E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0258</i>	7,43E+00	2,01E-05	1,11E-04	Hypothetical protein (HP)	

SCO0259	8,56E+00	5,24E-06	3,51E-05	Alcohol dehydrogenase (O)	
SCO0260	3,40E+00	2,14E-07	2,20E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO0269	-3,20E+00	2,97E-06	2,17E-05	Hypothetical protein (SM)	Lantibiotico SCO0267-0270
SCO0270	-3,07E+00	3,93E-07	3,74E-06	Hypothetical protein (SM)	Lantibiotico SCO0267-0270
SCO0320	-2,37E+01	1,23E-12	2,81E-11	Hypothetical protein (HP)	
SCO0321	-3,74E+00	1,81E-08	2,38E-07	Carboxylesterase (O)	
SCO0381	-2,12E+01	4,36E-32	3,32E-30	Glycosyl transferase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0382	-1,68E+01	9,15E-27	5,05E-25	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0383	-1,41E+01	2,10E-21	8,63E-20	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0384	-1,54E+01	1,77E-24	8,31E-23	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0385	-1,52E+01	2,58E-25	1,32E-23	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0386	-1,37E+01	6,66E-32	5,03E-30	Asparagine synthetase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0387	-1,37E+01	1,10E-30	7,64E-29	Bi-domain-containing oxidoreductase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0388	-1,57E+01	1,16E-28	7,12E-27	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0389	-1,17E+01	1,50E-33	1,22E-31	Lipoprotein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0390	-1,09E+01	1,87E-26	1,02E-24	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0391	-1,88E+01	1,90E-42	2,23E-40	Transferase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0392	-1,52E+01	1,10E-36	1,04E-34	Methyltransferase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0393	-1,39E+01	1,90E-32	1,46E-30	Transferase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0394	-1,23E+01	4,94E-37	4,74E-35	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0395	-1,11E+01	1,25E-28	7,61E-27	Epimerase/dehydratase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0396	-1,02E+01	2,97E-31	2,13E-29	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0397	-1,11E+01	1,12E-29	7,31E-28	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401
SCO0398	-6,80E+00	1,92E-20	7,58E-19	Glycosyl transferase (SM)	Deoxiazucar SCO0381-0401

<i>SCO0399</i>	-9,83E+00	1,08E-25	5,68E-24	Hypothetical protein (SM)	Deoxiazucar <i>SCO0381-0401</i>
<i>SCO0400</i>	-7,75E+00	6,46E-30	4,26E-28	Epimerase (SM)	Deoxiazucar <i>SCO0381-0401</i>
<i>SCO0401</i>	-9,66E+00	1,90E-24	8,87E-23	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (SM)	Deoxiazucar <i>SCO0381-0401</i>
<i>SCO0409</i>	-5,64E+00	1,35E-29	8,74E-28	Spore-associated protein (O)	
<i>SCO0532</i>	-3,08E+00	1,57E-06	1,25E-05	Sugar transporter membrane protein (MB)	
<i>SCO0548</i>	-3,37E+00	9,55E-05	4,18E-04	3-oxoacyl-ACP synthase (O)	
<i>SCO0554</i>	-3,15E+00	2,23E-07	2,28E-06	Beta-mannosidase (S)	
<i>SCO0595</i>	4,32E+00	2,06E-24	9,58E-23	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0596</i>	2,61E+01	2,00E-62	5,69E-60	DNA-binding protein (RP)	
<i>SCO0600</i>	5,67E+00	3,82E-27	2,16E-25	RNA polymerase sigma factor sigb (RP)	
<i>SCO0644</i>	-4,13E+00	1,81E-14	4,70E-13	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0656</i>	-3,39E+00	1,12E-07	1,22E-06	Gas vesicle synthesis protein (GV)	
<i>SCO0666</i>	1,14E+01	6,45E-34	5,42E-32	Catalase (RP)	
<i>SCO0678</i>	2,81E+01	5,98E-79	4,91E-76	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0681</i>	3,35E+00	1,90E-08	2,47E-07	Ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase (S)	
<i>SCO0685</i>	-3,28E+00	5,09E-07	4,71E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0686</i>	4,24E+00	1,10E-24	5,24E-23	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0689</i>	4,59E+00	2,74E-28	1,66E-26	Oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit (O)	
<i>SCO0698</i>	6,74E+00	1,04E-43	1,28E-41	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0718</i>	4,93E+00	3,50E-29	2,21E-27	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0719</i>	3,76E+00	2,82E-23	1,25E-21	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0721</i>	4,78E+00	7,12E-24	3,25E-22	Glycosyl transferase (O)	
<i>SCO0722</i>	5,77E+00	4,35E-33	3,46E-31	Hydrolase (O)	
<i>SCO0729</i>	-3,28E+00	2,67E-19	9,57E-18	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO0750</i>	1,14E+01	4,06E-66	1,87E-63	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0752</i>	-4,47E+00	2,28E-22	9,62E-21	Protease (O)	
<i>SCO0753</i>	4,73E+00	2,31E-27	1,33E-25	Hypothetical protein (SM)	Bacteriocina <i>SCO0753-0756</i>
<i>SCO0757</i>	3,57E+00	1,06E-19	3,86E-18	Phosphatase (O)	
<i>SCO0758</i>	4,39E+00	8,76E-19	3,04E-17	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0759</i>	6,21E+00	6,02E-28	3,53E-26	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0760</i>	4,11E+00	4,31E-21	1,75E-19	Methyltransferase (O)	
<i>SCO0761</i>	3,36E+00	2,35E-06	1,78E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0776</i>	5,41E+00	6,35E-45	7,96E-43	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0777</i>	4,59E+00	4,46E-35	3,97E-33	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0778</i>	3,33E+00	1,22E-17	3,99E-16	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0779</i>	1,26E+01	3,53E-54	6,07E-52	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0784</i>	9,80E+00	2,76E-60	6,81E-58	Hypothetical protein (S)	
<i>SCO0786</i>	3,79E+00	6,49E-26	3,45E-24	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0790</i>	6,33E+00	7,87E-13	1,84E-11	Hydrolase (O)	
<i>SCO0792</i>	3,05E+00	1,40E-14	3,70E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0793</i>	4,01E+00	1,56E-14	4,07E-13	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0827</i>	3,84E+00	6,62E-12	1,42E-10	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0834</i>	3,46E+00	1,91E-16	5,78E-15	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0844</i>	3,08E+00	7,41E-11	1,41E-09	DNA-binding protein (RP)	
<i>SCO0845</i>	4,77E+00	6,06E-16	1,74E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0870</i>	3,22E+00	3,25E-15	8,90E-14	Two-component system response regulator (RP)	
<i>SCO0871</i>	3,17E+00	9,54E-15	2,54E-13	Two-component sensor protein (RP)	
<i>SCO0882</i>	-3,35E+00	3,70E-06	2,61E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0885</i>	4,71E+00	8,57E-27	4,76E-25	Thioredoxin (RP)	

<i>SCO0896</i>	6,64E+00	4,41E-35	3,97E-33	Oxidoreductase (O)	
<i>SCO0897</i>	1,06E+01	5,21E-58	1,13E-55	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0906</i>	4,21E+00	4,55E-25	2,27E-23	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0909</i>	-3,62E+00	2,05E-20	8,02E-19	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0919</i>	3,30E+00	8,05E-17	2,47E-15	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO0930</i>	-5,49E+00	3,81E-21	1,55E-19	Lipoprotein (MB)	
<i>SCO0944</i>	-4,77E+00	7,39E-29	4,59E-27	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0973</i>	-9,18E+00	1,24E-23	5,58E-22	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO0991</i>	-3,34E+00	1,14E-08	1,57E-07	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1053</i>	-3,24E+00	9,66E-06	5,94E-05	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1063</i>	-3,67E+00	5,79E-08	6,72E-07	Sugar transport integral membrane protein (MB)	
<i>SCO1065</i>	-3,67E+00	2,73E-12	6,00E-11	Sugar transport sugar binding protein (MB)	
<i>SCO1072</i>	-3,33E+00	1,06E-06	8,84E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1100</i>	-3,20E+00	7,43E-12	1,57E-10	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO1124</i>	3,60E+00	1,68E-09	2,65E-08	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO1125</i>	3,08E+00	3,52E-13	8,42E-12	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1130</i>	3,50E+00	8,55E-11	1,61E-09	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1160</i>	-3,03E+00	5,89E-06	3,86E-05	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO1174</i>	3,43E+00	1,73E-04	6,86E-04	Aldehyde dehydrogenase (O)	
<i>SCO1178</i>	-2,21E+01	1,09E-15	3,08E-14	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO1204</i>	3,64E+00	1,61E-21	6,63E-20	Succinic semialdehyde dehydrogenase (O)	
<i>SCO1223</i>	3,27E+00	2,23E-07	2,28E-06	Ornithine aminotransferase (O)	
<i>SCO1225</i>	9,56E+00	1,64E-55	2,95E-53	Osmoprotectant transporter (MB)	
<i>SCO1227</i>	-3,35E+00	5,05E-09	7,38E-08	DNA-binding protein (RP)	
<i>SCO1266</i>	-3,11E+00	1,33E-05	7,82E-05	3-oxoacyl-ACP synthase (SM)	Poliquérido aromático <i>SCO1265-1273</i>

<i>SCO1281</i>	-3,05E+00	2,44E-05	1,32E-04	Oxidoreductase (O)
<i>SCO1356</i>	-3,62E+00	5,92E-21	2,38E-19	Iron sulfur protein (O)
<i>SCO1357</i>	-3,45E+00	8,46E-11	1,60E-09	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1358</i>	-3,07E+00	3,54E-09	5,37E-08	Lysr family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO1364</i>	-5,81E+00	3,12E-19	1,10E-17	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1366</i>	-3,38E+00	1,55E-20	6,17E-19	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1367</i>	-2,56E+01	4,32E-65	1,68E-62	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO1368</i>	-1,69E+01	4,11E-63	1,38E-60	ABC transporter (MB)
<i>SCO1369</i>	-5,85E+00	1,33E-30	9,08E-29	Two component system histidine kinase (RP)
<i>SCO1370</i>	-4,58E+00	4,90E-33	3,85E-31	Two component system DNA binding response regulator (RP)
<i>SCO1456</i>	-3,40E+00	3,00E-05	1,56E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1491</i>	3,71E+00	1,72E-10	3,06E-09	Elongation factor P (O)
<i>SCO1492</i>	3,60E+00	1,26E-14	3,35E-13	Peptidase (O)
<i>SCO1550</i>	-8,48E+00	7,27E-17	2,27E-15	Small membrane protein (MB)
<i>SCO1557</i>	7,92E+00	4,32E-15	1,18E-13	Lipoprotein (MB)
<i>SCO1573</i>	-4,37E+00	2,72E-22	1,14E-20	Oxidoreductase membrane protein (MB)
<i>SCO1574</i>	-3,27E+00	4,39E-14	1,11E-12	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1575</i>	-3,00E+00	1,45E-10	2,63E-09	Thiamine biosynthesis lipoprotein (O)
<i>SCO1722</i>	-3,17E+00	3,36E-06	2,41E-05	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO1723</i>	-3,40E+00	3,69E-06	2,61E-05	RNA polymerase sigma factor (RP)
<i>SCO1740</i>	-3,37E+00	5,21E-05	2,49E-04	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO1767</i>	-3,87E+00	1,43E-14	3,77E-13	DNA hydrolase (O)
<i>SCO1801</i>	-4,59E+00	4,59E-11	8,86E-10	Two component response regulator (RP)
<i>SCO1802</i>	-4,14E+00	1,09E-11	2,25E-10	Two-component system sensor kinase (RP)

<i>SCO1803</i>	-5,45E+01	5,50E-08	6,40E-07	Oxidoreductase (O)
<i>SCO1804</i>	-4,41E+01	2,50E-08	3,13E-07	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (O)
<i>SCO1839</i>	-4,07E+00	5,15E-11	9,89E-10	Transcriptional regulator (RP)
<i>SCO1862</i>	-5,21E+00	2,06E-18	7,06E-17	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO1868</i>	-4,31E+00	8,54E-21	3,41E-19	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1892</i>	-3,12E+00	2,10E-12	4,68E-11	Integral membrane efflux protein (MB)
<i>SCO1898</i>	8,99E+00	2,79E-08	3,47E-07	Substrate binding protein (O)
<i>SCO1899</i>	9,33E+00	3,13E-08	3,84E-07	Integral membrane sugar transport protein (MB)
<i>SCO1900</i>	1,55E+01	2,07E-10	3,64E-09	Integral membrane sugar transport protein (MB)
<i>SCO1901</i>	1,68E+01	7,27E-12	1,54E-10	Zinc-binding dehydrogenase (O)
<i>SCO1902</i>	6,44E+00	3,22E-07	3,14E-06	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO1905</i>	-3,31E+00	1,98E-14	5,07E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1909</i>	-1,31E+01	3,37E-12	7,38E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO1910</i>	1,26E+01	1,29E-51	1,84E-49	Alanine-rich protein (O)
<i>SCO1911</i>	1,28E+01	3,73E-54	6,26E-52	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2028</i>	-3,65E+00	2,59E-05	1,39E-04	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2029</i>	-3,03E+00	8,54E-07	7,33E-06	Hypothetical protein (S)
<i>SCO2056</i>	-3,04E+00	2,35E-05	1,27E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2113</i>	3,35E+00	2,22E-04	8,41E-04	Bacterioferritin (O)
<i>SCO2136</i>	3,68E+00	3,87E-12	8,40E-11	Hypothetical protein (S)
<i>SCO2210</i>	5,05E+00	6,02E-12	1,29E-10	Glutamine synthetase (O)
<i>SCO2217</i>	-4,49E+00	8,64E-17	2,64E-15	Hypothetical protein (S)
<i>SCO2218</i>	-7,64E+00	3,02E-11	5,96E-10	Lipoprotein (MB)
<i>SCO2280</i>	3,94E+00	5,49E-25	2,67E-23	TetR family transcriptional regulator (RP)

<i>SCO2309</i>	-5,76E+00	1,97E-08	2,55E-07	Transmembrane transport protein (MB)
<i>SCO2315</i>	1,05E+01	3,43E-43	4,09E-41	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2341</i>	1,54E+01	5,86E-56	1,14E-53	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2342</i>	1,73E+01	7,34E-53	1,15E-50	Hypothetical protein (S)
<i>SCO2344</i>	3,15E+00	6,42E-17	2,01E-15	Integral membrane transport protein (MB)
<i>SCO2372</i>	7,20E+00	2,74E-46	3,49E-44	Small hydrophobic protein (MB)
<i>SCO2408</i>	-3,89E+00	1,65E-14	4,31E-13	Aminotransferase (O)
<i>SCO2453</i>	1,34E+01	1,14E-61	3,01E-59	Hypothetical protein (S)
<i>SCO2477</i>	-3,15E+00	1,62E-07	1,71E-06	Short chain dehydrogenase (O)
<i>SCO2478</i>	-1,28E+01	8,43E-13	1,95E-11	Reductase (O)
<i>SCO2492</i>	-8,69E+00	1,44E-25	7,55E-24	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2493</i>	4,87E+00	1,26E-22	5,43E-21	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2494</i>	4,82E+00	1,31E-08	1,78E-07	Pyruvate phosphate dikinase (O)
<i>SCO2495</i>	-3,43E+00	2,98E-16	8,77E-15	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2511</i>	-3,47E+00	3,61E-09	5,44E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2512</i>	-5,14E+00	2,08E-17	6,68E-16	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2517</i>	-6,86E+00	4,44E-41	4,76E-39	Two-component system response regulator (RP)
<i>SCO2518</i>	-7,99E+00	5,99E-50	7,91E-48	Two-component sensor kinase (RP)
<i>SCO2519</i>	-2,36E+01	2,32E-36	2,15E-34	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO2550</i>	-3,71E+00	2,61E-17	8,31E-16	Lipoprotein (MB)
<i>SCO2628</i>	3,93E+00	4,80E-12	1,04E-10	Amino acid permease (O)
<i>SCO2641</i>	-3,31E+00	8,68E-13	2,00E-11	Resistance protein (O)
<i>SCO2695</i>	-1,45E+01	7,80E-13	1,83E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO2696</i>	-4,63E+00	3,25E-08	3,98E-07	2-hydroxyacid dehydrogenase (O)
<i>SCO2706</i>	-3,05E+00	2,03E-07	2,10E-06	Transferase (O)

SCO2745	-3,12E+00	1,30E-12	2,95E-11	LacI family transcriptional regulator (RP)	
SCO2788	3,08E+00	2,01E-08	2,60E-07	Hypothetical protein (HP)	
SCO2789	3,06E+00	1,88E-07	1,95E-06	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (O)	
SCO2861	-3,03E+00	2,16E-08	2,76E-07	Hypothetical protein (HP)	
SCO2886	5,69E+00	1,65E-33	1,33E-31	Hydrolase (O)	
SCO2907	3,32E+00	1,56E-15	4,31E-14	PTS transmembrane protein (MB)	
SCO2909	-3,11E+00	4,41E-13	1,05E-11	Hypothetical protein (MB)	
SCO2910	3,34E+00	9,57E-10	1,56E-08	Cysteine synthase (O)	
SCO2911	3,05E+00	9,27E-10	1,52E-08	Hypothetical protein (HP)	
SCO2924	3,79E+00	4,81E-25	2,39E-23	Regulator (RP)	
SCO2937	-4,51E+00	1,09E-07	1,19E-06	Transmembrane transport protein (MB)	
SCO2954	-3,00E+00	5,12E-18	1,72E-16	RNA polymerase sigma factor SigL (RP)	
SCO2976	-7,47E+00	6,16E-14	1,54E-12	Hypothetical protein (HP)	
SCO2977	-3,02E+00	1,55E-18	5,34E-17	Hypothetical protein (HP)	
SCO3064	3,44E+00	4,16E-10	7,00E-09	Peptide transporter (MB)	
SCO3111	-3,39E+00	2,92E-11	5,79E-10	ABC transporter ATP-binding protein (MB)	
SCO3134	-4,18E+00	7,41E-19	2,58E-17	Two-component system response regulator (RP)	
SCO3139	3,18E+00	8,80E-17	2,68E-15	Sodium:solute symporter (MB)	
SCO3158	4,34E+00	4,99E-21	2,02E-19	Hypothetical protein (HP)	
SCO3210	-5,91E+00	1,20E-24	5,70E-23	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3211	-7,17E+00	2,39E-25	1,24E-23	Indoleglycerol phosphate synthase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3212	-5,72E+00	2,75E-27	1,57E-25	Anthranilate phosphoribotransferase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3213	-4,54E+00	1,58E-08	2,09E-07	Anthranilate synthase component II (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3214	-4,86E+00	5,93E-23	2,58E-21	Anthranilate synthase component I (SM)	CDA SCO3210-3279

SCO3215	-6,70E+00	3,16E-34	2,71E-32	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3218	-1,40E+01	2,52E-12	5,57E-11	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3220	-2,21E+01	1,56E-15	4,31E-14	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3221	-1,48E+01	2,26E-14	5,79E-13	Prephenate dehydrogenase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3222	-1,15E+01	4,78E-07	4,45E-06	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3227	-7,39E+00	1,95E-14	5,03E-13	Aminotransferase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3228	-1,10E+01	2,36E-26	1,26E-24	Glycolate oxidase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3229	-1,29E+01	6,80E-12	1,45E-10	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3230	-8,81E+00	2,96E-22	1,23E-20	CDA peptide synthetase I (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3231	-7,66E+00	5,49E-25	2,67E-23	CDA peptide synthetase II (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3232	-8,29E+00	3,71E-23	1,63E-21	CDA peptide synthetase III (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3233	-7,41E+00	1,07E-18	3,69E-17	Hydrolase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3234	-7,46E+00	7,35E-17	2,27E-15	Phosphotransferase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3235	-8,72E+00	2,02E-16	6,08E-15	ABC transporter (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3236	-1,27E+01	5,24E-12	1,13E-10	Oxygenase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3237	-6,77E+00	1,01E-14	2,68E-13	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3238	-8,02E+00	2,15E-20	8,38E-19	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3239	-8,53E+00	2,58E-20	9,93E-19	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3240	-1,19E+01	2,33E-38	2,36E-36	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3241	-9,64E+00	3,16E-20	1,20E-18	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3242	-1,80E+01	2,98E-13	7,17E-12	Puitative transferase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3243	-1,40E+01	9,49E-16	2,70E-14	Myo-inositol phosphate synthase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3244	-1,21E+01	2,68E-11	5,33E-10	Hypothetical protein (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3245	-1,16E+01	2,65E-24	1,23E-22	Salicylate hydroxylase (SM)	CDA SCO3210-3279
SCO3246	-9,72E+00	5,86E-11	1,12E-09	3-oxoacyl-ACP synthase III (SM)	CDA SCO3210-3279

<i>SCO3247</i>	-1,12E+01	2,90E-16	8,57E-15	Acyl coa oxidase (SM)	CDA <i>SCO3210-3279</i>
<i>SCO3248</i>	-1,32E+01	1,53E-10	2,76E-09	3-oxoacyl-ACP synthase (SM)	CDA <i>SCO3210-3279</i>
<i>SCO3249</i>	-1,59E+01	6,31E-16	1,81E-14	Acyl carrier protein (SM)	CDA <i>SCO3210-3279</i>
<i>SCO3263</i>	-5,02E+00	9,79E-08	1,08E-06	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3264</i>	-4,68E+00	1,39E-12	3,14E-11	GntR family transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO3287</i>	-3,23E+00	3,65E-07	3,49E-06	Serine/arginine rich protein (O)	
<i>SCO3311</i>	3,08E+00	1,51E-08	2,02E-07	Delta-aminolevulinic acid dehydratase (O)	
<i>SCO3713</i>	-3,44E+00	7,08E-08	8,04E-07	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3714</i>	-4,87E+00	1,29E-10	2,37E-09	Transposase (O)	
<i>SCO3750</i>	-3,78E+00	7,98E-20	2,96E-18	Two-component sensor histidine kinase (RP)	
<i>SCO3802</i>	1,26E+01	2,14E-55	3,77E-53	Hypothetical protein (MB)	
<i>SCO3805</i>	4,10E+00	2,62E-25	1,34E-23	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO3857</i>	3,50E+00	1,41E-15	3,93E-14	Regulatory protein (RP)	
<i>SCO3999</i>	-3,71E+00	9,97E-20	3,67E-18	Lipoprotein (MB)	
<i>SCO4005</i>	-5,24E+00	1,78E-13	4,34E-12	RNA polymerase sigma factor (RP)	
<i>SCO4029</i>	7,17E+00	3,96E-38	3,91E-36	Hypothetical protein (HP)	
<i>SCO4077</i>	3,13E+00	1,84E-08	2,41E-07	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit purs (O)	
<i>SCO4078</i>	4,64E+00	2,51E-11	5,03E-10	Phosphoribosylformylglycinamide synthase I (O)	
<i>SCO4079</i>	4,36E+00	2,08E-09	3,25E-08	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II (O)	
<i>SCO4118</i>	-5,62E+00	1,19E-21	4,92E-20	TetR family transcriptional regulator (RP)	
<i>SCO4164</i>	7,07E+00	9,21E-18	3,05E-16	Thiosulfate sulfurtransferase (O)	
<i>SCO4165</i>	5,34E+00	3,94E-19	1,39E-17	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO4174</i>	-4,82E+00	6,87E-12	1,46E-10	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO4175</i>	-6,82E+00	2,27E-31	1,64E-29	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4214</i>	-1,11E+02	4,12E-140	3,04E-136	AbaA-like regulatory protein (RP)
<i>SCO4265</i>	-4,30E+00	5,37E-13	1,27E-11	Transport integral membrane protein (MB)
<i>SCO4266</i>	-2,02E+01	7,44E-25	3,57E-23	Oxidoreductase (O)
<i>SCO4280</i>	-4,93E+00	3,41E-07	3,30E-06	Reductase (O)
<i>SCO4291</i>	-3,52E+00	8,18E-12	1,73E-10	Hypothetical protein (S)
<i>SCO4317</i>	-3,72E+00	9,06E-15	2,43E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4332</i>	-3,36E+00	1,24E-11	2,57E-10	Integral membrane ATPase (MB)
<i>SCO4498</i>	1,56E+01	3,21E-42	3,71E-40	Proton transport protein (MB)
<i>SCO4562</i>	-4,68E+00	3,58E-09	5,41E-08	NADH dehydrogenase subunit A (O)
<i>SCO4563</i>	-3,24E+00	8,08E-06	5,07E-05	NADH dehydrogenase subunit B (O)
<i>SCO4578</i>	-3,21E+00	7,45E-06	4,73E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4617</i>	-3,03E+00	2,92E-07	2,89E-06	ATP-binding protein (O)
<i>SCO4622</i>	-3,53E+00	1,25E-08	1,70E-07	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO4624</i>	-3,25E+00	3,52E-05	1,80E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4640</i>	-3,91E+00	4,00E-04	1,37E-03	TetR family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO4641</i>	-6,10E+00	1,39E-03	3,92E-03	Transmembrane efflux protein (MB)
<i>SCO4642</i>	-1,01E+01	6,33E-04	2,02E-03	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO4734</i>	3,42E+00	1,73E-08	2,27E-07	50S ribosomal protein L13 (O)
<i>SCO4799</i>	3,22E+00	2,69E-09	4,13E-08	Lipase (S)
<i>SCO4829</i>	3,28E+00	2,06E-13	5,00E-12	Oxidoreductase (O)
<i>SCO4843</i>	-3,36E+00	5,38E-06	3,59E-05	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO4846</i>	3,26E+00	9,16E-12	1,91E-10	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO4862</i>	-3,02E+00	3,39E-11	6,65E-10	Hypothetical protein (HP)

SCO4896	3,14E+00	8,01E-10	1,32E-08	Transport integral membrane protein (MB)	
SCO4903	-4,45E+00	4,31E-11	8,36E-10	Hypothetical protein (MB)	
SCO4982	4,68E+00	6,92E-27	3,87E-25	Hypothetical protein (MB)	
SCO4983	-5,01E+00	7,80E-06	4,93E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO4999	-4,58E+00	1,04E-16	3,16E-15	Hypothetical protein (HP)	
SCO5071	-8,73E+00	7,07E-29	4,43E-27	Hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5072	-1,69E+01	3,64E-52	5,27E-50	Hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5073	-1,59E+01	3,46E-59	8,25E-57	Oxidoreductase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5074	-1,52E+01	1,39E-58	3,11E-56	Dehydratase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5075	-7,06E+00	9,09E-34	7,55E-32	Oxidoreductase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5078	-3,45E+00	2,33E-16	6,97E-15	Hypothetical protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5079	-4,22E+00	1,61E-25	8,37E-24	Hypothetical protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5080	-5,23E+00	6,41E-20	2,41E-18	Hydrolase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5081	-4,44E+00	2,57E-18	8,70E-17	Hypothetical protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5085	-5,86E+00	5,71E-34	4,85E-32	Actinorhodin operon activator protein (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5086	-1,84E+01	8,14E-76	4,63E-73	Ketoacyl reductase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5087	-1,17E+01	1,85E-48	2,40E-46	Actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase subunit alpha (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5088	-6,98E+00	6,50E-25	3,14E-23	Actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase subunit beta (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5089	-5,84E+00	2,55E-13	6,16E-12	Actinorhodin polyketide synthase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5090	-6,07E+00	2,59E-27	1,48E-25	Actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5091	-4,46E+00	6,74E-19	2,36E-17	Cyclase (SM)	ACT SCO5071-5092
SCO5092	-5,84E+00	2,68E-19	9,57E-18	Actinorhodin polyketide dimerase (SM)	ACT SCO5071-5092

<i>SCO5163</i>	-3,50E+00	8,07E-08	9,08E-07	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5178</i>	3,96E+00	4,71E-11	9,06E-10	Adenylyltransferase/sulfurtransferase moez (O)
<i>SCO5243</i>	1,26E+01	1,60E-41	1,80E-39	RNA polymerase sigma factor sigh (RP)
<i>SCO5244</i>	1,14E+01	2,46E-41	2,67E-39	Anti-sigma factor (RP)
<i>SCO5345</i>	-3,39E+00	4,05E-05	2,02E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5379</i>	-3,96E+00	1,47E-14	3,85E-13	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO5380</i>	-3,69E+00	2,76E-06	2,05E-05	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO5529</i>	3,42E+00	1,34E-15	3,76E-14	(R)-citramalate synthase (O)
<i>SCO5551</i>	-1,53E+01	4,27E-06	2,94E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5644</i>	-3,23E+00	1,69E-12	3,80E-11	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO5650</i>	3,07E+00	5,08E-09	7,41E-08	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO5924</i>	-3,12E+00	2,22E-06	1,69E-05	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO5966</i>	6,98E+00	2,07E-26	1,12E-24	Oxidase (O)
<i>SCO5982</i>	3,40E+00	1,09E-13	2,67E-12	Regulator (RP)
<i>SCO6014</i>	3,46E+00	1,97E-19	7,14E-18	Cationic amino acid transporter (MB)
<i>SCO6021</i>	-3,16E+00	2,11E-22	8,95E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6051</i>	5,95E+00	4,20E-30	2,80E-28	Iron-sulfur binding oxidoreductase (O)
<i>SCO6091</i>	-5,20E+00	8,06E-17	2,47E-15	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO6141</i>	7,71E+00	1,28E-34	1,11E-32	Transmembrane protein (MB)
<i>SCO6197</i>	-4,05E+00	3,15E-09	4,81E-08	Hypothetical protein (S)
<i>SCO6198</i>	-4,38E+00	2,48E-05	1,34E-04	Hypothetical protein (S)
<i>SCO6199</i>	-3,54E+00	1,16E-04	4,88E-04	Esterase (S)
<i>SCO6228</i>	-3,79E+00	1,97E-14	5,07E-13	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6257</i>	3,36E+00	8,23E-14	2,04E-12	ABC transporter sugar binding lipoprotein (MB)
<i>SCO6258</i>	3,34E+00	2,75E-19	9,78E-18	Sugar ABC transporter permease (MB)

SCO6259	3,41E+00	1,69E-17	5,49E-16	Sugar ABC transporter ATP-binding protein (MB)	
SCO6265	-4,27E+00	2,44E-18	8,31E-17	Gamma-butyrolactone binding protein (RP)	
SCO6266	-3,39E+01	2,15E-52	3,17E-50	Scba protein (SM)	SCO6266 γ -butirolactona Scb1
SCO6267	-5,59E+00	2,74E-20	1,05E-18	Hypothetical protein (HP)	
SCO6268	-1,30E+01	7,56E-04	2,33E-03	Histidine kinase (RP)	
SCO6272	-6,72E+01	4,88E-04	1,63E-03	FAD-binding protein (S)	
SCO6273	-1,12E+02	2,01E-04	7,77E-04	Type I polyketide synthase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6274	-8,31E+01	1,18E-04	4,95E-04	Type I polyketide synthase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6275	-1,06E+02	8,28E-05	3,70E-04	Type I polyketide synthase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6276	-4,49E+02	1,30E-04	5,41E-04	Hypothetical protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6277	-2,31E+02	1,02E-04	4,40E-04	Epoxide hydrolase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6278	-2,42E+02	1,57E-04	6,36E-04	Integral membrane transport protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6279	-2,77E+02	2,27E-04	8,55E-04	Diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6280	-3,59E+01	2,26E-08	2,87E-07	Regulatory protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6281	-3,82E+01	4,38E-05	2,15E-04	FAD-binding protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6282	-6,03E+02	1,21E-04	5,06E-04	3-oxoacyl-ACP reductase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6283	-4,04E+01	6,15E-04	1,97E-03	Hypothetical protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6284	-1,65E+01	1,74E-03	4,75E-03	Decarboxylase (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6285	-4,55E+01	1,20E-04	5,03E-04	Hypothetical protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6286	-2,35E+01	5,49E-04	1,80E-03	Regulatory protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6287	-2,69E+01	4,41E-04	1,49E-03	Thioesterase II (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6288	-2,13E+01	5,15E-04	1,70E-03	Regulatory protein (SM)	CPK SCO6273-6288
SCO6289	-4,20E+00	1,85E-03	5,00E-03	Oxidoreductase (S)	

SCO6291	-3,25E+00	3,45E-04	1,22E-03	Oxidase (S)	
SCO6328	-3,26E+00	1,42E-05	8,25E-05	Hypothetical protein (MB)	
SCO6346	-3,13E+00	9,30E-05	4,08E-04	Hypothetical protein (HP)	
SCO6421	-4,36E+00	4,38E-25	2,20E-23	Two-component system sensor kinase (RP)	
SCO6422	-3,78E+00	7,35E-17	2,27E-15	Two-component system regulatory protein (RP)	
SCO6494	7,22E+00	3,75E-36	3,43E-34	Hypothetical protein (MB)	
SCO6495	4,61E+00	3,32E-30	2,23E-28	Dehydrogenase (O)	
SCO6496	5,52E+00	5,32E-28	3,20E-26	Dehydrogenase (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6497	5,83E+00	1,07E-27	6,25E-26	Transketolase (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6499	2,45E+01	3,61E-65	1,48E-62	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6500	2,25E+01	3,84E-74	2,03E-71	Gas vesicle synthesis-like protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6501	2,29E+01	4,26E-56	8,50E-54	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6502	3,33E+01	2,17E-92	4,02E-89	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6503	1,63E+01	8,68E-68	4,28E-65	Hypothetical protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6504	2,21E+01	2,28E-77	1,53E-74	Hypothetical protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6505	1,94E+01	7,61E-77	4,69E-74	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6506	1,18E+01	4,43E-63	1,42E-60	Gas vesicle protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6507	1,61E+01	3,18E-29	2,03E-27	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6508	1,41E+01	1,96E-50	2,68E-48	Gas vesicle synthesis protein (GV)	Vesículas de gas SCO6496-6508
SCO6509	1,29E+01	7,44E-54	1,19E-51	Hypothetical protein (HP)	
SCO6510	5,74E+00	1,81E-31	1,34E-29	Hypothetical protein (HP)	
SCO6511	9,73E+00	6,27E-61	1,60E-58	Hypothetical protein (HP)	
SCO6513	8,02E+00	7,74E-31	5,45E-29	Hypothetical protein (HP)	
SCO6514	1,01E+01	1,39E-52	2,10E-50	Hypothetical protein (HP)	
SCO6515	2,70E+01	1,51E-80	1,60E-77	Protease (S)	

SCO6516	2,92E+01	1,36E-79	1,25E-76	Hypothetical protein (HP)	
SCO6520	6,63E+00	5,46E-35	4,81E-33	RNA polymerase sigma factor sigk (RP)	
SCO6544	-5,80E+00	6,92E-31	4,92E-29	Hypothetical protein (MB)	
SCO6574	-3,39E+00	3,19E-05	1,66E-04	Hypothetical protein (MB)	
SCO6576	-3,15E+00	1,26E-06	1,04E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO6647	-4,28E+00	1,34E-12	3,05E-11	Hypothetical protein (MB)	
SCO6650	-3,28E+00	1,96E-19	7,13E-18	Hypothetical protein (HP)	
SCO6651	-5,86E+00	1,41E-29	9,07E-28	Glycosyl transferase (O)	
SCO6652	-4,60E+00	8,53E-20	3,15E-18	Hypothetical protein (HP)	
SCO6653	-4,71E+00	5,78E-18	1,93E-16	Hypothetical protein (HP)	
SCO6682	4,96E+00	8,58E-11	1,61E-09	Hypothetical protein (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina SCO6681-6685
SCO6685	3,50E+00	5,09E-14	1,28E-12	Two-component system response regulator (SM)	Péptido SapB que contiene lantionina SCO6681-6685
SCO6706	9,34E+00	4,64E-40	4,89E-38	Glutathione-dependent aldehyde dehydrogenase (O)	
SCO6724	3,15E+00	4,26E-17	1,35E-15	Hypothetical protein (HP)	
SCO6749	-3,26E+00	4,63E-08	5,50E-07	Hypothetical protein (HP)	
SCO6773	-3,13E+00	3,63E-10	6,24E-09	Peptidase (S)	
SCO6821	-3,07E+00	8,89E-12	1,87E-10	Hypothetical protein (O)	
SCO6850	-3,70E+00	1,53E-06	1,23E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO6852	-3,52E+00	1,87E-06	1,45E-05	Hypothetical protein (HP)	
SCO6858	-3,11E+00	2,64E-07	2,64E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6872	-3,12E+00	9,04E-07	7,70E-06	Hypothetical protein (HP)	
SCO6880	-3,19E+00	1,50E-08	2,00E-07	Lipoprotein (MB)	
SCO6882	-3,92E+00	3,66E-05	1,85E-04	Hypothetical protein (HP)	

<i>SCO6900</i>	-3,79E+00	2,43E-07	2,46E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6905</i>	-3,13E+00	1,62E-06	1,29E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6921</i>	-3,03E+00	3,28E-11	6,44E-10	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO6924</i>	-3,11E+00	3,32E-07	3,24E-06	DNA-binding protein (RP)
<i>SCO6957</i>	-3,02E+00	2,24E-05	1,22E-04	Monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit E (MB)
<i>SCO6965</i>	4,00E+00	2,48E-20	9,61E-19	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO6974</i>	-3,25E+00	1,64E-10	2,95E-09	GntR family transcriptional regulator (RP)
<i>SCO6977</i>	-3,19E+00	2,73E-09	4,19E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7008</i>	-3,12E+00	2,35E-06	1,78E-05	ABC transporter ATP-binding protein (MB)
<i>SCO7034</i>	-3,11E+00	5,38E-08	6,29E-07	Aminotransferase (O)
<i>SCO7040</i>	3,11E+00	2,35E-07	2,38E-06	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (O)
<i>SCO7041</i>	1,13E+01	2,28E-36	2,13E-34	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7066</i>	-7,30E+00	1,85E-03	5,00E-03	2,4-dienoyl-coa reductase (O)
<i>SCO7082</i>	-3,08E+00	1,58E-05	9,06E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7098</i>	-3,05E+00	1,01E-06	8,50E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7106</i>	-3,30E+00	7,49E-07	6,60E-06	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7113</i>	-3,71E+00	4,76E-07	4,44E-06	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO7114</i>	-3,02E+00	1,66E-06	1,32E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7122</i>	-3,39E+00	1,49E-06	1,20E-05	Acetyltransferase (O)
<i>SCO7125</i>	-3,01E+00	2,98E-06	2,18E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7152</i>	-4,21E+00	1,66E-09	2,62E-08	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7160</i>	-3,03E+00	1,58E-06	1,26E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7165</i>	-3,24E+00	2,77E-06	2,05E-05	Sugar-binding integral membrane transport protein (MB)
<i>SCO7186</i>	7,57E+00	9,73E-51	1,36E-48	Hypothetical protein (MB)

<i>SCO7192</i>	-4,30E+00	1,44E-03	4,04E-03	Sigma factor (RP)
<i>SCO7210</i>	2,56E+01	7,96E-78	5,88E-75	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7225</i>	-3,98E+00	3,87E-10	6,57E-09	Chitinase (S)
<i>SCO7236</i>	1,22E+01	2,99E-62	8,20E-60	Ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome subunit B (O)
<i>SCO7237</i>	1,93E+01	7,09E-83	8,73E-80	Hypothetical protein (S)
<i>SCO7238</i>	1,16E+01	8,52E-56	1,57E-53	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7260</i>	7,44E+00	8,88E-40	9,25E-38	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO7273</i>	-3,21E+00	2,76E-05	1,46E-04	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7276</i>	4,44E+00	5,46E-28	3,26E-26	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7277</i>	3,58E+00	6,31E-23	2,73E-21	Regulator protein (RP)
<i>SCO7278</i>	6,68E+00	7,09E-32	5,30E-30	RNA polymerase sigma factor sigl (RP)
<i>SCO7287</i>	9,09E+00	1,29E-30	8,94E-29	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7288</i>	3,95E+00	2,24E-26	1,21E-24	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO7289</i>	8,40E+00	1,72E-41	1,89E-39	Regulator (RP)
<i>SCO7290</i>	5,93E+00	2,05E-39	2,10E-37	Dehydrogenase (O)
<i>SCO7305</i>	3,59E+00	1,94E-22	8,31E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7306</i>	3,96E+00	2,78E-14	7,10E-13	Regulatory protein (RP)
<i>SCO7311</i>	9,26E+00	3,41E-50	4,58E-48	Amino acid decarboxylase (O)
<i>SCO7312</i>	5,95E+00	9,37E-34	7,70E-32	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7314</i>	3,17E+01	5,29E-86	7,82E-83	RNA polymerase sigma factor sigm (RP)
<i>SCO7315</i>	1,14E+01	2,26E-23	1,01E-21	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7316</i>	1,25E+01	1,37E-52	2,10E-50	Hypothetical protein (MB)
<i>SCO7317</i>	2,06E+01	5,68E-96	1,40E-92	Hypothetical protein (HP)
<i>SCO7325</i>	1,47E+01	1,91E-64	6,72E-62	Anti-sigma factor antagonist (RP)

SC07330	3,76E+00	6,54E-07	5,86E-06	Hypothetical protein (MB)
SC07331	7,53E+00	2,15E-57	4,41E-55	Hypothetical protein (HP)
SC07345	-3,19E+00	3,09E-08	3,79E-07	ATP-dependent DNA ligase (O)
SC07371	1,71E+01	1,81E-57	3,83E-55	Hypothetical protein (HP)
SC07373	3,05E+00	7,07E-06	4,53E-05	Hypothetical protein (HP)
SC07374	6,25E+00	9,66E-18	3,19E-16	Nitrate reductase narb (fragment) (O)
SC07376	4,94E+00	5,72E-28	3,38E-26	Hypothetical protein (HP)
SC07377	5,67E+00	1,41E-15	3,93E-14	Hypothetical protein (HP)
SC07378	9,34E+00	1,65E-23	7,41E-22	Hypothetical protein (HP)
SC07379	3,35E+00	1,09E-09	1,77E-08	Hypothetical protein (HP)
SC07381	4,82E+00	2,24E-17	7,17E-16	Hypothetical protein (HP)
SC07387	4,41E+00	7,15E-20	2,67E-18	Hypothetical protein (HP)
SC07388	3,17E+00	1,96E-08	2,54E-07	Dehydrogenase (O)
SC07393	1,65E+01	6,79E-54	1,12E-51	Lipoprotein (MB)
SC07403	3,95E+00	3,42E-15	9,32E-14	Hypothetical protein (MB)
SC07412	2,26E+01	8,17E-59	1,89E-56	Thiamine pyrophosphate protein (O)
SC07413	8,83E+00	3,05E-37	2,96E-35	Short chain dehydrogenase (O)
SC07416	4,04E+00	4,03E-23	1,76E-21	Hypothetical protein (HP)
SC07417	4,23E+00	2,01E-20	7,91E-19	Cytochrome P450-family protein (O)
SC07418	3,83E+00	3,06E-20	1,17E-18	Cytochrome P450-family protein (O)
SC07419	5,09E+00	1,13E-23	5,14E-22	ATP/GTP binding protein (O)
SC07420	4,48E+00	2,34E-19	8,45E-18	Hypothetical protein (HP)
SC07421	3,34E+00	6,63E-18	2,21E-16	Hypothetical protein (HP)
SC07423	4,01E+00	1,10E-17	3,63E-16	Hypothetical protein (HP)
SC07428	3,62E+00	4,18E-11	8,14E-10	Flavohemoprotein (O)

SC07431	9,54E+00	7,51E-56	1,42E-53	Hypothetical protein (MB)	
SC07434	7,77E+00	2,22E-31	1,62E-29	Lipoprotein (MB)	
SC07442	8,88E+00	2,46E-38	2,45E-36	Hypothetical protein (HP)	
SC07446	8,06E+00	1,01E-62	2,99E-60	Regulator (RP)	
SC07450	-3,82E+00	7,89E-06	4,97E-05	Hypothetical protein (S)	
SC07454	4,66E+00	2,72E-16	8,07E-15	Hypothetical protein (MB)	
SC07463	3,47E+00	2,58E-10	4,46E-09	Sensor histidine kinase (RP)	
SC07464	3,69E+00	2,01E-12	4,51E-11	Hypothetical protein (HP)	
SC07465	3,50E+00	1,30E-12	2,96E-11	Hypothetical protein (HP)	
SC07466	3,47E+00	2,11E-11	4,28E-10	ATP/GTP-binding protein (RP)	
SC07488	-3,62E+00	1,77E-06	1,39E-05	Integral membrane binding protein dependent transport protein (MB)	
SC07489	-3,12E+00	1,18E-10	2,18E-09	Binding protein dependent transport lipoprotein (MB)	
SC07494	6,54E+00	6,88E-24	3,16E-22	Hypothetical protein (MB)	
SC07513	-3,28E+00	2,81E-05	1,48E-04	Hydrolase (S)	
SC07536	-1,38E+01	4,13E-18	1,39E-16	Hypothetical protein (MB)	
SC07577	-3,67E+00	9,24E-09	1,30E-07	Hydrolase (S)	
SC07590	6,86E+00	8,99E-33	6,99E-31	Catalase (O)	
SC07638	-5,83E+00	3,24E-20	1,22E-18	Phosphopyruvate hydratase(eno) (O)	
SC07646	1,46E+01	5,78E-63	1,78E-60	Hypothetical protein (MB)	
SC07669	-3,08E+00	2,52E-05	1,35E-04	Oxidoreductase (SM)	Poliquétido aromático <i>SC07669-7671</i>
SC07671	-3,14E+00	2,93E-03	7,40E-03	Transferase (SM)	Poliquétido aromático <i>SC07669-7671</i>
SC07717	-5,95E+00	6,42E-10	1,07E-08	Hypothetical protein (S)	
SC07747	1,26E+01	4,31E-66	1,88E-63	Hypothetical protein (HP)	

<i>SC07748</i>	3,03E+00	3,28E-16	9,60E-15	Hypothetical protein (HP)
<i>SC07751</i>	3,83E+00	3,34E-25	1,69E-23	Regulatory protein (RP)
<i>SC07759</i>	-3,44E+00	3,45E-07	3,33E-06	DNA-binding protein (RP)
<i>SC07761</i>	-3,88E+00	7,89E-06	4,97E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SC07762</i>	-4,46E+00	3,21E-06	2,32E-05	Hypothetical protein (HP)
<i>SC07821</i>	1,10E+01	8,14E-42	9,26E-40	Hypothetical protein (MB)